

Table des matières

Table des matières.....	9
Table des illustrations	13
Introduction.....	15
1° partie : Synthèse bibliographique.....	17
<i>Le côlon : fonctionnement normal et cancérogenèse.....</i>	
1. Le côlon sain	19
1.1. Aspects anatomiques et histologiques du côlon sain [1,2].....	19
1.1.1. Topographie	19
1.1.2. Configuration externe.....	20
1.1.3. Configuration interne.....	20
1.1.4. Structure	20
1.2. Aspects microbiologiques	22
1.2.1. Composition de la flore digestive.....	22
1.2.2. Colonisation du tube digestif	22
1.2.3. Activités métaboliques de la microflore intestinale	22
1.2.4. Interactions entre la flore intestinale et l'hôte.....	23
2. Le cancer du côlon.....	24
2.1. Epidémiologie	24
2.2. Rappels généraux sur la cancérogenèse.....	25
2.2.1. L'origine clonale du cancer.....	25
2.2.2. Evolution du cancer : phases d'initiation, de promotion et de progression.....	26
2.3. Pathogénie du cancer colorectal.....	27
2.3.1. Aspects morphologiques et histologiques	27
2.3.2. Aspects moléculaires et génétiques	28
2.4. Facteurs de risque.....	28
2.4.1. Age.....	28
2.4.2. Hérédité.....	28
2.4.3. Sexe	28
2.4.4. Mode de vie.....	29
2.4.5. Autres affections.....	29
2.5. Rôle de la flore digestive dans l'initiation ou la promotion du cancer du côlon	30
2.5.1. Flore commensale et inflammation.....	30
2.5.2. Métabolisme et synthèse de carcinogènes par les bactéries commensales.....	30
2.5.3. Biotransformation des acides biliaires.....	31
2.6. Diagnostic du cancer colorectal.....	31
2.7. Classification des tumeurs colorectales et pronostic	32
2.8. Traitement.....	32
2.9. Etudes de chimioprévention du cancer du côlon.....	32
2.9.1. Etudes épidémiologiques	33
2.9.2. Etudes in vitro	33
2.9.3. Etudes chez l'animal.....	34
2.9.4. Etudes d'intervention [12]	35
<i>Prébiotiques, probiotiques et synbiotiques : définitions, utilité, modes d'actions.....</i>	
1. Définitions	37
1.1. Aliments fonctionnels	37
1.2. Prébiotique	37
1.3. Probiotique	37
1.4. Bactéries lactiques	38
1.5. Synbiotique.....	38
2. Intérêts médicaux des probiotiques et bactéries lactiques.....	38
2.1. Bactéries lactiques	38

2.1.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques [37].....	38
2.1.2. Les différents genres de bactéries lactiques [7,37,38].....	39
2.2. Historique.....	40
2.3. Utilisation des probiotiques en santé humaine	41
2.3.1. Gastroentérologie	41
2.3.2. Affections du tractus urogénital.....	41
2.3.3. Action hypocholestérolémiantre	42
2.3.4. Action anticancérigène.....	42
2.3.5. Régulation du système immunitaire	42
2.4. Mécanismes d'action potentiels des probiotiques sur le cancer colorectal : résultats d'études <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> , et d'études d'intervention.....	42
2.4.1. Altérations quantitatives et/ou qualitatives de la microflore intestinale	43
2.4.2. Altération de l'activité métabolique de la microflore intestinale	43
2.4.3. Altération des conditions physico-chimiques du côlon.....	43
2.4.4. Liaison et dégradation des carcinogènes potentiels	44
2.4.5. Synthèse de composés antimutagéniques ou antitumorigéniques.....	44
2.4.6. Stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte	45
2.4.7. Effets sur la physiologie de l'hôte.....	45
2° partie : Méta-analyse.....	47
<i>Elaboration du protocole expérimental.....</i>	51
1. Formulation de la question de recherche, relation étudiée.....	51
2. Variables	51
2.1. Animaux utilisés	51
2.2. Conditions d'élevage des animaux.....	52
2.3. Carcinogènes	52
2.4. Probiotiques	52
2.5. Critères de jugement	52
3. Protocole	53
3.1. Recherche des articles susceptibles d'être utilisés dans la méta-analyse.....	53
3.1.1. Recherches sur Pubmed	53
3.1.2. Système de la « boule de neige ».....	53
3.1.3. Utilisation de Google Scholar.....	54
3.2. Sélection des articles utilisables	54
3.2.1. Sélection sur le titre et le résumé	54
3.2.2. Sélection sur l'article en entier	54
3.3. Extraction des données	57
3.4. Statistiques.....	57
3.4.1. Logiciel utilisé	58
3.4.2. Critères de jugement, types de données utilisées et calculées	58
3.4.3. Analyses.....	59
<i>Caractéristiques des articles.....</i>	61
1. Etudes incluses dans la méta-analyse	61
1.1. Abdelali 1995	61
1.2. Arimochi 1997	62
1.3. Bolognani 2001.....	63
1.4. Challa 1997.....	65
1.5. Femia 2002	66
1.6. Fukui 2001	67
1.7. Goldin 1980	67
1.8. Goldin 1996	68
1.9. Li 2003	69
1.10. Mc Intosh 1999	69
1.11. Nakanishi 2003	70
1.12. Ohkawara 2005	71
1.13. Park 2007	71
1.14. Rao 1999	72
1.15. Reddy 1993.....	73
1.16. Rowland 1998	73

1.17. Takano 1985.....	74
1.18. Yamazaki 2000.....	75
2. Articles exclus	76
2.1. Balansky 1999.....	76
2.2. Gallaher 1996.....	77
2.3. Gallaher 1999.....	78
2.4. Horie 1999	78
2.5. Koo 1991.....	79
2.6. Kulkarni 1994.....	79
2.7. Lee 2007.....	80
2.8. Marotta 2003	80
2.9. Ohno 2000	80
2.10. O'Mahony 2001.....	81
2.11. Onoue 1997	81
2.12. Park 2006	82
2.13. Shackelford 1983	82
2.14. Tavan 2002	83
3. Bilan des données recueillies	84
3.1. Critères de jugement	84
3.2. Animaux.....	84
3.3. Régimes alimentaires	84
3.4. Probiotiques.....	85
3.5. Carcinogènes.....	85
<i>Résultats.....</i>	87
1. Vérification de l'absence de biais de publication.....	87
2. Méta-analyse globale utilisant un modèle fixe	89
2.1. Critère de jugement tumeurs, modèle fixe	89
2.2. Critère de jugement ACF, modèle fixe	89
2.3. Critère de jugement AC, modèle fixe	89
2.4. Conclusions sur l'utilisation du modèle fixe	90
3. Méta-analyse globale utilisant un modèle aléatoire	91
3.1. Critère de jugement incidence des tumeurs	91
3.2. Critère de jugement ACF	92
3.3. Critère de jugement AC.....	93
3.4. Conclusions sur les résultats de la mété-analyse globale en modèle aléatoire	93
4. Méta-analyses en sous-groupes (modèle aléatoire).....	95
4.1. Variable « Carcinogène ».....	95
4.1.1. Nature du carcinogène.....	95
4.1.2. Dose totale de DMH administrée	97
4.1.3. Voie d'administration.....	98
4.2. Variable « Animal »	103
4.2.1. Sexe	103
4.2.2. Espèce et lignée	103
4.3. Variable « Conditions d'élevage » : teneur de l'aliment en matières grasses	107
4.4. Variable « Probiotique »	110
4.4.1. Genre bactérien utilisé.....	110
4.4.2. Dose administrée	114
4.4.3. Période d'administration par rapport au traitement carcinogène	116
4.5. Conclusion sur les analyses en sous-groupes	120
5. Cas des synbiotiques.....	122
5.1. Critère de jugement « Incidence des tumeurs »	123
5.2. Critère de jugement « ACF »	123
5.3. Conclusion sur les synbiotiques	123
<i>Discussion</i>	125
1. Considérations « techniques » : validité de la méthode utilisée pour l'analyse des données	125
1.1. Répartition normale ou dissymétrique des données.....	125
1.2. Hétérogénéité	126
1.3. Analyses en sous-groupes	126
1.4. Modèles d'effets, interactions entre les facteurs de variabilité.....	127

1.5.	Utilisation de plusieurs études issues du même article	127
1.6.	Interprétation des résultats non significatifs	128
2.	Application des résultats obtenus	129
2.1.	Extrapolation des résultats des méta-analyses à l'espèce humaine	129
2.1.1.	Induction de la cancérogenèse chez les rongeurs	129
2.1.2.	Choix des critères de jugement.....	130
2.1.3.	Problèmes relatifs à la flore digestive.....	131
2.1.4.	Lignée/souche des animaux utilisés.....	131
2.1.5.	Régime alimentaire	132
2.1.6.	Conclusions sur l'extrapolation des résultats	132
2.2.	Comparaison des propriétés chimioprotectrices des probiotiques et symbiotiques à celles d'autres substances évaluées chez les rongeurs	133
2.3.	Comment intégrer les probiotiques à l'alimentation humaine ?	134
2.3.1.	Stade d'administration.....	134
2.3.2.	Modes de distribution/consommation potentiels des probiotiques.....	135
2.4.	Choix d'un probiotique pour la chimioprévention du cancer du côlon chez l'Homme	136
2.4.1.	Critères biologiques	136
2.4.2.	Critères technologiques [46]	136
2.4.3.	Une seule espèce ou plusieurs ?.....	137
2.4.4.	Quelles espèces choisir ?	137
Conclusion générale		139
Conclusion personnelle		140
Bibliographie		141
Annexes		147
<i>Aliments fermentés par des bactéries lactiques.....</i>		<i>149</i>
<i>Principales bactéries lactiques.....</i>		<i>165</i>
<i>Notions statistiques et interprétation des graphiques utilisés en méta-analyse.....</i>		<i>177</i>
<i>Caractéristiques, données brutes, et effet moyen des études incluses dans la méta-analyse</i>		<i>189</i>
<i>Graphiques additionnels.....</i>		<i>197</i>

Table des illustrations

Tableaux

Tableau 1 : Facteurs promoteurs et inhibiteurs du cancer colorectal	29
Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques	39
Tableau 3 : Méta-analyses en sous-groupes, prévues dans le protocole de la méta-analyse afin d'étudier l'importance des variables identifiées sur l'effet des probiotiques	59
Tableau 4 : Synthèse des résultats des méta-analyses en sous-groupes	121
Tableau 5 : Caractéristiques des études incluses dans la méta-analyse sur les synbiotiques	122
Tableau 6 : Microflore de quelques laits fermentés commerciaux	152
Tableau 7 : Principales caractéristiques des bactéries lactiques intervenant dans la fermentation des végétaux	156
Tableau 8 : Principales espèces microbiennes utilisées dans la fabrication et la transformation des produits carnés	158
Tableau 9 : Caractéristiques distinctives des espèces de <i>Bifidobacterium</i>	168
Tableau 10 : Habitat de quelques espèces de Lactobacilles	170
Tableau 11 : Caractéristiques distinctives des espèces du genre <i>Leuconostoc</i>	171
Tableau 12 : Caractéristiques distinctives de quelques espèces de <i>Pediococcus</i>	172
Tableau 13 : Anciennes et nouvelles dénominations des streptocoques lactiques	173
Tableau 14 : Caractéristiques conventionnelles distinctives des espèces de Streptocoques lactiques	174
Tableau 15 : Table de loi gaussienne	182
Tableau 16 : Caractéristiques des études utilisant le critère incidence des tumeurs incluses dans la méta-analyse	191
Tableau 17 : Caractéristiques des études utilisant le critère ACF incluses dans la méta-analyse	192

Photographies

Photo 1 : Foyer de cryptes aberrantes	35
Photo 2 : <i>Bifidobacterium animalis</i> (x 6000)	167
Photo 3 : <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (x 4000) Photo 4 : <i>Lactobacillus acidophilus</i> (x 6000)	170
Photo 5 : <i>Lactobacillus helveticus</i> (x 6000) Photo 6 : <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> (x 6000)	170
Photo 7 : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> (x 6000)	171
Photo 8 : <i>Pediococcus</i> sp. (x 7000)	172
Photo 9 : <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (x 6000)	175
Photo 10 : <i>Streptococcus thermophilus</i> (x4000)	175

Figures

Figure 1 : Vue microscopique en trois dimensions de la muqueuse colique	21
Figure 2 : Fonctions de la flore intestinale : la flore commensale exerce une variété d'effets protecteurs, structurels et métaboliques sur la muqueuse intestinale	24
Figure 3 : Origine clonale du cancer	25
Figure 4 : Schéma général de l'évolution d'un cancer	26
Figure 5 : Evolution multiphasique d'une crypte normale en adénocarcinome, et mutations associées à chaque étape	27
Figure 6 : Dendrogramme construit d'après les valeurs de similitudes S_{AB} de catalogues d'oligonucléotides provenant des ARN ribosomaux 16S	40
Figure 7 : Funnel plot pour le critère tumeurs	86
Figure 8 : Funnel plot pour le critère ACF	86
Figure 9 : Funnel plot pour le critère AC	86
Figure 10 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle fixe	88
Figure 11 : Forest plot pour le critère ACF, modèle fixe	88
Figure 12 : Forest plot pour le critère cryptes aberrantes, modèle fixe	89
Figure 13 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, tous les essais	91
Figure 14 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, tous les essais	92
Figure 15 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, tous les essais	93
Figure 16 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, en fonction du carcinogène utilisé	94

Figure 17 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, en fonction du carcinogène utilisé.....	96
Figure 18 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, en fonction de la voie d'administration du carcinogène	99
Figure 19 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, études ayant utilisé le DMH comme carcinogène, en fonction de la voie d'administration	100
Figure 20 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, en fonction de la voie d'administration du carcinogène	101
Figure 21 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, en fonction de l'espèce et de la lignée utilisée.....	102
Figure 22 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon l'espèce et la lignée utilisée	104
Figure 23 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon la teneur en matières grasses de l'aliment	107
Figure 24 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon la teneur en matières grasses de l'aliment.....	108
Figure 25 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon le genre bactérien utilisé.....	111
Figure 26 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon le genre bactérien utilisé.....	112
Figure 27 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon la dose de probiotique administrée quotidiennement.....	114
Figure 28 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon la dose de probiotique administrée quotidiennement.....	115
Figure 29 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon la période d'administration des probiotiques par rapport au traitement carcinogène.....	117
Figure 30 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon la période d'administration des probiotiques par rapport au traitement carcinogène	118
Figure 31 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, selon la période d'administration des probiotiques par rapport au traitement carcinogène	119
Figure 32 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire.....	123
Figure 33 : Comparaison du risque relatif associé à différentes substances sur le risque relatif de cancer colorectal chimio-induit chez les rongeurs. Le nom de chaque substance est suivi du risque relatif associé. Les données proviennent des travaux de Clauzure [95] et Corpet [92].....	133
Figure 34 : Comparaison de l'effet standardisé de différentes substances sur le cancer colorectal chimio-induit chez les rongeurs (modèle aléatoire). Le nom de chaque substance est suivi de l'effet standardisé associé. Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance à 95% associé à cet effet. Les données sont issues des travaux de Clauzure [95] et Tournié [96]	134
Figure 35 : Traduction graphique de l'effet standardisé	182
Figure 36 : Données brutes et risque relatif des études incluses dans la méta-analyse pour le critère incidence des tumeurs (Risque relatif commun calculé en modèle aléatoire)	193
Figure 37 : Données brutes et effet standardisé des études incluses dans la méta-analyse pour le critère ACF (Effet standardisé commun calculé en modèle aléatoire)	194
Figure 38 : Données brutes et effet standardisé des études incluses dans la méta-analyse pour le critère ACF (Effet standardisé commun calculé en modèle aléatoire)	195
Figure 39 : Méta-analyse pour le critère ACF, modèle aléatoire, DMH en fonction de la voie d'administration.....	199
Figure 40 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, en fonction de l'espèce et de la lignée utilisée	200

Introduction

Le cancer est un problème de santé publique majeur. Cette « maladie » est la première cause de mortalité chez l'homme, et la deuxième chez la femme (après les maladies cardio-vasculaires).

Le cancer est une maladie multifactorielle ; des composantes génétiques, hormonales, environnementales, interviennent dans son apparition et sa progression. Parmi tous ces facteurs, il en est un sur lequel il est possible d'agir relativement facilement : l'alimentation. Le rôle de ce facteur dans la cancérogenèse paraît encore plus évident pour ce qui concerne les cancers du tube digestif, puisque l'intestin est directement en contact avec les aliments que nous ingérons.

Depuis 1970, des études ont été entreprises pour déterminer les aliments cancérigènes. De plus en plus de recherches sont à présent menées suivant le raisonnement inverse : s'il existe des aliments à éviter, il en existe d'autres qui exercent un effet protecteur contre le cancer.

Les probiotiques sont des suppléments alimentaires constitués de micro-organismes vivants qui influent de façon favorable sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale. Ils font partie des aliments qui intéressent les chercheurs pour leurs supposées propriétés anticancéreuses. Ces bactéries existent naturellement dans le tube digestif de l'homme ; on les retrouve aussi dans de nombreux aliments, tels que les produits laitiers à base de lait fermenté. Elles n'intéressent pas que les chercheurs, les médecins ou les malades : l'industrie agro-alimentaire les utilise déjà comme argument commercial, pour d'autres applications.

Cependant, bien qu'il existe une forte présomption concernant les propriétés inhibitrices des probiotiques à l'égard du cancer colorectal, les résultats des études *in vivo* sont parfois discordants. L'objectif de ce travail est de recenser les travaux concernant l'administration orale de probiotiques à des modèles murins de cancérogenèse colique chimio-induite afin de déterminer précisément l'effet de ces bactéries au moyen d'une méta-analyse.

1^o partie : Synthèse bibliographique

Le côlon : fonctionnement normal et cancérogenèse

Prébiotiques, probiotiques et synbiotiques : définition, utilité, modes d'action

Chapitre I

Le côlon : fonctionnement normal et cancérogenèse

1. Le côlon sain

Le gros intestin s'étend de l'extrémité distale de l'iléum à l'anus, sur une longueur d'approximativement 1,5 m. Il comporte le caecum, l'appendice, le côlon, le rectum et le canal anal. Son calibre diminue du caecum au côlon sigmoïde et passe de 8 cm à 3 cm.

Le côlon remplit un rôle important d'absorption, en ce qui concerne l'eau et les sels minéraux. Son rôle dans la digestion est plus limité ; la flore bactérienne qui le peuple est à l'origine de la fermentation des glucides non digérés. Les produits de cette fermentation (acides gras à chaîne courte) sont impliqués dans la bonne santé de la muqueuse colique.

1.1. Aspects anatomiques et histologiques du côlon sain [1,2]

1.1.1. *Topographie*

► *Disposition générale*

Commencant dans la fosse iliaque droite par le caecum et l'appendice, le gros intestin se poursuit par le côlon descendant qui va du flanc droit à l'hypocondre droit. Juste sous le foie, il tourne vers la gauche, formant l'angle colique droit (angle hépatique), puis traverse l'abdomen jusqu'à l'hypocondre gauche : le côlon transverse. A ce niveau, juste sous la rate, il tourne vers le bas, formant l'angle colique gauche (angle splénique), et se poursuit par le côlon descendant jusqu'à la fosse iliaque gauche.

Il devient le côlon sigmoïde et pénètre dans la partie supérieure de la cavité pelvienne, puis se prolonge le long de la paroi postérieure du pelvis par le rectum et se termine par le canal anal.

► *Disposition anatomo-chirurgicale*

Cette division classique basée sur l'alternance de segments mobiles et fixes, et sur les changements d'orientation du cadre colique, ne correspond ni aux affections du côlon, ni aux exérèses opératoires, conditionnées par les territoires vasculaires.

Aussi est-il préférable de diviser le côlon en deux portions :

- le côlon droit, irrigué par les vaisseaux mésentériques supérieurs et comprenant le caecum, l'appendice, le côlon descendant et la moitié droite du côlon transverse
- le côlon gauche, irrigué par les vaisseaux mésentériques inférieurs et comprenant la moitié gauche du côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde.

1.1.2. Configuration externe

Les ténias coliques ou bandelettes longitudinales sont des épaississements de la couche longitudinale de la musculeuse. Ils sont absents au niveau du rectum.

Les hastrations coliques sont des bosselures transversales séparées par des sillons et situées entre les ténias coliques. Elles disparaissent également au niveau du rectum.

Les appendices omentaux ou épiploïques sont des formations séro-graissées appendues le long de certains ténias coliques, sauf au niveau du caecum. Ces appendices peuvent se creuser d'un diverticule chez le sujet âgé.

1.1.3. Configuration interne

La surface interne du gros intestin est caractérisée par des dépressions séparées par des plis semi-lunaires s'étendant sur un tiers environ de la circonférence de la paroi. Ces plis correspondent aux sillons de la surface externe.

1.1.4. Structure

Le côlon est constitué de quatre tuniques : séreuse, musculeuse, sous-muqueuse et muqueuse.

► *La séreuse*

Formée du péritoine viscéral, elle comprend un mésothélium et une couche sous-séreuse de conjonctif lâche, riche en tissu adipeux au niveau des appendices épiploïques.

► *La musculeuse*

Sa couche externe est constituée de myofibres lisses longitudinales. Cette couche mince s'épaissit par endroits au niveau des ténias coliques en bandelettes longitudinales.

Sa couche interne est constituée de myofibres lisses circulaires.

► *La sous-muqueuse*

Elle est constituée de tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des cellules adipeuses, un plexus nerveux et des follicules lymphatiques solitaires. Ces follicules sont plus nombreux au niveau de l'appendice vermiforme.

► *La muqueuse*

Elle ne présente pas de villosités. Elle est épaisse, soulevée par les crêtes des plis semi-lunaires. Sa surface est parsemée des orifices des cryptes intestinales (voir Figure 1).

Son épithélium est cylindrique simple avec des endocrinocytes gastr-intestinaux. Les cryptes sont riches en cellules caliciformes.

Sa *lamina propria* est un conjonctif lâche, bien vascularisé et innervé.

Sa *musculosa musculosae* est une fine couche de myofibres lisses.

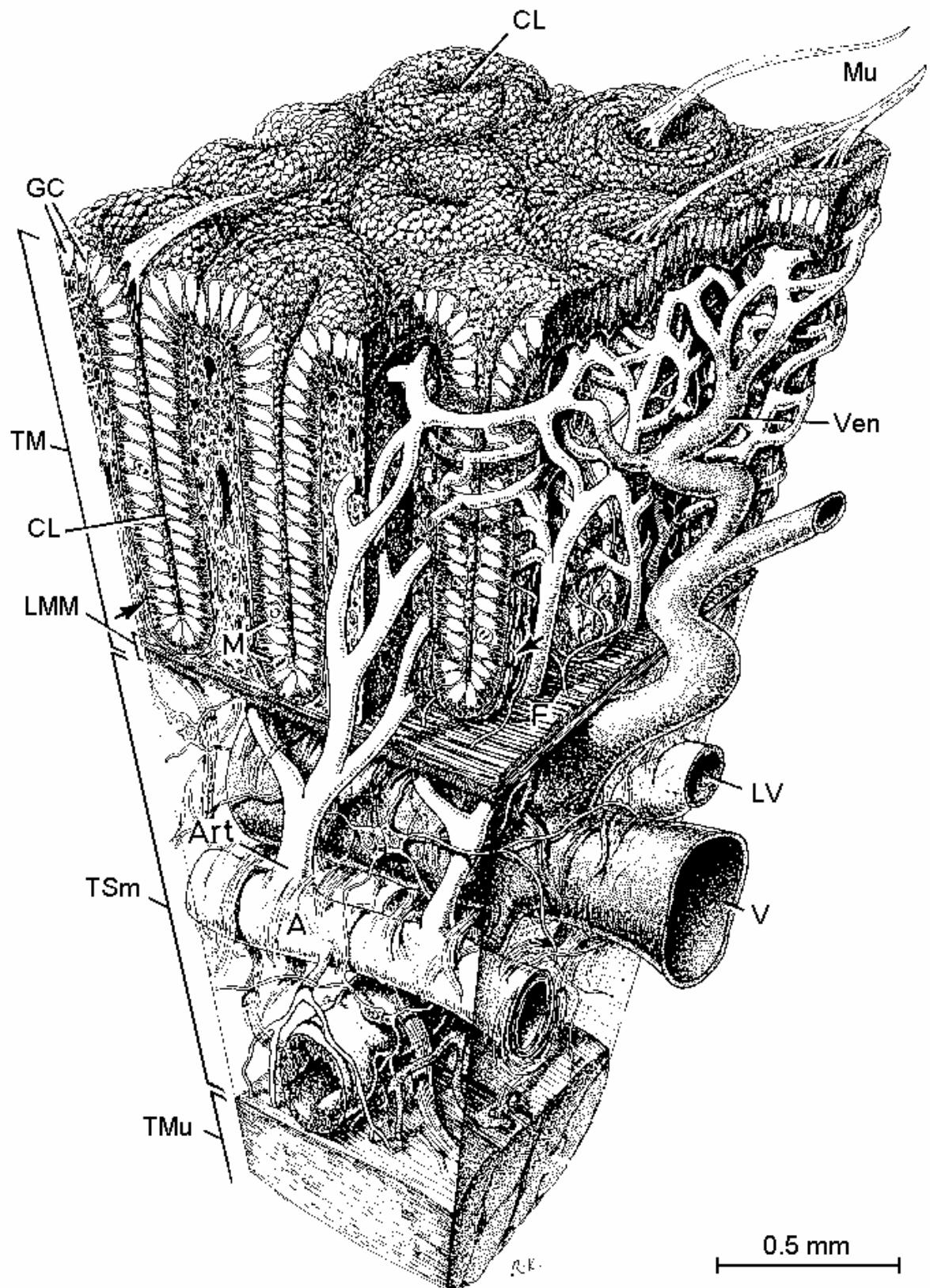


Figure 1 : Vue microscopique en trois dimensions de la muqueuse colique
TM : muqueuse ; TSsm : sous-muqueuse ; TMu : musculeuse ; Mu : mucus ; CL : lumière d'une crypte ;
GC : colonocyte ; M : cellule caliciforme ; A : artère ; Art : artériole ; V : veine ; Ven : veinule ; LV :
vaisseau lymphatique

Source : Krstic 1991 [3]

1.2. Aspects microbiologiques

1.2.1. *Composition de la flore digestive*

La flore digestive constitue un écosystème extrêmement complexe.

Les premières études de la microflore digestive utilisaient la mise en cultures d'échantillons de fèces afin de caractériser les espèces en présence [4]. Ces méthodes reflétaient de façon très imparfaite la composition de la flore. En 2005, Eckburg a étudié l'ARN ribosomal d'échantillons de flores prélevés directement sur la muqueuse, dans différents sites de l'intestin. Il a identifié 395 phylotypes bactériens, dont 80% n'ont jamais été cultivés [5].

Chez un individu en bonne santé, les portions supérieures du tube digestif ont une population microbienne peu importante, constituée essentiellement de bactéries Gram positives. Plus on avance le long du tube digestif, plus la microflore est riche, quantitativement et qualitativement. On trouve à la fois des bactéries aérobies (bactéries des genres *Escherichia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*) et anaérobies (bactéries des genres *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*) [6].

Dans les portions les plus distales du tube digestif, le nombre de bactéries s'élève aux valeurs les plus élevées qu'il puisse atteindre, compte tenu des dimensions moyennes d'une cellule bactérienne : 10^{11} cellules/mL, pour un volume moyen du corps bactérien de quelques μm^3 [7]. Cette abondance préoccupe certains biologistes depuis la naissance même de la microbiologie, d'autant plus que la flore n'est séparée du « milieu intérieur » que par l'unique couche cellulaire de la muqueuse digestive...

1.2.2. *Colonisation du tube digestif*

La colonisation du tube digestif par les micro-organismes a lieu dès les premiers jours de vie. Chez l'Homme, le profil microbien varie selon la durée de la gestation, la voie de naissance (césarienne ou voies naturelles), et l'alimentation du nouveau-né [4].

Le plus grand facteur de variabilité de la composition de la flore intestinale est l'individu lui-même [5]. Chez un individu donné, la flore peut varier selon l'alimentation et l'âge.

1.2.3. *Activités métaboliques de la microflore intestinale*

La microflore digestive est à l'origine de nombreuses réactions chimiques ; toute molécule arrivant dans l'intestin est un substrat potentiel.

► *Synthèse d'acides gras à chaîne courte*

Les acides gras à chaîne courte synthétisés par la fermentation des glucides non digestibles par la flore intestinale représentent 3 à 9% de notre consommation calorique quotidienne [8]. On appelle acides gras à chaîne courte l'acétate, le propionate et le butyrate. Selon le substrat fermenté, l'acétate représente 60 à 80% des acides gras à chaîne courte synthétisés, le propionate 14 à 22%, et le butyrate 8 à 23% [9].

Bien que le butyrate soit en proportion moins importante que les autres acides gras à chaîne courte, c'est celui qui a le plus d'importance pour la physiologie de l'hôte. En plus des effets

trophiques sur la muqueuse, qu'il partage avec l'acéate et le propionate, le butyrate est une source d'énergie importante pour les colonocytes, et il régule la différentiation cellulaire [9].

► *Réactions d'hydrolyses : glycosidases*

Les glycosides sont composés d'un groupement aglycone lié à un sucre. Leur origine est principalement alimentaire et hépatique. Certains composés sont conjugués avec un glucose dans le foie pour les détoxifier, ce qui donne un glucuronide. Ces molécules sont ensuite excrétées dans l'intestin. L'hydrolyse de la liaison β -glucuronide par la microflore intestinale libère l'aglycone biologiquement actif, potentiellement cancérogène [4].

► *Réductases*

• Azoréductases

L'hydrolyse d'une liaison azo- par les azoréductases de bactéries coliques libère des amines aromatiques substituées, dont un grand nombre est cancérogène. Ces hydrolyses peuvent toutefois être mises à profit pour activer des médicaments dans le gros intestin, tout en empêchant leur absorption dans les portions antérieures du tube digestif [4].

• Nitroréductases

La réduction d'un groupement nitro- produit elle aussi des amines aromatiques. En outre, cette réaction complexe implique la production de composés intermédiaires potentiellement génotoxiques [4].

► *Autres réactions bactériennes*

• Amines

Les bactéries peuvent désaminer les acides aminés ou l'urée suivant plusieurs voies. Elles peuvent également estérifier des acides aminés ou l'histamine, ce qui leur permet d'inactiver certains antibiotiques. Elles sont capables de supprimer un groupement alkyl ou d'ajouter un groupement nitroso- aux amines secondaires (formation de nitrosamines) [4].

• Déshydroxylation

Les acides biliaires primaires sont conjugués à la taurine ou à la glycine avant d'être excrétés dans l'intestin grêle. Les bactéries peuvent hydrolyser ces conjugués. La majorité des acides biliaires primaires subissent également une déshydroxylation du noyau stéroïde [4].

1.2.4. *Interactions entre la flore intestinale et l'hôte*

Les interactions entre l'hôte et sa flore digestible sont extrêmement complexes, et commencent juste à être élucidées [10].

Les échanges entre la flore et l'intestin se produisent dans les deux sens. La flore intestinale dans son ensemble exerce une telle activité métabolique que certains vont jusqu'à la comparer à « un organe dans un organe » [6]. Les rôles de la flore sont résumés dans la Figure 2.

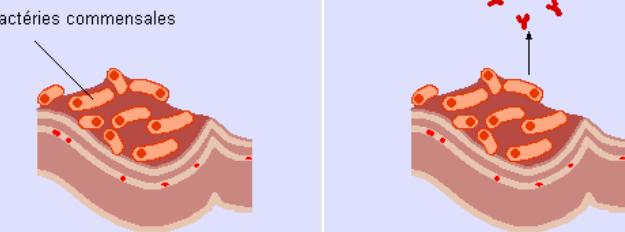
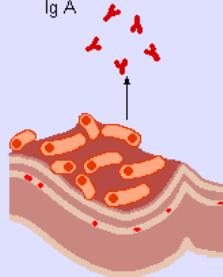
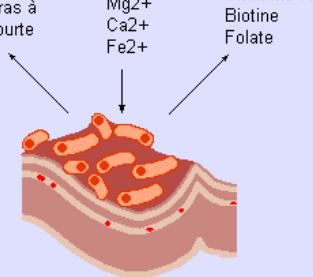
Fonctions protectrices	Fonctions structurelles	Fonctions métaboliques
<p>Déplacement des pathogènes Compétition pour les nutriments Compétition pour les récepteurs Productions de facteurs anti-microbiens (bactériocines, acide lactique)</p> <p>Bactéries commensales</p> 	<p>Induction des Ig A Renforcement apical des jonctions serrées Développement du système immunitaire</p> 	<p>Contrôle de la différentiation et de la prolifération des entérocytes Métabolisation des carcinogènes Synthèse de vitamines (biotine, folate) Fermentation des résidus non digestibles Absorption des ions Récupération de l'énergie</p> <p>Acides gras à chaîne courte Mg²⁺ Ca²⁺ Fe²⁺</p> 

Figure 2 : Fonctions de la flore intestinale : la flore commensale exerce une variété d'effets protecteurs, structurels et métaboliques sur la muqueuse intestinale.

Source : O'Hara, 2005 [6]

2. Le cancer du côlon

2.1. Epidémiologie

Les cancers du côlon et du rectum arrivent en troisième position parmi tous les cancers, en terme d'incidence. Environ un million de nouveaux cas ont été enregistrés au niveau mondial en 2002, soit 9% de la totalité des cancers. La mortalité est environ de 50%, soit 530 000 morts en 2002 [11].

Le cancer colorectal est beaucoup plus fréquent dans les pays industrialisés que dans les pays à revenus modérés ou faibles. L'incidence dans les pays à risque élevé (Etats-Unis, Australie, Nouvelle-Zélande, Europe occidentale) est 25 fois supérieure à celle des pays à risque faible (Afrique, Asie). De plus, les émigrants originaires d'un pays pauvre acquièrent en une génération un taux de cancer colorectal qui se rapproche de celui des habitants de leur pays d'accueil. Ces faits suggèrent que le mode de vie, l'environnement, et l'alimentation ont un impact important sur le risque de cancer [11].

Le sex ratio des cancers du caecum, côlon ascendant et côlon transverse est voisin de 1 dans tous les groupes d'âge. Par contre, on constate une prédominance masculine pour les cancers du côlon descendant et du côlon sigmoïde à partir de 65 ans [12].

L'incidence des cancers augmente de manière plus importante avec l'âge pour les cancers du côlon droit que pour ceux du côlon gauche [12].

2.2. Rappels généraux sur la cancérogenèse

Le terme « cancer » regroupe une grande diversité de maladies. L'origine de tous les cancers est une altération de l'ADN, la molécule porteuse de l'information génétique, qui se traduit par un comportement anormal des cellules. Cependant, la plupart des cancers ne sont pas héréditaires.

2.2.1. *L'origine clonale du cancer*

Une cellule tumorale possède différentes caractéristiques phénotypiques qui la différencient des cellules saines. Ces caractéristiques résultent de l'accumulation d'altérations génotypiques sur plusieurs générations de cellules.

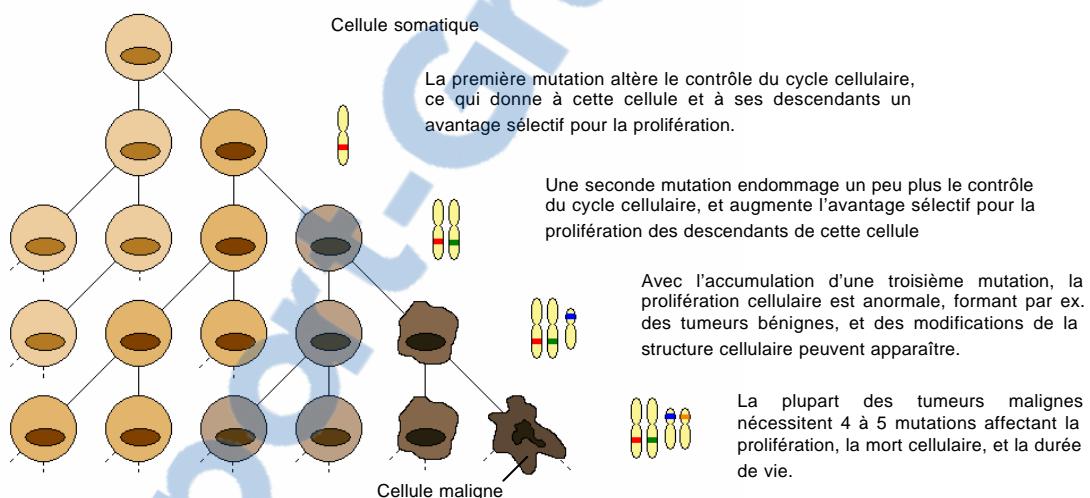


Figure 3 : Origine clonale du cancer.

Le cancer est le résultat d'une accumulation de mutations dans une lignée de cellules somatiques du corps. A partir d'une cellule normale, les mutations se produisent naturellement de manière aléatoire, ou suite à des facteurs promoteurs de l'environnement (radiations, produits chimiques) et s'accumulent jusqu'à provoquer le cancer.

Source : Cunningham, 2007 [13].

Les 6 modifications fondamentales de la physiologie cellulaire qui dictent le phénotype malin sont [14] :

- l'autosuffisance pour les signaux de croissance,
- la perte de la sensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance,
- l'échappement à l'apoptose,
- un potentiel de réplication illimité,
- une capacité d'angiogenèse tumorale,
- une capacité d'infiltration et de métastase.

2.2.2. Evolution du cancer : phases d'initiation, de promotion et de progression

La cancérogenèse est un processus multiphasique très complexe, qui se déroule sur une longue durée.

Un modèle extrêmement simplifié de la cancérogenèse la divise en trois étapes : initiation, promotion, et progression [15].

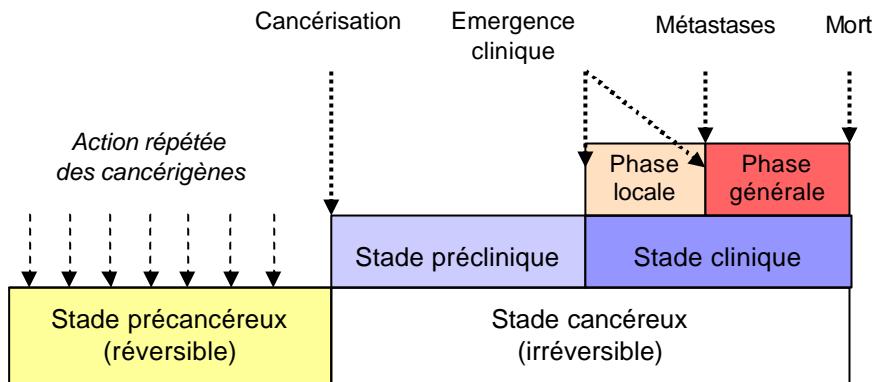


Figure 4 : Schéma général de l'évolution d'un cancer
Source Raymond-Letron 2005 [14]

► Initiation

Lors de la phase d'initiation, les cellules acquièrent des altérations génétiques stables et transmissibles. Ces mutations peuvent être spontanées, ou induites par des agents carcinogènes physiques (radiations, traumatismes), chimiques (hydrocarbures polycycliques, toxiques végétaux,...) ou biologiques (virus).

Les cellules initiées le sont de façon irréversible.

► Promotion

Les cellules initiées peuvent persister dans l'organisme pendant de longues périodes, sans exprimer leurs potentialités oncogènes. La phase de promotion recouvre l'ensemble des mécanismes épigénétiques qui permettent le passage de cet état quiescent à l'expansion clonale des cellules initiées. Elle a toujours lieu après la phase d'initiation, mais un même agent peut être à la fois initiateur et promoteur.

Contrairement à l'initiation, la phase de promotion est réversible, au moins dans ses premiers stades.

► Progression et invasion

L'initiation et la promotion sont inapparentes cliniquement. La phase de progression aboutit à l'émergence clinique de la tumeur. Elle met en jeu, à nouveau, des mutations génétiques.

Lors de la phase d'invasion, des cellules tumorales se disséminent dans l'organisme par voie sanguine ou lymphatique, et forment des métastases à distance. Le malade meurt rarement de la tumeur primaire ; ce sont généralement les métastases qui conduisent à la mort.

2.3. Pathogénie du cancer colorectal

Environ 95% des cancers colorectaux sont des adénocarcinomes peu, moyennement ou bien différenciés. Les autres types de tumeurs rencontrés (mélanomes, carcinoïdes, sarcomes, lymphomes) ont une étiologie, un pronostic et une prise en charge différents [16]. Nous ne nous intéresserons dans la suite de cette thèse qu'aux adénocarcinomes.

2.3.1. *Aspects morphologiques et histologiques*

La majorité des adénocarcinomes du côlon chez l'Homme se développent à partir de lésions appelées « cryptes aberrantes » et d'adénomes (Figure 5). Les adénomes coliques sont des lésions bénignes que l'on rencontre fréquemment chez des individus en bonne santé.

Les facteurs qui influencent le risque de transformation maligne des adénomes sont leur taille, leur nombre, leur degré de dysplasie et la présence d'un comportement villeux. On estime à 10% la proportion d'adénomes qui atteignent un diamètre de 1 cm, et à 25% la proportion de ces gros adénomes qui se transformeront en adénocarcinomes. La durée de la séquence adénome-cancer est estimée à 9 ans pour un adénome macroscopiquement visible [12].

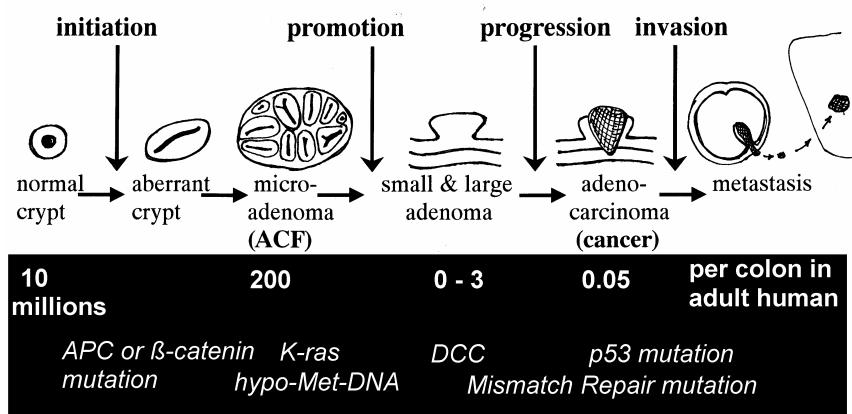


Figure 5 : Evolution multiphasique d'une crypte normale en adénocarcinome, et mutations associées à chaque étape

Source : Corpet [17]

Cependant, selon les pays, l'estimation de la proportion de cancers issus d'un adénome est très différente : 80% en France, 20% au Japon. Estimer le nombre de cancers issus d'un adénome dégénéré n'est certes pas facile, mais une telle différence n'est sans doute pas uniquement liée à des différences méthodologiques. Peut être existe-t-il deux sortes de cancers [12] :

- des cancers de type végétant, qui pour la plupart suivraient la filiation adénome-cancer, et seraient plus fréquents dans les pays à haut risque,
- des cancers infiltrants, principalement les cancers non précédés d'un adénome macroscopiquement détectable et appelés cancers *de novo*. Ils seraient les plus fréquents dans les régions à faible risque de cancer colorectal.

2.3.2. *Aspects moléculaires et génétiques*

La plupart des adénocarcinomes colorectaux sont d'origine sporadique. Toutefois, 5 à 10% sont la conséquence d'une anomalie héréditaire [11]. Les deux principales affections héréditaires responsables de cancer du côlon sont la polyposis recto-colique familiale (Familial Adenomatous Polyposis : FAP) et le syndrome de Lynch ou cancer héréditaire du côlon sans polyposis (en anglais, Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer : HNPCC). L'étude de ces deux affections a permis d'identifier le déterminisme génétique du cancer colorectal.

Les altérations génétiques que l'on retrouve dans les tumeurs colorectales varient selon leur localisation [12]. Dans 80% des cas de cancers du côlon gauche, elles font partie du groupe des tumeurs LOH+ (Loss Of Heterozygosity), et se traduisent par des pertes alléliques sur les chromosomes 17 et 18, et une hyperploïdie. Dans les cancers du côlon droit, on rencontre 40% de tumeurs LOH+, et un tiers d'erreurs de réplication des loci microsatellites (MSI+).

Vogelstein et Fearon ont proposé un modèle génétique de la cancérogenèse colorectale [18,19]. Les mutations qui permettent de passer d'un stade à un autre de la cancérogenèse sont détaillées (en italiques) dans la Figure 5, p.27. L'accumulation de ces mutations est indispensable pour que le phénotype malin soit exprimé. L'ordre dans lequel elles apparaissent est sans doute moins important [18].

2.4. Facteurs de risque

2.4.1. *Age*

Les cancers du côlon sporadiques sont rares avant l'âge de 50 ans, avec une prévalence maximale autour de 65 ans. En France, en 2000, l'âge médian lors du diagnostic était de 72 ans pour les hommes, et 75 ans pour les femmes [20]. Cependant, les personnes atteintes de FAP ou de HNPCC peuvent développer un cancer colorectal avant l'âge de 40 ans.

2.4.2. *Hérédité*

En dehors du cas des affections héréditaires (FAP et HNPCC), il existe un risque accru de cancer colorectal au sein des familles dans lesquelles une personne a déjà développé un tel cancer [11].

2.4.3. *Sexe*

Les hommes sont légèrement plus touchés que les femmes, avec un sex-ratio de 1,6 [20]. C'est le troisième cancer le plus fréquent chez les hommes, et le deuxième chez les femmes (après le cancer du poumon et de la prostate chez l'homme, et le cancer du sein chez la femme) [20].

2.4.4. Mode de vie

Le rapport du World Cancer Research Fund (WCRF) paru en Novembre 2007 [11] est la synthèse de nombreuses études sur le rôle de l'alimentation, de la nutrition et de l'activité physique pour la prévention des cancers. Selon les experts qui ont rédigé ce rapport, l'activité physique est un facteur de protection avéré contre le cancer colorectal, tandis que l'excès de poids, la consommation de viande rouge et d'alcool sont des facteurs de risque.

Poids des arguments	Diminue le risque	Augmente le risque
Convaincant	Activité physique	Viande rouge Viande transformée Boissons alcoolisées (hommes) Surpoids Graisse abdominale Taille adulte
Probable	Aliments riches en fibres Ail Lait Calcium	Boissons alcoolisées (femmes)
Limité, suggestif	Légumes Fruits Aliments contenant des folates Aliments contenant du sélénium Poisson Aliments contenant de la vitamine D Sélénium	Aliments contenant du fer Fromage Aliments contenant des graisses animales Aliments contenant des sucres
Limité, pas de conclusion	Céréales et sous produits, pommes de terre, volaille, coquillages et autres fruits de mer, autres produits laitiers, composition en acides gras, cholestérol, sucre (sucrose), café, thé, consommation totale de glucides, amidon, vitamine A, rétinol, vitamine C, vitamine E, multivitamines, sources de calcium non laitières, méthionine, β -carotène, α -carotène, lycopène, fréquence des repas, consommation d'énergie.	

Tableau 1 : Facteurs promoteurs et inhibiteurs du cancer colorectal

Source : *World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, 2007 [11]*.

2.4.5. Autres affections

Une inflammation chronique du côlon, dans le cas de colite ulcérate ou de maladie de Crohn notamment, est un facteur prédisposant au cancer colorectal [11].

2.5. Rôle de la flore digestive dans l'initiation ou la promotion du cancer du côlon

2.5.1. *Flore commensale et inflammation*

Des souris knockout pour le gène IL-10, ou double knockout pour les gènes *Tgfb-1* et *Rag2*, *TCRb* et *p53*, ou *Gpx1* et *Gpx2*, sont utilisées pour l'étude des maladies inflammatoires du côlon. Lorsque ces souris sont élevées dans des conditions stériles, l'inflammation du côlon est réduite de façon significative, et aucune tumeur n'est observable. Les mêmes souris associées à une flore normale développent des tumeurs [21].

Les souris Min sont un autre modèle utilisé pour l'étude du cancer colorectal (voir 2.9.3. Etudes chez l'animal p.34). L'inflammation intestinale des souris Min est réduite par rapport aux animaux cités dans le paragraphe précédent. Cependant, les souris Min axéniques développent moitié moins de petits adénomes que les souris Min à flore normale : la flore intestinale a donc un rôle promoteur du cancer, même chez des animaux capables de réguler normalement l'inflammation [21].

L'inflammation provoquée par la flore est variable suivant les espèces bactériennes [21].

2.5.2. *Métabolisme et synthèse de carcinogènes par les bactéries commensales*

En 1975, Reddy a démontré que la flore microbienne jouait un rôle crucial dans la cancérogenèse. Un groupe de rats axéniques et un groupe de rats à flore normale ont reçu des injections de DMH. Seuls 20% des rats axéniques ont développé des tumeurs colorectales, contre 93% des rats normaux. L'instillation par voie rectale d'AOM, le principal métabolite du DMH, a augmenté de façon importante le nombre de tumeurs chez les rats axéniques [22]. Les différentes réactions métaboliques décrites au paragraphe 1.2.3. p.22 peuvent participer à l'activation de procarcinogènes.

Le métabolisme de la flore intestinale produit de nombreuses espèces chimiques réactives, notamment des radicaux libres comme le superoxyde. Pour l'instant, aucune étude n'a pu prouver l'existence d'un lien entre le cancer du côlon et les bactéries synthétisant du superoxyde [21].

Les bactéries sulfo-réductrices font partie de la flore intestinale habituelle. Ces bactéries produisent de l' H_2S . La production de sulfure est liée à la cancérogenèse, car il augmente la prolifération cellulaire, inhibe le métabolisme du butyrate par les colonocytes, et active certaines voies de transduction cellulaire défavorables [8]. Plus les bactéries sulfo-réductrices sont nombreuses, moins les bactéries méthanogènes le sont. Environ 50% des Européens et des Américains, et 90% des Noirs Africains d'origine rurale excrètent principalement du méthane, et hébergent vraisemblablement peu de bactéries sulfo-réductrices. Cette répartition est corrélée négativement aux prédispositions pour le cancer colorectal [21].

2.5.3. *Biotransformation des acides biliaires*

Cinq pour cent des acides biliaires excrétés, soit 400 à 800 mg par jour, échappent au cycle entéro-hépatique dans l'intestin grêle, et poursuivent leur chemin dans le gros intestin. L'étude de la composition en acides biliaires de la bile et des selles d'un même individu montre que les acides biliaires primaires subissent de nombreuses biotransformations lors de leur passage dans l'intestin [8]. La flore digestive est la seule responsable de la synthèse d'acides biliaires secondaires ; ces derniers sont produits par la déconjugaison et l'hydroxylation des acides biliaires primaires.

La métabolisation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires joue certainement plusieurs rôles pour la microflore, notamment la fourniture d'énergie, et l'élimination de composés toxiques pour les bactéries (les acides biliaires secondaires se lient plus facilement aux fibres, et sont alors évacués avec ces dernières). Les produits de ces réactions sont souvent toxiques pour l'hôte.

Les acides biliaires secondaires peuvent provoquer l'apoptose des colonocytes, et de fortes concentrations en DCA (acide déoxycholique) ou LCA (acide lithocholique) pourraient exercer une pression de sélection favorable à l'émergence de cellules épithéliales mutantes résistantes à l'apoptose. Le DCA intervient également dans l'activation de voies de transduction dont le rôle dans la cancérogenèse est connu, comme la voie β -caténine [8,23] ; ou l'inhibition de l'activité de la protéine p53 [24].

2.6. Diagnostic du cancer colorectal

Les tumeurs colorectales restent longtemps asymptomatiques.

Les signes cliniques peuvent être uniquement digestifs : rectorragies, troubles du transit, douleurs abdominales. Une anémie ferriprive peut être détectée à l'occasion d'un bilan systématique, ou recherchée à l'occasion de signes cliniques d'anémie ; elle est souvent associée à une tumeur du côlon droit. Un amaigrissement et une dégradation de l'état général sont des signes tardifs [16].

La tumeur est parfois décelée à cause de complications : occlusion, péritonite par perforation. Le diagnostic de certitude repose toujours sur une coloscopie complète.

Remarque : Dépistage de masse [25]

L'objectif du dépistage de masse d'un cancer est de diminuer la mortalité liée à ce cancer en détectant chez les individus apparemment sains le cancer ou une lésion précancéreuse à un stade curable. Pour que ce dépistage soit utile, le cancer concerné doit être fréquent, grave, curable à un stade précoce, et un test de dépistage doit exister.

Le cancer du côlon répond à ces conditions. Le test utilisé est l'Hémoccult II, qui permet de détecter la présence de sang occulte dans les selles. Ce test rapide, non invasif et non douloureux devrait être réalisé par tous, tous les 3 à 5 ans à partir de 50 ans.

2.7. Classification des tumeurs colorectales et pronostic

La classification des tumeurs en fonction de leur extension aux tissus avoisinants est un outil précieux pour déterminer le traitement le plus approprié à chaque cas, et pour établir un pronostic. Elle tient compte du degré d'infiltration de la tumeur au niveau local, de son extension aux nœuds lymphatiques, et de l'existence de métastases. La classification de la gravité des cancers colorectaux utilise la classification de Dukes, ou le système TNM (Tumeur, Nœud lymphatique, Métastase). Le grade de la tumeur ne peut être identifié qu'après une analyse anatomo-pathologique de la tumeur réséquée et des nœuds lymphatiques prélevés (au minimum 8), en complément de techniques d'imagerie pour évaluer l'extension à distance [16].

En présence d'un traitement approprié, le taux de survie à 5 ans est supérieur à 85% si l'extension de la tumeur est limitée, mais dès que les nœuds lymphatiques sont atteints, ce taux se rapproche de 30% [16].

2.8. Traitements

Le traitement du cancer du côlon est avant tout chirurgical. L'étendue de la résection dépend des résultats de l'analyse anatomo-pathologique. Dans le cas de polypes adénomateux, l'exérèse par voie endoscopique peut suffire. Dans les cas plus avancés, il est indispensable d'enlever un segment de côlon et les nœuds lymphatiques en rapport pour que la chirurgie soit efficace : 5 cm de côlon de part et d'autre du cancer, et au moins 8 ganglions, de préférence 12 [16].

En présence de métastases ganglionnaires, on complète la chirurgie par une chimiothérapie. La radiothérapie est indiquée lorsque l'exérèse n'a pu être totale (cancers du rectum, envahissement des tissus avoisinants).

Les métastases hépatiques et pulmonaires sont réséquées lorsque cela est possible. Dans le cas contraire, la cryoablation, l'ablation par radiofréquences ou la chimiothérapie sont envisageables.

2.9. Etudes de chimioprévention du cancer du côlon

Le cancer du côlon est donc, nous l'avons vu, une maladie grave. Cependant, il est possible d'agir sur certains facteurs de risques, notamment sur l'alimentation. Les études qui visent à définir le rôle protecteur ou promoteur d'une substance à l'égard du cancer du côlon sont appelées études de chimioprévention. Il en existe différents types.

2.9.1. Etudes épidémiologiques

Le rôle majeur de l'environnement dans la promotion ou l'inhibition du cancer du côlon a tout d'abord été envisagé à la suite d'études épidémiologiques descriptives, qui montraient des incidences très différentes selon le niveau de vie des pays.

Les études écologiques sont conçues afin d'explorer les relations entre les facteurs environnementaux et la maladie dans une population donnée. Par exemple, la teneur en matières grasses de la ration alimentaire est corrélée avec le risque de développer un cancer du côlon.

L'étude des immigrés consiste à comparer l'incidence des cancers des première et deuxième générations d'immigrants dans un pays d'accueil, avec celle du pays d'origine. Ce type d'études a permis de montrer que les facteurs environnementaux étaient plus importants que les facteurs génétiques pour expliquer les différences d'incidence entre les pays.

Les études cas-témoin et études de cohortes sont d'autres types d'études épidémiologiques qui comparent des individus issus d'une même population.

Les études cas-témoin sont des études rétrospectives : elles recherchent les différences entre un groupe de patients atteints de la maladie, et un groupe contrôle d'individus sains, une fois que le diagnostic de la maladie a été établi.

Les études de cohorte sont des études prospectives : elles consistent à suivre un groupe d'individus apparemment sains, en notant leurs différences. Au bout d'une certaine durée, certains individus auront développé un cancer, d'autres pas : les différences entre ces deux groupes seront alors recherchées parmi les commémoratifs.

L'avantage des études cas-témoin est que ces études sont plus rapides, et nécessitent de suivre moins de patients que les études de cohorte. Elles sont par conséquent moins coûteuses. Cependant, le choix des individus du groupe contrôle est une source de biais importante. Les études de cohorte sont plus coûteuses, car elles doivent inclure un grand nombre de participants, et durent plusieurs années. Le biais de sélection du groupe contrôle n'existe pas pour ces études.

Ces observations épidémiologiques ne démontrent pas un lien de causalité entre un facteur environnemental donné et le cancer, mais elles permettent d'émettre des hypothèses qui seront vérifiées expérimentalement *in vitro*, chez l'animal, et éventuellement chez l'Homme.

2.9.2. Etudes *in vitro*

Ces expériences étudient l'action d'un composé donné sur des cellules en culture.

L'emploi de cellules bactériennes permet de déterminer la cytotoxicité, la génotoxicité ou la mutagénicité de certains composés (exemple : études sur *Salmonella typhimurium*).

Afin d'étudier les mécanismes de la cancérogenèse et la chimioprévention *in vitro*, l'idéal serait de pouvoir recréer les interactions entre les différents types cellulaires et la matrice extracellulaire. Le modèle qui s'approche le plus de ces conditions est la culture d'organes ou

de tissus humains ou animaux. L'obtention d'organes humains pose néanmoins des problèmes éthiques, et leur culture est délicate [26].

L'utilisation de cultures cellulaires d'origine humaine ou animale permet d'évaluer le comportement d'entérocytes sains ou tumoraux (lignée Caco-2 par exemple) en présence du composé étudié : mutations, apoptose, modification du métabolisme cellulaire,... Les différents modèles, judicieusement choisis, peuvent permettre d'expliquer le stade auquel agit le composé testé, et son mode d'action [26].

2.9.3. *Etudes chez l'animal*

► *Historique*

Le premier modèle expérimental de cancérogenèse est apparu en 1915 au Japon ; des chercheurs ont réussi à induire des carcinomes sur les oreilles de lapins qu'ils avaient badigeonnées de goudron [27].

Le côlon est le premier organe du tube digestif pour lequel a été découvert un modèle animal de cancérogenèse. Les premiers cancérigènes utilisés étaient des dérivés de l'aminobiphenyl (Walpoleet en 1952). En 1963, Laqueur a découvert les propriétés cancérigènes des noix de cycas qui contiennent des précurseurs du diméthylhydrazine (DMH) [27].

► *Les différents modèles animaux*

- Modèle utilisant l'AOM ou le DMH

Aujourd'hui, le modèle animal le plus exploité dans les études de chimioprévention du cancer du côlon utilise des dérivés du 1,2-diméthylhydrazine (DMH) et de son métabolite, le méthylazoxyméthanol (AOM) [28]. Dans la plupart des études, ils sont injectés à des rats, plus rarement à des souris.

Les tumeurs induites par le DMH ou l'AOM chez le rat présentent des caractéristiques histopathologiques et génétiques proches de celles que l'on rencontre chez l'homme. Les mutations des gènes *k-ras* et *b-caténine* sont fréquentes, tout comme l'instabilité des microsatellites. Cependant, la mutation du gène *Apc* est rare, et celle du gène *p53* inexiste [29].

- Modèles utilisant les amines aromatiques

Les amines aromatiques hétérocycliques (HAA) se forment lors de la cuisson des muscles (viandes et poissons). Ce sont donc des carcinogènes auxquels sont exposés naturellement les humains. Une vingtaine de sortes d'amines aromatiques hétérocycliques sont connues, et cinq au moins provoquent des carcinomes dans le côlon de rats mâles F344 (PhIP, IQ, MeIQ, Glu-P-1 et Glu-P-2). Par contre, les femelles F344 ne développent pas de tumeur du côlon, mais des tumeurs mammaires. Selon les lignées de rat, le nombre de foyers de cryptes aberrantes varie pour une même exposition au PhIP [30]. Les mutations observées dans les tumeurs coliques induites par le PhIP concernent les gènes *Apc* et *b-caténine*, mais pas les gènes *k-ras* ou *p53* [27].

- Souris transgéniques ou souris Min

Un certain nombre de lignées de souris porteuses d'une mutation du gène *Apc* ont été développées. Ces souris développent spontanément des tumeurs dans leur tube digestif, habituellement dès leurs premiers mois de vie. Cependant, les tumeurs sont plutôt distribuées dans l'intestin grêle que dans le gros intestin. Selon la localisation de la mutation sur le gène, le nombre moyen d'adénomes ou de tumeurs observés diffère.

Leur nom, « souris Min », est dérivé de l'acronyme pour « Multiple Intestinal Neoplasia ».

- Critères de jugement utilisés dans les modèles animaux

L'apparition de tumeurs et leur analyse histologique est un critère de jugement largement utilisé dans les études de chimioprévention, et cela semble parfaitement logique.

Un second critère de jugement est également très utilisé : il s'agit des foyers de cryptes aberrantes, ou ACF. Ces lésions sont observées chez les rats qui ont reçu des injections de carcinogène et chez les humains qui ont un risque élevé de cancer du côlon. Elles sont supposées être des lésions préneoplasiques [31].

Les cryptes aberrantes sont identifiées par l'observation microscopique des côlons colorés au bleu de méthylène. Un ACF comprend plus de deux cryptes aberrantes. Les cryptes aberrantes sont deux à trois fois plus grandes que les cryptes normales, avec une lumière en forme de fente, et les cellules épithéliales, plus grandes, prennent mieux la coloration que celles des cryptes normales.



Photo 1 : Foyer de cryptes aberrantes

Source : Corpet, Chemoprevention database [17]

Les ACF présentent plusieurs avantages par rapport aux tumeurs [17]:

- ils mettent beaucoup moins de temps à se développer (15 jours environ, ce qui permet de terminer une expérience en 3 mois, contre 5 à 8 mois pour les tumeurs),
- les tumeurs doivent être analysées histologiquement, tandis que l'observation microscopique après coloration au bleu de méthylène suffit pour identifier les ACF,
- chaque rat a au minimum 50 ACF, tandis qu'il a au maximum 4 ou 5 tumeurs, donc les informations sur les effets des molécules testées sont plus nombreuses, et statistiquement mieux exploitables.

2.9.4. *Etudes d'intervention [12]*

Les études d'intervention reposent sur les hypothèses formulées grâce aux études épidémiologiques et aux études sur modèle animal. Leur objectif est d'évaluer l'effet d'une modification de l'alimentation (ou de l'adjonction d'un ou plusieurs nutriments suspectés de jouer un rôle protecteur) sur le risque de développement d'une tumeur colorectale.

Le critère de jugement de l'efficacité est rarement le cancer lui-même, car il faudrait étudier une population très importante (plus de 10 000 personnes) pendant une longue période (environ 10 ans). Ainsi, de nombreuses études évaluent le risque de récidive des adénomes ou des tumeurs colorectales, car quelques centaines de personnes suffisent pour constituer l'échantillon, et la période d'étude est plus courte (2 à 5 ans).

La diminution du risque de l'augmentation de taille d'un adénome est un objectif intéressant pour les études d'intervention. Une étude norvégienne a montré qu'il n'y avait pas de risque à laisser un petit polype de moins de 0,5 cm de diamètre pendant 2 ou 3 ans dans l'intestin. A l'issue de la durée de l'étude, le polype est mesuré et réséqué. Cette technique est néanmoins difficile à faire accepter aux cliniciens.

D'autres études d'intervention s'intéressent à la composition des selles : acides biliaires, activité enzymatique, ... Ces études ne nécessitent qu'un nombre restreint de sujets, sur une période d'intervention assez courte (quelques semaines à un an), et qui plus est, les examens ne sont pas invasifs. Cependant, ces études ne sont pas des études d'intervention à proprement parler, car les critères de jugement sont des marqueurs très indirects du risque de cancer. Elles constituent des arguments supplémentaires pour faire de vraies études d'intervention.

Remarque : Le projet SYNCAN [32]

Le projet SYNCAN a été élaboré avec le soutien de la Communauté Européenne pour étudier l'effet des prébiotiques, probiotiques et synbiotiques sur le cancer colorectal, dans trois études concomitantes : une étude *in vitro*, une étude *in vivo* sur des rats injectés avec de l'AOM, et une étude d'intervention en double aveugle chez des patients récemment opérés d'un adénome ou d'un carcinome colique.

Le même prébiotique (Synergy 1, un mélange d'inuline et d'oligofructose), et les mêmes probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* Bb12) ont été utilisés, seuls ou associés l'un à l'autre, dans chacune des trois études.

En bref

1. Le côlon sain héberge une flore digestive complexe. L'hôte et la flore entretiennent une relation de symbiose.
2. Le cancer colorectal est une maladie grave et fréquente dans les pays développés.
3. De nombreux facteurs influent sur le développement du cancer colorectal. Parmi eux, l'alimentation et la flore digestive sont des facteurs clé.
4. Les études *in vivo* chez l'animal sont indispensables en cancérologie, notamment en chimioprévention.

Chapitre II

Prébiotiques, probiotiques et synbiotiques : définitions, utilité, modes d’actions

1. Définitions

1.1. Aliments fonctionnels

On appelle aliment fonctionnel « un aliment qui contient (en concentration adéquate) un composé ou une association de composés qui modifie les fonctions de l’organisme de sorte que l’on observe des effets cellulaires ou physiologiques positifs » [33].

Pour rechercher et développer un aliment fonctionnel, il faut [33] :

- démontrer l’interaction avec une ou plusieurs fonction(s) corporelles
- une compréhension au moins partielle des mécanismes d’action
- établir les effets dans des systèmes biologiques appropriés.
- formuler des hypothèses solides.
- tester ces hypothèses dans des études alimentaires chez l’Homme.

Les aliments fonctionnels incluent notamment les prébiotiques, les probiotiques, et les synbiotiques.

1.2. Prébiotique

Un prébiotique est défini comme « un ingrédient alimentaire non digestible qui produit un effet bénéfique chez l’hôte en stimulant de manière sélective la croissance et/ou l’activité d’une ou plusieurs espèce(s) bactérienne(s) dans le côlon » [33].

1.3. Probiotique

En 1989, Fuller a défini les probiotiques par « suppléments alimentaires constitués de micro-organismes vivants qui influent de façon favorable sur l’animal hôte en améliorant l’équilibre de sa flore intestinale » [34].

Il existe d’autres définitions des probiotiques ; elles reprennent pour la plupart l’image de « bactéries amies » vivantes utilisées pour améliorer de façon non spécifique la santé du consommateur [35].

Les probiotiques doivent être génétiquement stables, et ne doivent pas présenter de danger pour leur hôte. Ils doivent également être capables de résister au passage dans les portions antérieures du tube digestif [36].

La plupart des probiotiques étudiés aujourd’hui font partie du groupe des bactéries lactiques.

1.4. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram positives, en coques ou en bacilles, capables de fermenter les glucides en acide lactique. Elles sont utilisées pour la conservation de nombreux aliments, et sont présentes naturellement dans le tube digestif de l’homme et des animaux. Les caractéristiques des bactéries lactiques sont présentées plus précisément dans le paragraphe 2.1. Bactéries lactiques.

1.5. Synbiotique

Un synbiotique résulte de la combinaison d’un probiotique et d’un prébiotique. L’objectif de cette combinaison est de favoriser la survie et l’implantation du probiotique dans le côlon. Il est par conséquent nécessaire d’adapter le prébiotique au probiotique utilisé afin de lui fournir les conditions les plus favorables possibles.

Remarque. : En anglais, ce mot s’écrit «synbiotic ». Un synbiotique n’est pas une symbiose entre deux organismes, il s’agit d’une synergie entre un prébiotique et un probiotique. C’est pourquoi nous avons choisi d’écrire en français «synbiotique » plutôt que « symbiotique ».

2. Intérêts médicaux des probiotiques et bactéries lactiques

Parmi les différentes bactéries utilisées comme prébiotiques, les bactéries lactiques sont certainement les plus nombreuses. En effet, elles ne sont pas pathogènes et nombre d’entre elles sont présentes naturellement dans le tube digestif de l’homme ou des animaux.

Bien que d’autres micro-organismes (bactéries et levures) puissent être utilisés comme probiotiques, nous ne détaillerons pas leurs particularités.

2.1. Bactéries lactiques

2.1.1. *Caractéristiques générales des bactéries lactiques [37]*

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l’acide lactique a été défini en 1919 par Orla-Jensen. Il réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l’acide lactique.

La fermentation est dite :

- homolactique si l’acide lactique est pratiquement le seul produit formé

- hétérolactique si d'autres composés sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO_2 ,...)

Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, on parle de bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires. Certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de fermentation hétérolactique dans des conditions de croissance non optimales ou selon la nature du sucre utilisé.

Les bactéries lactiques présentent d'autres caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement :

- ce sont des bactéries Gram positives généralement immobiles, jamais sporulées, catalase négatives, oxydase négatives, généralement nitrate-réductases négatives.
- leur capacité de biosynthèse est faible, ce qui explique leur polyauxotrophie pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras. Cela explique aussi leur métabolisme fermentaire : incapables de synthétiser le noyau hème des porphyrines, elles sont normalement dépourvues de cytochrome et en conséquence inaptes à toute respiration aérobie ou anaérobiose.
- ce sont des bactéries anaérobies facultatives : microaérophiles, uniquement capables de fermentation, en aérobiose comme en anaérobiose.

2.1.2. Les différents genres de bactéries lactiques [7,37,38]

Les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance différente. Les quatre genres traditionnels de bactéries lactiques sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (maintenant subdivisé en *Streptococcus* et *Lactococcus*), auxquels a été rajouté le genre *Bifidobacterium*, anciennement classé dans les *Lactobacillus*, mais cependant assez éloigné génétiquement de ces derniers (Figure 6, p.40).

Le rassemblement de ces différents genres dans un même groupe est confirmé par la taxonomie moléculaire : l'analyse de la séquence nucléotidique de leur ARN ribosomique (ARNr) permet de les réunir dans un même grand groupe phylogénique comprenant les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*.

	Cellules		Fermentation	ADN : GC %
	Forme	Arrangement		
<i>Streptococcus</i>	coque	chaînes	homolactique	34-46
<i>Leuconostoc</i>	coque	chaînes	hétérolactique	36-43
<i>Pediococcus</i>	coque	tétrades	homolactique	34-42
<i>Lactobacillus</i>	bacille	chaînes	homolactique hétérolactique	32-53
<i>Bifidobacterium</i>	variée	variée	acétique et lactique	55-67

Tableau 2 : Les différents genres de bactéries lactiques

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel*, 1993 [37]

Le pourcentage en bases G+C (GC %) de leur ADN permet de connaître l'homogénéité des espèces constituant ces genres : ainsi, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, et *Pediococcus* sont assez homogènes, tandis que *Lactobacillus* est caractérisé par l'hétérogénéité de ses espèces. *Bifidobacterium* est intermédiaire.

Les caractéristiques individuelles de ces cinq genres sont détaillées en annexe (Annexe 3).

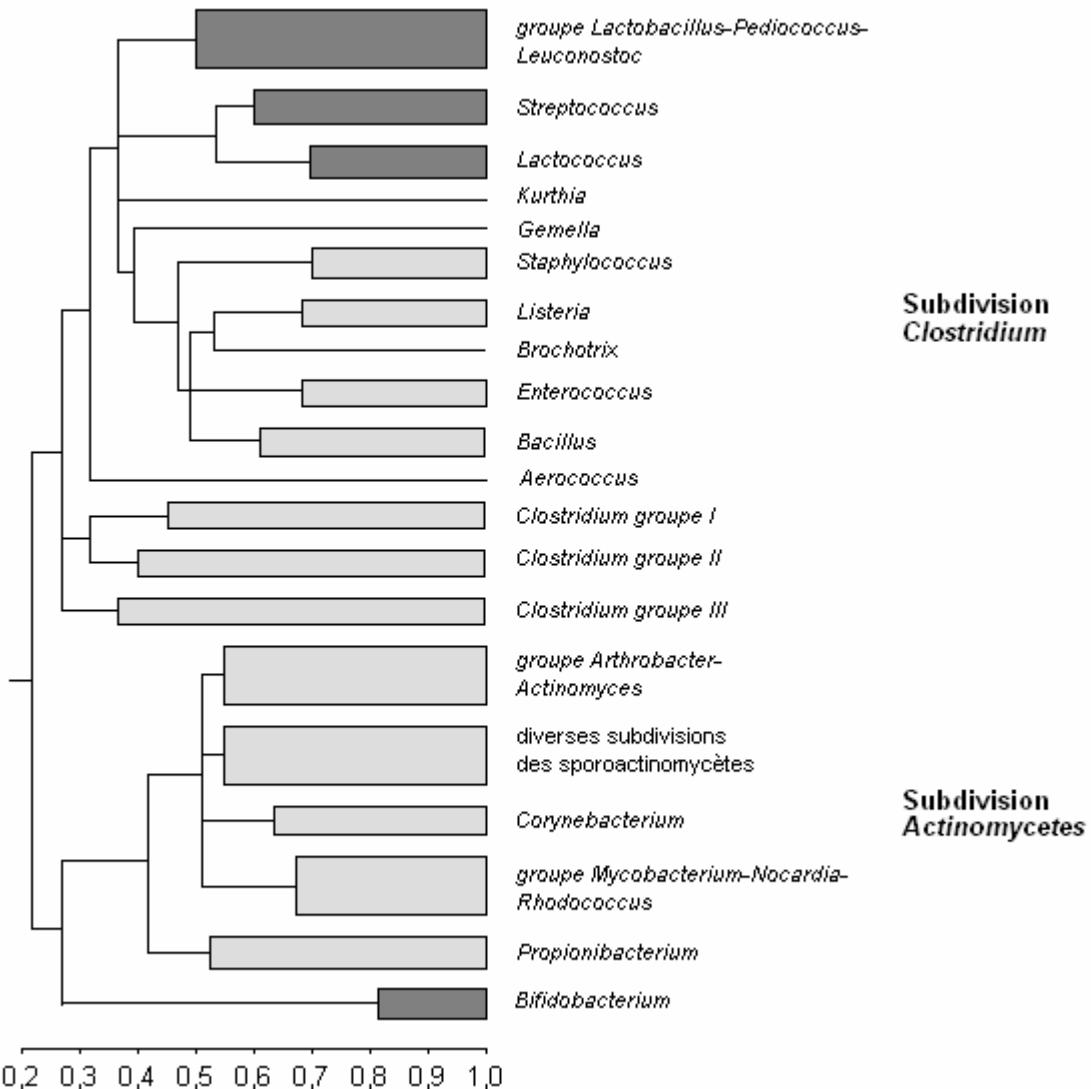


Figure 6 : Dendrogramme construit d'après les valeurs de similitudes S_{AB} de catalogues d'oligonucléotides provenant des ARN ribosomaux 16S.

Ce dendrogramme montre les deux subdivisions du phylum des bactéries à Gram positif. En gris foncé, les genres auxquelles appartiennent les bactéries lactiques.

Source : De Roissart, Bactéries lactiques [7].

2.2. Historique

Les bactéries lactiques font partie de l'alimentation humaine depuis la plus haute antiquité. A cette époque, elles étaient utilisées empiriquement pour conserver les aliments grâce à la fermentation lactique. Elles sont encore utilisées de la sorte de nos jours (voir Annexes 1).

Les propriétés thérapeutiques et prophylactiques des bactéries lactiques ont été décrites plus tardivement.

En France, le yaourt fait son apparition sous François I^r. Celui-ci se trouva guéri d'une infection intestinale après avoir consommé du yaourt apporté de Turquie par un médecin dépêché par le Grand Turc pour l'occasion.

En 1908, Metchnikoff publie ses théories sur l'influence positive des laits fermentés riches en lactobacilles sur la longévité des Bulgares consommant ces produits. Dès 1906, en France, la société «Le Ferment» annonçait la mise en vente d'un lait caillé préparé avec des cultures pures de bactéries lactiques selon un protocole recommandé par Metchnikoff.

Récemment, des laits fermentés incorporant des bactéries lactiques d'origine entérique ont été mis sur le marché, en utilisant les vertus sanitaires de ces bactéries comme argument de marketing [39]. Aujourd'hui, les champs d'application médicaux potentiels des bactéries lactiques s'étendent du traitement de l'hypercholestérolémie au traitement et à la prévention des infections urogénitales, en passant par la protection contre le cancer (notamment du côlon et de la vessie), la protection contre les infections digestives,...

2.3. Utilisation des probiotiques en santé humaine

2.3.1. *Gastroentérologie*

► *Prévention et traitement des diarrhées.*

Les probiotiques ont fait leurs preuves pour le traitement de 4 types de diarrhées : diarrhées à rotavirus, diarrhées associées aux antibiotiques, diarrhée associée à *Clostridium difficile*, et touristes [40].

► *Malabsorption du lactose*

L'absorption du lactose est améliorée lors de l'ingestion de yaourt par rapport au lait, et la concentration de l'air expiré en hydrogène est plus faible [40]. Soit les enzymes endocellulaires des bactéries sont libérées lors du passage dans l'estomac, soit les bactéries survivent au passage dans l'estomac et peuvent digérer le lactose présent dans l'intestin [41].

► *Maladies inflammatoires chroniques du gros intestin*

Les études menées *in vivo* ne démontrent pas clairement une amélioration lors de la prise de probiotiques, mais leur activité anti-inflammatoire pourrait être intéressante pour soigner ces affections [40].

2.3.2. *Affections du tractus urogénital*

Les lactobacilles sont les représentants majoritaires de la flore vaginale, ainsi que de l'urètre et de la région périurétrale des individus en bonne santé. Ils exercent sans doute un rôle pour la prévention des infections uro-génitales similaire à celui qu'ils exercent dans l'intestin : diminution du pH, production d' H_2O_2 et d'agents anti-microbiens, compétition pour les sites d'adhésion à la muqueuse [41].

2.3.3. Action hypocholestérolémiant

Plusieurs observations ont contribué à attribuer cette propriété aux bactéries lactiques. Tout d'abord, une étude épidémiologique de 1974 a attribué la faible cholestérolémie des Masaï, une ethnie africaine d'éleveurs, à leur forte consommation de lait fermenté. Ensuite, une étude expérimentale menée par Eyssen en 1973, qui a utilisé des animaux axéniques pour démontrer le rôle de la flore digestive sur la cholestérolémie (sans pour autant prouver l'effet d'un genre bactérien plus qu'un autre). Enfin, l'observation que certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité d'assimiler le cholestérol (Gilliland 1985). [41]

Cet effet est encore controversé à l'heure actuelle.

2.3.4. Action anticancérigène

L'action anticancérigène est celle qui nous intéresse le plus dans le cadre de ce travail. Cependant, l'action anticancérigène des probiotiques n'est pas limitée au tube digestif : des études menées sur des hamsters [42] ont montré que l'effet inhibiteur s'étend à l'appareil respiratoire supérieur, tandis que d'autres études menées sur des rats ou des souris ont montré une inhibition des tumeurs ascitiques d'Erlich ou Meth-A implantées par injection intrapéritonéale [43,44], ou des rhabdomyosarcomes chimioinduits [45].

Chez l'Homme, l'ingestion de *Lactobacillus casei* ssp. Shirota exerce un effet préventif sur la récidive de cancer de la vessie [46].

2.3.5. Régulation du système immunitaire

La stimulation du système immunitaire joue certainement un rôle majeur dans l'action anticancérigène des probiotiques, tant au niveau local [47], qu'au niveau systémique [45].

2.4. Mécanismes d'action potentiels des probiotiques sur le cancer colorectal : résultats d'études *in vitro*, *in vivo*, et d'études d'intervention

Il est fort probable que les probiotiques n'agissent pas sur la Cancérogenèse à un seul niveau. En effet, plusieurs études ont démontré un effet inhibiteur des probiotiques sur le cancer du côlon chez le rat et la souris, mais également sur le cancer mammaire de la rate [48], le cancer de la trachée chez le hamster, et le cancer de la glande de Zimbal chez le rat [42]. Ces bactéries auraient donc un effet systémique, et non pas uniquement local.

De plus, selon les études expérimentales *in vivo*, l'administration des probiotiques aux rongeurs a lieu avant, pendant ou après les injections de carcinogène. Cela permet de tester l'effet des bactéries sur l'initiation, la promotion ou la progression du cancer. Le fait que l'on observe une inhibition aux différents stades de développement du cancer est un argument en faveur de l'intervention de plusieurs modes d'action [49].

Les capacités des bactéries utilisées comme probiotiques à inhiber le cancer colorectal varient selon la bactérie étudiée (Genre, espèce, souche) ; les mécanismes mis en jeu sont probablement différents selon les probiotiques.

2.4.1. Altérations quantitatives et/ou qualitatives de la microflore intestinale

La consommation de probiotiques provoque des modifications de la microflore intestinale. Ces modifications peuvent être liées à la compétition pour les nutriments, à la modification de facteurs physico-chimiques du milieu, à la synthèse de bactériocines, ou à la synthèse d'enzymes responsables de la lyse de bactéries pathogènes (Paik 2000 cité par Park 2007 [50]). L'adhésion des probiotiques à la muqueuse colique bloque peut être des sites de liaison utilisés par d'autres bactéries, indésirables pour l'hôte [40].

2.4.2. Altération de l'activité métabolique de la microflore intestinale

Chez l'homme comme chez l'animal, la consommation de probiotiques est associée à une diminution des niveaux d'enzymes fécales à l'origine de la production de carcinogènes [51]. Les enzymes concernées sont variables, et les résultats ne sont pas toujours positifs, mais dans la plupart des cas, l'activité des β -glucuronidases et nitroréductases est diminuée.

La consommation quotidienne de 2 verres de lait fermenté par *Lactobacillus acidophilus* réduit de moitié l'activité enzymatique des β -glucuronidases, nitroréductases, et azoréductases fécales chez l'homme [52]. Ces enzymes sont à l'origine de la conversion de procarcinogènes en carcinogènes chez le rat. Cependant, on ne connaît pas bien la nature des carcinogènes qui interviennent dans le déclenchement du cancer du côlon chez l'homme, et rien ne prouve que ce soit ceux produits par ces enzymes [51].

2.4.3. Altération des conditions physico-chimiques du côlon

► Modification du pH cœcal

Les bactéries lactiques utilisent comme source d'énergie la fermentation de fibres et de polysaccharides non digestibles. Les produits de cette fermentation, les acides gras à chaîne courte, sont responsables d'une diminution du pH intestinal.

Constatant que les populations à risque élevé de cancer du côlon avaient un pH fécal plus élevé que les populations à risque faible, Samelson [53] a étudié la diminution du nombre de tumeurs induites par le DMH chez des rats auxquels il a administré du lactulose ou du sulfate de sodium. Les animaux traités avaient un pH fécal plus bas et moins de tumeurs que les rats témoins. Cependant, les interactions entre les produits administrés, la muqueuse colique et la flore intestinale n'ont pas été étudiées.

La protection conférée par un pH caecal acide serait liée à l'inhibition du métabolisme des acides biliaires primaires, ou la stimulation de la production de mucus protecteur.

► Modification de la composition chimique du contenu cœcal

• Acides biliaires

Nous avons vu le rôle capital que jouait la flore endogène dans la synthèse d'acides biliaires secondaires, et l'importance de ces derniers dans la cancérogenèse (2.5.3).

Biotransformation des acides biliaires p.31). Des études *in vitro* ont démontré l'aptitude de certaines espèces de bactéries lactiques à emmagasiner l'acide cholique (acide biliaire primaire) dans leur cytoplasme, ce qui évite sa biotransformation en acides biliaires secondaires [8].

- Butyrate

Le butyrate est un des trois acides gras à chaîne courte, issus de la fermentation bactérienne de glucides non digestibles dans le côlon. Il semble favoriser la multiplication des cellules normales, et inhiber celle des cellules anormales. Par ailleurs il inhibe l'apoptose des cellules normales, tandis qu'il favorise celle des cellules anormales [54]. La synthèse de butyrate par les probiotiques est un des mécanismes d'action envisagés pour expliquer leur rôle inhibiteur sur le cancer colorectal. Cependant, les résultats d'expériences *in vivo* ne montrent pas toujours une augmentation de la concentration cœcale en butyrate à l'issue de l'administration de probiotiques ; cela dépend beaucoup de l'aliment qui doit fournir un bon substrat de fermentation aux bactéries. L'amidon semble le meilleur substrat pour la production de butyrate [9]. Cela dépend également des bactéries utilisées ; il est d'ailleurs intéressant de remarquer que les *Bifidobacterium* sont incapables de produire du butyrate, tandis que les *Clostridium* en produisent [55]...

- Ammoniaque

L'ammoniaque exerce différents effets sur la muqueuse colique. Il augmente notamment le turn over des cellules de la muqueuse, ce qui permet de supposer qu'il joue un rôle dans la cancérogenèse colique. La concentration d'ammoniaque dans le cæcum de rats ayant reçu 2 injections d'AOM est diminuée de 25 à 30% lorsque leur alimentation est complémentée par *Bifidobacterium longum* [49].

2.4.4. Liaison et dégradation des carcinogènes potentiels

Des études expérimentales ont montré que les bactéries lactiques étaient capables de lier des composés chimiques tels que les amines aromatiques hétérocycliques, *in vitro* et *in vivo*. Une fois liés, ces composés ne sont pas absorbés, ce qui diminue leur potentiel carcinogène [56-58].

Cette hypothèse permet d'expliquer la rapidité d'action des bactéries lactiques : Zsivkovits constate une diminution des lésions de l'ADN provoquées par des amines aromatiques hétérocycliques (lésions mesurées par essai COMET) par rapport au groupe contrôle, à peine 4 heures après l'administration de probiotiques [57].

Cependant, d'autres études ont montré que, bien que les probiotiques soient capables de se lier aux amines hétérocycliques *in vitro*, cela ne modifie pas l'absorption et la mutagénicité de ces carcinogènes *in vivo* [59].

2.4.5. Synthèse de composés antimutagéniques ou antitumorigéniques

L'activité antimutagénique des probiotiques inhiberait non seulement l'initiation, elle ralentirait également la promotion et la progression du cancer, en retardant l'apparition de tumeurs peu différenciées et de métastases [42].

2.4.6. Stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte

Les probiotiques stimulent les défenses de l'organisme contre le cancer de différentes façons.

Lors d'une étude sur le cancer colorectal chez les souris, De Moreno et Perdigón ont montré que l'administration de yaourt avant et après les injections de DMH provoque une augmentation de la synthèse des cytokines INF- γ et TNF- α dans les premiers mois du traitement. Cette augmentation est corrélée à une mobilisation des cellules immunitaires dans le côlon [60].

Dans les modèles murins de Cancérogenèse, on constate généralement une détérioration de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Plusieurs auteurs ont constaté que l'administration par voie orale de *Lactobacillus* permettait de stimuler cette réponse à tel point que les populations lymphocytaires des nœuds lymphatiques mésentériques [61] ou de la rate [45] étaient comparables à celles d'animaux sains.

Les *Lactobacillus* seraient reconnu par le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), où les bactéries sont phagocytées par les cellules M des plaques de Peyer et des follicules lymphoïdes, avant d'être présentés aux macrophages et aux lymphocytes. Ces événements expliqueraient l'action systémique des probiotiques.

2.4.7. Effets sur la physiologie de l'hôte

L'apoptose ou « mort cellulaire programmée » est un événement normal de la vie cellulaire, mais c'est également un mécanisme de défense contre le cancer, qui permet d'éliminer les cellules anormales.

L'association synbiotique de *Bifidobacterium lactis* avec un prébiotique dénommé RS (Resistant Starch pour amidon résistant) entraîne chez le rat une augmentation de 33% de l'apoptose des cellules coliques 6 heures après une injection d'AOM. Il suffit d'une modification de 1% de la proportion des cellules en apoptose pour influer sur la Cancérogenèse colique [62].

De Moreno de LeBlanc explique cette augmentation de l'apoptose par l'intervention du TNF- α dans certaines voies de l'apoptose [60], tandis que Le Leu l'associe également à la synthèse de butyrate par les probiotiques [62].

S'il est quasiment certain que les probiotiques agissent sur l'activité enzymatique de nombreuses enzymes bactériennes, il est aussi fort probable qu'ils agissent également sur l'activité enzymatique d'enzymes endogènes. Balansky suggère que le lait fermenté par des *Lactobacilli* active le métabolisme hépatique des cancérogènes [42], Tavan a démontré que l'administration de lait fermenté entraînait une diminution de l'activité enzymatique de MROD, une enzyme hépatique de phase I [56] tandis que Challa [63] a constaté une augmentation de l'activité de la glutathion-S-transférase des colonocytes lors de l'administration conjointe de *Bifidobacterium longum* et de lactulose.

En bref

1. Les probiotiques sont des suppléments alimentaires constitués de micro-organismes vivants qui influent de façon favorable sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre de sa flore intestinale.
2. Les bactéries lactiques sont des probiotiques naturellement présents dans de nombreux aliments fermentés.
3. Les probiotiques ont de nombreuses applications en santé humaine, notamment en gastro-entérologie, et plus particulièrement en cancérologie. Plusieurs modes d'action possibles ont été envisagés, qui leur confèrent un rôle protecteur vis à vis du cancer du côlon.

2^o partie : Méta-analyse

Introduction

Elaboration du protocole expérimental

Résultats

Discussion

Introduction

La méta-analyse est une forme de revue bibliographique qui se veut objective.

Malgré ce que son nom pourrait laisser supposer, une méta-analyse ne se résume surtout pas à l'analyse de toutes les données disponibles sur un sujet, comme si elles étaient le résultat d'une seule expérience. En fait, elle comporte deux étapes essentielles.

La première consiste à recueillir pour chaque étude, individuellement, les données requises, et à calculer un résultat pour cette étude (“effet estimé”), auquel est associé un intervalle de confiance.

La seconde étape suppose de s’assurer qu'il est approprié de calculer un “effet moyen”, puis de le faire le cas échéant. Ce travail implique de donner plus de poids aux études qui nous fournissent plus d'informations, puisqu'elles sont vraisemblablement plus proches de la valeur que nous essayons de déterminer.

L'effet moyen est donc une moyenne pondérée de l'effet estimé de chaque étude.

Une méta-analyse est une démarche scientifique à part entière.

Elle requiert tout d'abord des connaissances dans le domaine étudié (connaissances résumées dans le cas présent dans la première partie de cette thèse).

Elle nécessite ensuite la formulation d'une question de recherche précise, et l'élaboration d'un protocole pour y répondre. Ce protocole doit spécifier les caractéristiques de l'échantillon étudié, la façon dont seront obtenues les données, et la façon dont elles seront analysées. Il doit également tenir compte des sources de biais, pour que l'étude soit la plus précise possible.

Une fois le protocole rédigé, il est nécessaire de réunir les sources des données (articles scientifiques en général), et d'en extraire les données.

Le protocole doit être rédigé avant de commencer la recherche et l'extraction des données. Toute modification du protocole après cette étape devra être spécifiée.

La phase d'analyse statistique ne commence qu'une fois les données rentrées dans un logiciel de calcul.

Chapitre I

Elaboration du protocole expérimental

1. Formulation de la question de recherche, relation étudiée

Nous désirons étudier la relation entre les cancers induits expérimentalement par administration de carcinogènes chez les rongeurs de laboratoire et l'administration par voie orale à ces animaux de probiotiques.

Aucune méta-analyse n'a jamais, à notre connaissance, été effectuée sur ce sujet.

Nous avons décidé de restreindre notre étude aux animaux possédant une flore digestive « naturelle », en raison de certains modes d'action supposés des probiotiques (actions sur la flore digestive).

Nous avons en outre préféré nous attacher à l'étude de cellules bactériennes entières, car il nous semble que cela correspond à la façon la plus courante et la plus simple de consommer des probiotiques pour l'Homme (c'est la forme que l'on retrouve dans les aliments fermentés).

2. Variables

L'effet estimé des probiotiques pour chaque étude est susceptible d'être influencé par différents facteurs, tels que les animaux utilisés, les traitements carcinogènes effectués, et les probiotiques administrés. Nous avons essayé d'appréhender l'ensemble des facteurs de variations afin de définir un protocole qui limitera les sources de biais.

2.1. Animaux utilisés

L'espèce (rat ou souris) est un premier facteur de variation.

De plus, il existe plusieurs lignées de rats et de souris utilisées en recherche expérimentale, et certaines sont plus sensibles que d'autres aux tumeurs chimio-induites.

Les études peuvent être réalisées sur des mâles, des femelles, ou les deux.

L'âge et le poids des animaux utilisés sont variables, bien que la plupart des chercheurs utilise des animaux tout juste sevrés lorsqu'ils débutent l'expérience.

2.2. Conditions d'élevage des animaux

L'environnement, et notamment l'alimentation des animaux, peuvent varier d'un laboratoire à l'autre, et d'une expérience à l'autre.

Des teneurs élevées en matières grasses ou en protéines sont corrélées à une incidence de tumeurs et à nombre d'ACF plus importants. La teneur de l'aliment en fibres et en glucides non digestibles fermentescibles sont des facteurs de variation du développement des bactéries dans l'intestin.

2.3. Carcinogènes

Plusieurs carcinogènes sont utilisables pour provoquer des tumeurs colorectales chez les rongeurs de laboratoire. Les plus fréquemment utilisés dans les études de chimioprévention du cancer colorectal sont le 1,2-diméthylhydrazine (DMH) et son métabolite, l'azoxyméthane (AOM), mais certains chercheurs utilisent également les Amines Aromatiques Hétérocycliques (HAA).

Le «schéma thérapeutique » (voie, dose, fréquence et/ou durée d'administration) d'un même carcinogène peut être différent d'une expérience à l'autre.

2.4. Probiotiques

La notion de probiotiques regroupe une diversité de genres et d'espèces bactériennes.

Les genres les plus connus sont *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Parmi ces genres, différentes espèces sont utilisées, et plusieurs lignées ont été isolées et caractérisées pour chacune d'entre elles.

L'obtention des probiotiques, le nombre de bactéries distribuées aux animaux, le mode de conservation et de distribution sont également des facteurs de variation pour une même espèce bactérienne.

Enfin, l'administration des probiotiques peut être concomitante et/ou antérieure et/ou postérieure au traitement carcinogène.

2.5. Critères de jugement

Le critère de jugement (“endpoint” en anglais) est la variable mesurée à la fin de l'expérience pour définir l'efficacité du produit testé. Le nombre de cryptes aberrantes et d'ACF, la présence ou l'absence de tumeurs sont des critères de jugement fréquemment utilisés. Cependant, pour affiner le résultat, on peut également compter le nombre de cryptes aberrantes par foci, déterminer leur localisation dans l'intestin, définir le grade et la localisation des tumeurs,...

La façon dont sont étudiés les critères de jugement est aussi une variable : la fixation des côlons, leur coloration, les manipulateurs, sont sources de variabilité.

3. Protocole

Le protocole a été défini préalablement à la méta-analyse. Chacune des trois étapes ci-dessous est détaillée plus bas.

- ▶ *Identification, obtention et sélection des articles pouvant répondre à notre question de recherche*
- ▶ *Extraction des données*
- ▶ *Analyse statistique*
 - Première méta-analyse « globale »
 - Méta-analyses en sous-groupes, découlant de l'identification des facteurs de variabilité identifiés :
 - Animaux de laboratoire (rats/souris, sexe, éventuellement lignées).
 - Carcinogène (molécule, éventuellement dose).
 - Probiotique utilisé : espèce bactérienne, dose, distribution lors de l'induction et/ou de la promotion.

3.1. Recherche des articles susceptibles d'être utilisés dans la méta-analyse

3.1.1. *Recherches sur Pubmed*

Nous avons décidé de rechercher dans un premier temps les articles se rapportant à notre question de recherche à l'aide de PubMed. Cette base de recherche est en effet gratuite et simple d'utilisation.

Nous avons choisi de recenser tous les articles qui traitaient de la relation étudiée (cancers chimio-induits chez les rongeurs de laboratoire et administration par voie orale de probiotiques), qu'il s'agisse de revues ou d'expériences. En effet, ceci devait nous permettre de remonter à la source de ces articles en utilisant leur bibliographie.

3.1.2. *Système de la « boule de neige »*

Grâce à la bibliographie des articles obtenus suite à nos recherches sur PubMed, nous nous sommes procuré d'autres articles plus anciens, en rapport avec notre sujet. Nous avons décidé de lire la bibliographie de chaque article en notre possession, afin de vérifier que nous avions recensé tous les articles expérimentaux sur le sujet.

3.1.3. *Utilisation de Google Scholar*

Google Scholar (<http://scholar.google.fr>) permet de repérer les articles qui citent un article donné. Nous avons décidé d'utiliser ce procédé après avoir épuisé les ressources des deux autres techniques décrites précédemment.

Les recherches d'articles à intégrer à la méta-analyse ont été arrêtées le 10 janvier 2008, après une dernière vérification avec Google Scholar.

3.2. Sélection des articles utilisables

Les articles ont été sélectionnés dans un premier temps avant de les obtenir, d'après leur titre et leur résumé lorsque celui-ci était disponible. Lorsque le résumé n'était pas disponible par le biais de PubMed ou du site Internet du journal, la sélection sur le résumé a éventuellement été effectuée après obtention de l'article.

Dans un second temps, une sélection a été opérée sur l'ensemble du texte de chaque article pour vérifier la qualité de l'étude.

3.2.1. *Sélection sur le titre et le résumé*

Nous avons décidé de n'inclure que les articles disponibles en langue anglaise ou française. Pour les besoins de notre méta-analyse, seules les études expérimentales sur le cancer colorectal chimio-induit chez les rats et les souris étaient recherchées.

La première sélection sur le titre a surtout permis d'écartier les articles qui relataient des études non conformes à celles que l'on recherchait : articles en "langues étrangères", études épidémiologiques, études *in vitro*, études sur d'autres cancers que celui du côlon.

Cependant, le titre d'un article n'apporte pas toujours suffisamment d'informations sur les caractéristiques de l'étude. Le résumé précise généralement au minimum la relation étudiée et les critères de jugement utilisés : les dernières études *in vitro* passées au travers du crible du titre ont été écartées de la méta-analyse.

3.2.2. *Sélection sur l'article en entier*

Les articles de qualité insatisfaisante ou non conformes aux exigences de la méta-analyse ont été écartés suite à cette seconde sélection.

► *Qualité de l'article*

Nous avons considéré que la qualité de l'article était suffisante pour l'inclure dans la méta-analyse lorsque les conditions suivantes étaient remplies :

- l'espèce, la lignée, et le sexe des animaux utilisés sont précisés.
- deux groupes expérimentaux au moins reçoivent le même traitement carcinogène ; l'un reçoit également des probiotiques, l'autre pas

- le nombre d'animaux de chaque groupe expérimental est indiqué (nous avons choisi d'intégrer les études pour lesquels ces nombres, à défaut d'être clairement énoncés, pouvaient être calculés avec certitude).
- le nombre d'animaux de chaque groupe est supérieur ou égal à cinq.
- le nom du carcinogène utilisé, ainsi que la dose, la fréquence et la durée de son administration sont spécifiés.
- le probiotique utilisé : nom du genre et de l'espèce (et si possible de la souche), dose, fréquence et durée d'administration sont indiqués. Nous avons cependant intégré certaines études qui ne précisent pas l'espèce et/ou le nombre de bactéries utilisées dans la méta-analyse globale, mais ces études n'ont pas été utilisées pour les méta-analyses en sous-groupes en rapport avec le critère manquant.
- le protocole de dénombrement des cryptes aberrantes et des tumeurs concorde avec les protocoles de référence (coloration au bleu de méthylène pour les cryptes aberrantes, dénombrement des tumeurs macroscopiques puis analyse histologique de ces tumeurs).

► *Conformité du protocole aux exigences de la méta-analyse*

- Probiotiques

Les probiotiques étudiés sont d'espèces et de souches variables, mais toutes les études intégrées à la méta-analyse utilisent des bactéries entières viables.

Les bactéries peuvent être conservées sous forme lyophilisée ou congelée, ou cultivées pendant la durée de l'étude.

Les probiotiques sont administrés par voie orale aux animaux : gavage, mélange des bactéries à l'eau de boisson ou à l'aliment des animaux sont des formes d'administration retenues.

- Animaux

Les animaux utilisés sont des rats ou des souris, mâles ou femelles, dotés d'une flore digestive « naturelle », c'est à dire que les animaux gnotoxéniques ou axéniques sont exclus de la méta-analyse. En raison de l'interaction supposée entre les probiotiques et la flore digestive, cette condition nous paraissait plus logique.

Nous n'avons défini aucun critère de restriction quant à l'âge ou au poids des animaux utilisés.

- Critères de jugement

Nous avons décidé dans notre protocole initial d'utiliser l'incidence des tumeurs et les nombres moyens d'ACF et de cryptes aberrantes comme critères de jugement.

Lors de l'extraction des données, nous avons choisi de relever les données concernant la mortalité, le nombre de tumeurs, le nombre de cryptes par ACF et le nombre de foyers à plus de 4 cryptes aberrantes lorsque ces données étaient disponibles, afin de pouvoir y revenir si leur méta-analyse se révélait possible et intéressante.

- Composition des groupes d'animaux

Pour chaque probiotique testé sur un groupe d'animaux, il existe un groupe contrôle d'animaux similaires. Ces animaux sont de la même espèce, du même sexe, de la même souche et de la même origine que les animaux qui reçoivent les probiotiques.

Les deux groupes d'animaux sont élevés dans les mêmes conditions, ils reçoivent le même traitement cancérigène et la même alimentation (hormis la complémentation en probiotiques, éventuellement remplacée par un placebo dans le groupe contrôle). Les deux groupes sont sacrifiés en même temps. Les mêmes données sont recueillies pour chacun des groupes afin d'être comparées.

Nous avons été confronté après avoir rédigé le protocole, à un problème lié au nombre de groupes « contrôle » : dans certaines études les auteurs comparent plusieurs groupes « probiotiques » à un seul groupe contrôle. Or, pour la méta-analyse, il faut toujours comparer un groupe « probiotiques » à son équivalent sans probiotique. Si l'on réutilise l'unique groupe contrôle de l'article comme contrôle pour chaque groupe « probiotique », on recompte autant de fois les animaux du groupe contrôle dans la méta-analyse.

Pour résoudre ce problème, nous avons décidé, lorsque le cas se présentait, de garder uniquement le groupe « probiotique » qui reçoit les bactéries les plus courantes (ex : lactobacilles plutôt que *Clostridium perfringens*), ou aux doses les plus fréquemment utilisées. Eventuellement, lorsque deux groupes « probiotiques » présentent un intérêt similaire pour la méta-analyse (ex : *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium longum* à des doses similaires), ces deux groupes sont inclus dans la méta-analyse, et le groupe contrôle est exceptionnellement inclus deux fois.

- Randomisation des animaux

Nous n'avions pas précisé dans le protocole rédigé avant la recherche et la sélection des articles que la répartition des animaux dans les groupes « contrôle » ou « probiotiques » devait être randomisée. Cette condition est indispensable pour éviter les biais de sélection. Cependant, la randomisation des animaux est rarement précisée, et nous aurions du choisir entre trois possibilités :

- l'élimination systématique des études où ce n'était pas précisé dans le protocole
- garder ces études en supposant que la randomisation avait été réalisée correctement
- essayer de deviner si cela avait été réalisé, ce qui aurait introduit un biais supplémentaire.

- Double aveugle

Comme la randomisation, le double aveugle est une condition nécessaire pour éviter d'obtenir des résultats biaisés.

Pour l'administration des probiotiques aux animaux de laboratoire, le problème du double aveugle n'est pas extrêmement important. En effet, les rats ne savent pas trop ce qu'ils mangent, et ne s'en préoccupent pas beaucoup, contrairement aux personnes dans les essais d'intervention. Lors d'études sur des animaux domestiques, il est important que le propriétaire ne sache pas si son animal fait partie du groupe « placebo » ou du groupe « traitement » car il pourrait modifier les soins qu'il donne à son compagnon. On peut supposer que ce n'est pas le cas avec les soigneurs des animaux de laboratoire.

Par contre, il est indispensable que les personnes qui dénombrent les cryptes aberrantes ou les tumeurs des côlons des animaux sacrifiés ignorent les groupes auxquels appartenaient les animaux. Cela pourrait influencer sa façon de dénombrer les critères de jugement. Nous avons omis de préciser ce critère dans notre protocole. Cependant, ici aussi, ce n'est pas toujours précisé, et nous aurions choisir une option parmi celles citées pour la randomisation.

3.3. Extraction des données

Lorsque les données sont disponibles sous forme de tableaux dans l'article, l'extraction est assez simple.

Lorsque les données sont présentées uniquement sous forme de graphique, les données sont obtenues par la mesure graphique des résultats obtenus pour chaque groupe d'animaux.

Afin d'exploiter les résultats d'une expérience, nous avons besoin, pour chaque groupe « probiotique » et « contrôle » :

► *pour les données binaires :*

- du nombre d'animaux de chaque groupe
- du nombre d'animaux positifs pour le critère considéré (ce nombre peut être calculé à partir d'un pourcentage)

► *pour les données discontinues :*

- du nombre d'animaux de chaque groupe
- de la moyenne pour le groupe
- de l'écart type (SD) pour le groupe

Lorsque les auteurs ne donnaient pas un écart-type (Standard Deviation, notée SD) mais une erreur standard (Standard Error ou Standard Error of Means, notée SE ou SEM), nous avons calculé l'écart-type suivant la formule $SD = SE \times \sqrt{n}$, avec n = nombre d'individus de l'échantillon.

L'utilisation d'une moyenne accompagnée d'un écart-type suppose que les critères suivent une répartition normale. Nous avons admis que le critère étudié était réparti dans la population suivant une loi normale, dès lors que l'auteur donne une moyenne et un écart-type pour les deux groupes d'une expérience. Dans le cas où l'auteur indiquait une valeur médiane accompagnée des premier et troisième quartiles, nous avons exclu l'expérience de notre méta-analyse.

Dans certaines études, pour les données continues, seule la moyenne était donnée, sans écart-type. Lorsque ces études n'intégraient pas également des données binaires, elles ont été entièrement écartées de la méta-analyse.

Ces critères « statistiques » d'inclusion ou d'exclusion des articles ont été ajoutés au protocole expérimental après avoir lu plusieurs articles qu'il était impossible d'inclure car il manquait une ou plusieurs données nécessaires.

3.4. Statistiques

Nous présentons ici les choix concernant la partie statistique de la méta-analyse qui ont été réalisés lors de l'élaboration du protocole. D'autres choix qui ne pouvaient être faits au début ont été effectués par la suite. Nous les expliquerons au fur et à mesure de la présentation des résultats. Les types de données, de mesures d'effet et les modèles utilisables pour une méta-analyse, ainsi que l'interprétation des graphiques, sont détaillés en annexe (Annexes 3).

3.4.1. Logiciel utilisé

Nous avons utilisé le logiciel Revman 4.2 élaboré par le Cochrane Collaboration Center, et disponible gratuitement sur le site de cette association (<http://www.cc-ims.net/RevMan>).

RevMan 4.2 fonctionne sous Windows®, et ne nécessite pas d'être connecté à Internet pour fonctionner. Il ne permet de réaliser que deux types de graphiques (forest plots et funnel plots), mais il s'agit des deux types de graphiques indispensables et suffisants. Le choix de ce logiciel a été réalisé pour des raisons pratiques (gratuité, et travail hors connexion Internet). Un article paru en septembre 2007 [64] a décrit RevMan comme l'un des meilleurs logiciels gratuits de mété-analyse, ce qui a conforté notre choix.

3.4.2. Critères de jugement, types de données utilisées et calculées

► Données binaires

La présence ou l'absence de tumeurs chez les animaux est une donnée binaire. Ce critère de jugement correspond à l'incidence des tumeurs.

Nous avons choisi d'utiliser le risque relatif (RR, voir Annexe 3) de la présence de tumeurs pour exprimer l'effet des probiotiques sur le développement des tumeurs colorectales, car cette valeur est plus facile à interpréter que l'odds ratio.

Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que l'effet des probiotiques est un effet fixe ; dans le cas de données binaires, le logiciel RevMan 4.2 utilise la méthode de Mantel-Haenszel pour calculer le risque relatif.

► Données continues

Bien que les nombres de cryptes aberrantes et d'ACF soient en réalité des données discontinues, nous les avons considérées comme des données continues. En effet, le nombre de cryptes aberrantes et d'ACF est toujours grand.

Pour exprimer l'effet d'un traitement sur un critère de jugement continu, nous devons choisir entre deux types de mesures d'effet (Annexe 3) :

- la différence de moyennes (Weighted Means Difference, notée WMD)
- la différence de moyennes standardisée, ou effet standardisé (Standardised Means Difference, notée SMD)

Le choix entre WMD et SMD se fait essentiellement suivant l'échelle utilisée pour mesurer le critère de jugement. Si l'échelle est la même dans tous les essais, on utilisera des WMD. Si l'échelle n'est pas la même, on utilisera des SMD. En effet, une SMD est une valeur sans dimension, puisqu'on l'obtient en divisant la différence des moyennes par une grandeur de même unité, l'écart type.

Selon les études, les auteurs ont utilisé différentes méthodes pour exprimer le nombre de cryptes aberrantes ou de foyers de cryptes aberrantes. Certains ont choisi d'exprimer ces nombres par centimètre carré de côlon, d'autres ont préféré les exprimer par côlon entier. De plus, la taille du côlon d'un rat diffère selon différents facteurs, notamment sa flore digestive

et l'alimentation qu'il reçoit. L'échelle utilisée pour mesurer les critères de jugement est donc différente selon les études ; l'utilisation de l'effet standardisé (SMD) est plus appropriée.

De la même façon que pour les données binaires, nous avons tout d'abord calculé les résultats en utilisant un modèle fixe (méthode de la variance inverse).

3.4.3. *Analyses*

Nous avons décidé dans notre protocole de réaliser dans un premier temps une méta-analyse globale, et plusieurs méta-analyses en sous-groupes, afin d'étudier l'importance des variables définies préalablement (voir 2.Variables, p.51). Les méta-analyses prévues sont détaillées dans le Tableau 3.

Variable à étudier	Méta-analyse en fonction de :
Animaux	<ul style="list-style-type: none"> - Espèce - Sexe - Lignée
Conditions d'élevage	<ul style="list-style-type: none"> - Teneur de l'aliment en matières grasses
Carcinogène	<ul style="list-style-type: none"> - Nature du carcinogène - Dose administrée - Voie d'administration
Probiotique	<ul style="list-style-type: none"> - Genre bactérien - Dose administrée - Période d'administration par rapport au carcinogène

Tableau 3 : Méta-analyses en sous-groupes, prévues dans le protocole de la méta-analyse afin d'étudier l'importance des variables identifiées sur l'effet des probiotiques

Chapitre II

Caractéristiques des articles

Nous avons choisi de présenter les articles correspondant à notre sujet (incidence des probiotiques sur le cancer colorectal chez le rat et la souris de laboratoire), qu'ils aient été inclus ou exclus de la méta-analyse à l'issue de la sélection sur l'article en entier.

Dans le cas des articles inclus dans la méta-analyse, cette présentation nous permet de préciser l'origine des études (plusieurs études différentes peuvent provenir d'un même article), le protocole de chaque étude, et les groupes utilisés pour l'analyse. Cela nous a également permis d'expliquer les calculs, extrapolations et approximations réalisés, le cas échéant.

Il nous a paru intéressant de présenter de la même façon les articles exclus de la méta-analyse. En effet, dans certains cas, l'exclusion ou l'inclusion de l'article peut être discutable, et il nous a paru important de justifier nos choix. De plus, certains articles n'ont pas été intégrés à la méta-analyse car il manquait des données, ou parce que les expériences utilisaient des rats gnotoxéniques ou axéniques, ... mais ces articles, inexploitables pour l'analyse, n'en sont pas moins fort intéressants, et leurs résultats sont utilisés dans la discussion.

Les articles sont présentés par ordre alphabétique.

Ce chapitre n'est pas indispensable à la compréhension de la méta-analyse. Son objectif est de permettre au lecteur de s'y reporter s'il désire des précisions sur certaines études, incluses ou non. Nous avons récapitulé les caractéristiques des articles inclus dans la méta-analyse dans un tableau, présenté en Annexe 4.

1. Etudes incluses dans la méta-analyse

1.1. Abdelali 1995

L'expérience rapportée dans cet article [65] a utilisé une souche bactérienne fournie par Danone, *Bifidobacterium* sp Bio (Danone 173010), correspondant à la souche de *Bifidobacterium animalis (lactis)* utilisée dans la fabrication des yaourts Activia®.

Les auteurs ont étudié le nombre de cryptes aberrantes et d'ACF induits chez des rats mâles Sprague-Dawley par 2 injections intra-péritonéales de DMH (25 mg/kg) à 3 jours d'intervalle.

L'aliment standard distribué aux rats était composé de 18% de protéines, 46% d'amidon de maïs, et 5% de matières grasses.

Les animaux ont reçu l'aliment expérimental (contenant des Bifidobactéries) à partir de 4 semaines avant les injections de DMH, et jusqu'à 3 jours après la seconde injection.

4 groupes de 8 rats ont été étudiés :

G1 : aliment standard

G2 : aliment standard et Bifidobactéries (6.10^9 ufc/rat/j)

G3 : aliment standard et lait écrémé fermenté par les Bifidobactéries (6.10^9 ufc/rat/j)

G4 : aliment standard et lait écrémé

Tous les animaux ont été sacrifiés 5 semaines après la seconde injection de DMH (4,5 semaines après la seconde).

Les données fournies dans l'article étaient imprécises ; nous avons utilisé les résultats expérimentaux que nous ont fourni les auteurs pour les compléter. Nous avons ainsi pu utiliser les données relatives au nombre de cryptes aberrantes et au nombre d'ACF pour les deux études suivantes :

Abdelali 1995 1 : Comparaison de G1 et G2

Abdelali 1995 2 : Comparaison de G3 et G4

1.2. Arimochi 1997

Les auteurs de l'article [66] ont étudié l'effet de l'administration de plusieurs cultures bactériennes sur le nombre d'ACF et la multiplicités des cryptes induites par l'AOM (15 mg/kg/sem, 2 semaines) chez des rats mâles Sprague-Dawley. L'aliment de base distribué aux rats est un aliment du commerce (MF, produit par l'Oriental Yeast Company). L'article relate les résultats de deux expériences.

► *Première expérience*

Les auteurs ont étudié l'effet de 5 espèces bactériennes différentes, cultivées pendant une nuit sur bouillon GAM, sur les ACF des rats. La culture a ensuite été mélangée à l'eau de boisson des animaux.

G1 : GAM broth (contrôle)

G2 : *Bifidobacterium adolescentis* $3,1.10^8$ ufc/mL

G3 : *Lactobacillus acidophilus* $1,5.10^8$ ufc/mL

G4 : *Escherichia coli* $4,0.10^9$ ufc/mL

G5 : *Bacteroides fragilis* $8,3.10^8$ ufc/mL

G6 : *Clostridium perfringens* $1,2.10^9$ ufc/mL

► *Seconde expérience*

L'objectif de cette expérience était de déterminer la partie de la culture bactérienne responsable de la diminution du nombre d'ACF (milieu de culture, cellules entières, surnageant). Le « traitement » a été mélangé à l'eau de boisson.

G1 : GAM broth

G2 : Surnageant de *Lactobacillus acidophilus*, nouveau (obtenu la veille)

G3 : Surnageant de *Lactobacillus acidophilus*, vieux (conservé 2 semaines à 4°C)

G4 : Surnageant de *Clostridium perfringens*

G5 : Solution anaérobique (AS)

G6 : Cellules de *Lactobacillus acidophilus* rincées, dans AS

G7 : Cellules de *Clostridium perfringens* rincées, dans AS

G8 : Eau du robinet

Dans les deux expériences, tous les animaux ont été sacrifiés 3 semaines après la seconde injection d'AOM (soit 5 semaines, après le début du traitement, 4 semaines après la première injection d'AOM).

Nous ne connaissons pas la quantité d'eau bue par les rats : la quantité de probiotiques administrée chaque jour est donc inconnue. Nous avons cependant choisi d'inclure cet article à la méta-analyse globale.

Nous avons décomposé cet article en 3 études :

Arimochi 1997 1 : comparaison des groupes G1 et G2 de la 1^o expérience

Arimochi 1997 2 : comparaison des groupes G1 et G3 de la 1^o expérience

Arimochi 1997 3 : comparaison des groupes G5 et G6 de la 2^o expérience.

Conformément aux critères de sélection des études que nous nous sommes fixés, nous avons choisi les groupes recevant des cellules bactériennes entières, parmi les espèces les plus fréquemment utilisées. Les bactéries *L. acidophilus* et *B. adolescentis* ont ainsi été choisies, bien que ce soit *C. perfringens* qui exerce l'activité inhibitrice sur les ACF la plus forte. Cependant, peu d'auteurs ont étudié cette bactérie dans ce contexte.

Le groupe contrôle choisi dans chaque cas est constitué d'animaux similaires à ceux du groupe expérimental, et les animaux contrôles reçoivent la même alimentation que ceux du groupe expérimental, à l'exception des probiotiques.

Les données étant présentées sous forme de tableau en «moyennes +/- SD », nous n'avons calculé aucun résultat.

1.3. Bolognani 2001

Les auteurs ont réalisé trois expériences distinctes sur l'effet modulateur des probiotiques sur les ACF chimio-induits chez des rats Sprague-Dawley [67].

L'aliment distribué aux rats était soit un aliment « SSA » (caséine 20%, amidon 70%, matières grasses 5%), soit un aliment « CO25 » (caséine 24,5%, amidon 45%, matières grasses 25%).

► *Expérience 1*

Les 9 groupes de 10 rats chacun ont reçu l'aliment « SSA ».

La souche de *L. casei* utilisée, BSN, est une souche Danone.

Le carcinogène a été administré par gavage (une seule administration).

L. casei a été administré en suspension dans l'eau de boisson, à partir d'une semaine avant l'administration du carcinogène, puis pendant toute la durée de l'expérience, sauf pour G4. Les rats du groupe 4 ont reçu une unique dose de *L. casei*, par gavage, juste avant l'administration de DMH.

La durée de l'expérience est la durée entre l'administration du carcinogène et le sacrifice des rats.

	n	Durée de l'expérience	Carcinogène	<i>L. casei</i>
G1	10	4 semaines	Eau distillée	
G2	10	4 semaines	DMH, 60 mg/kg	
G3	10	4 semaines	DMH, 60 mg/kg	3.10^8 ufc/mL, semaines 1 à 4
G4	10	4 semaines	DMH, 60 mg/kg	3.10^9 ufc, par gavage en une fois
G5	10	12 semaines	DMH, 60 mg/kg	
G6	10	12 semaines	DMH, 60 mg/kg	3.10^8 ufc/mL, semaines 1 à 12
G7	10	12 semaines	DMH, 60 mg/kg	$2.5.10^6$ ufc/mL, semaines 1 à 12
G8	10	4 semaines	MNU, 150 mg/kg	
G9	10	4 semaines	MNU, 150 mg/kg	3.10^8 ufc/mL, semaines 1 à 4

Les rats des groupes 3, 6, et 9 ont bu 16 à 19 mL d'eau par jour, ce qui équivaut à une consommation de 4.8 à $5.9.10^9$ ufc/jour de bactéries viables. Les rats du groupe 7 ont bu 17 à 18 mL par jour, soit 4.2 à $4.5.10^7$ ufc/jour.

Le nombre d'ACF par groupe (moyennes +/- SD), et le pourcentage d'ACF à plus de 4 cryptes aberrantes est donné par les auteurs.

Nous avons décomposé cette expérience en 5 études pour l'intégrer à la méta-analyse :

Bolognani 2001 1 a : comparaison des groupes G2 et G3

Bolognani 2001 1 b : comparaison des groupes G2 et G4

Bolognani 2001 1 c : comparaison des groupes G5 et G6

Bolognani 2001 1 d : comparaison des groupes G5 et G7

Bolognani 2001 1 e : comparaison des groupes G8 et G9

► *Expérience 2*

Les 6 groupes de 8 rats chacun ont reçu l'aliment « SSA » pendant toute l'expérience.

La dose de DMH a été administrée en plusieurs fois Per Os.

Les auteurs ont utilisé soit *L. casei* BfE, soit *B. longum*, administrés par gavage (2 mL par jour, pendant toute l'expérience, à partir de 2 jours avant la première administration de DMH).

Les rats des groupes 2 et 5 ont donc reçu 6.10^9 *L. casei* BfE viables par jour.

Les rats des groupes 3 et 6 ont donc reçu 8.10^7 *B. longum* viables par jour.

Tous les rats ont été sacrifiés 4 semaines après la dernière administration de DMH.

	n	Carcinogène	Probiotique
G1	8	DMH, 2 fois 25 mg/kg à 2 jours d'intervalle	
G2	8		<i>L. casei</i> , 3.10^9 ufc/mL
G3	8		<i>B. longum</i> , 4.10^7 ufc/mL
G4	8	DMH, 4 fois 12,5 mg/kg/j, 4 jours	
G5	8		<i>L. casei</i> , 3.10^9 ufc/mL
G6	8		<i>B. longum</i> , 4.10^7 ufc/mL

Nous avons décomposé cette expérience en 4 études pour l'intégrer à la méta-analyse :

Bolognani 2001 2 a : comparaison des groupes G1 et G2

Bolognani 2001 2 b : comparaison des groupes G1 et G3

Bolognani 2001 2 c : comparaison des groupes G4 et G5

Bolognani 2001 2 d : comparaison des groupes G4 et G6

Le nombre d'ACF (moyenne +/- SD) est la seule donnée disponible pour cette expérience. Nous l'avons mesurée sur les graphiques.

► *Expérience 3*

Contrairement aux expériences précédentes, *L. acidophilus* a été administré sous forme lyophilisée dans l'aliment, à la dose de 5.10^9 bactéries/kg d'aliment. La préparation lyophilisée contient, outre les lactobacilles, du lait écrémé en poudre et de l'extrait de malt utilisés comme cryoprotecteurs.

Les rats consommant l'aliment SSA ont mangé environ 20g d'aliment par jour, soit 10^8 bactéries viables par jour. Les rats consommant l'aliment CO25 n'en ont mangé que 16,5g par jour, soit $8,25.10^7$ bactéries viables par jour.

	n	Carcinogène	Aliment	« Traitement »
G1	8	AOM, 2 fois 12,5 mg/kg, à une semaine d'intervalle	SSA	
G2	8			<i>L. acidophilus</i>
G3	8			Inuline
G4	8	AOM, 2 fois 12,5 mg/kg, à une semaine d'intervalle	CO25	
G5	8			<i>L. acidophilus</i>
G6	8			Inuline

Le nombre d'ACF par groupe (moyennes +/- SE), et le nombre d'ACF comprenant 1 à 3 cryptes aberrantes est présenté sous forme de graphiques. Nous avons calculé ces nombres à partir des graphiques. Nous avons également dû calculer les Standard Deviation (SD = SEv8).

Nous avons décomposé cette expérience en 2 études pour l'intégrer à la méta-analyse :

Bolognani 2001 3 a : comparaison des groupes G2 et G1

Bolognani 2001 3 b : comparaison des groupes G5 et G4

1.4. Challa 1997

Les animaux utilisés dans cet article [63] sont des rats mâles F344.

Challa *et al.* ont étudié l'incidence de l'administration *per os* de *Bifidobacterium longum* avec ou sans lactulose sur les ACF induits par deux injections d'AOM (16 mg/kg/sem).

Le probiotique a été administré aux rats à partir de 3 semaines avant le traitement carcinogène, jusqu'à la fin de l'expérience.

Les bactéries ont été mélangées à l'aliment à la concentration de 10^8 ufc/g. Les rats ont consommé en moyenne 14 g d'aliment par jour, soit $1,4.10^9$ ufc/rat/j.

Pendant toute la durée de l'expérience, tous les rats ont reçu l'aliment AIN76A en tant qu'aliment de base (additionné ou non de *B. longum* et/ou de lactulose).

Quatre groupes de 10 à 11 rats ont été étudiés :

G1 : AIN76A (contrôle)

G2 : AIN76A et *B. longum*

G3 : AIN76A et lactulose

G4 : AIN76A, lactulose et *B. longum*

Tous les animaux ont été sacrifiés 9 semaines après la seconde injection d'AOM (10 semaines après la première injection d'AOM, et après 13 semaines d'alimentation expérimentale).

Nous disposons du nombre moyen d'ACF par rat, sous la forme « moyenne +/- SEM» ; nous avons donc calculé les SD = SE x vn.

Nous avons inclus cet article dans la méta-analyse en le divisant en 2 études :

Challa 1997 1 : comparaison de G1 et G2

Challa 1997 2 : comparaison de G3 et G4

1.5. Femia 2002

Femia [68] a induit des tumeurs chez des rats F344 mâles, avec 2 injections d'AOM (15 mg/kg/sem) à une semaine d'intervalle.

Les rats ont reçu un aliment riche en matières grasses (23% d'huile de maïs).

Les auteurs ont étudié l'effet d'un probiotique et d'un prébiotique, seuls ou associés, sur les tumeurs.

Le probiotique utilisé est un mélange de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *rhamnosus* GG et de *Bifidobacterium lactis* Bb12. Ces bactéries ont été mélangées à l'aliment à la dose de 5.10^8 ufc/g chacune.

Le prébiotique étudié, appelé Synergy 1, est un mélange d'inulines à chaînes courtes et longues. Il a été ajouté à hauteur de 10% dans l'aliment.

Les compléments ont été rajoutés dans l'aliment des rats pendant toute la durée de l'expérience, à partir de 10 jours avant la première injection d'AOM.

4 groupes de 27 à 28 rats ont été étudiés :

G1 : AOM

G2 : AOM + probiotique

G3 : AOM + prébiotique

G4 : AOM + prébiotique + probiotique

Tous les rats ont été sacrifiés 31 semaines après la première injection d'AOM.

Les auteurs donnent l'incidence et le nombre d'adénomes et de carcinomes pour chaque rat (moyennes +/- SE). L'incidence et le nombre de tumeurs (adénomes et carcinomes confondus) ne sont pas disponibles.

Les variables « nombre d'adénomes » et « nombre de carcinomes » ne sont pas indépendantes ; on peut observer chez un même rat des adénomes et des carcinomes. A priori, tous les rats qui ont un carcinome ont également un adénome. Nous avons considéré que l'incidence des adénomes correspondait à l'incidence des tumeurs.

Les résultats ont été mesurés sur les graphiques, et les pourcentages transformés en nombre de rats.

Nous avons inclus deux études issues de cet article dans la méta-analyse :

Fémia 2002 1 : comparaison des groupes G2 et G1

Fémia 2002 2 : comparaison des groupes G4 et G3

1.6. Fukui 2001

Au cours de cette expérience [69], un mélange de 4 lactobacilles différents (*L. acidophilus*, *L. casei* subsp *tolerans*, *L. fermentum*, et *L. rhamnosus*) a été administré à des souris mâles ICR, après 10 injections hebdomadaires de DMH (20 mg/kg/sem).

La composition de l'aliment distribué aux souris n'est pas indiquée, et nous ne connaissons pas la quantité de bactéries probiotiques consommée par les souris (probiotiques distribués dans l'eau de boisson, à volonté).

Trois groupes de 29, 36 et 23 souris respectivement ont été étudiés :

G1 : DMH

G2 : DMH et probiotique

G3 : ni DMH, ni probiotique

6 souris de chaque groupe ont été sacrifiées 15 semaines après la première injection de DMH pour permettre le dénombrement des microadénomes de plus de 30 µm. Les autres ont été sacrifiées 24 à 26 semaines après la première injection de DMH, et les tumeurs colorectales ont alors été comptées, et analysées (histologie).

Le nombres moyen de microadénomes (souris sacrifiées à 15 semaines) et celui de tumeurs (souris sacrifiées à 24-26 semaines) sont donnés sous la forme « moyennes +/- SD ». L'incidence des tumeurs et celle des adénocarcinomes est indiquée pour les groupes 1 et 2.

Nous avons inclus cet article dans la méta-analyse :

Fukui 2001 : comparaison de G1 et G2, sacrifice à 24-26 semaines (données pour tumeurs).

1.7. Goldin 1980

Goldin et Gorbach [70] ont étudié l'incidence des tumeurs induites par 20 injections de DMH (20 mg/kg/sem) chez des rats mâles F344 nourris avec une alimentation riche en viande.

Ils ont utilisé *Lactobacillus acidophilus* comme prébiotique, mélangé quotidiennement à l'alimentation des rats, du début à la fin de l'expérience (environ 10^{10} ufc/rat/j).

Cinq groupes de rats ont été étudiés :

	n	Durée de l'expérience	Régime alimentaire
G1	13	36 semaines	Grain (5% de MG)
G2	12		Bœuf (20% MG)
G3	11		Bœuf (20% MG) et <i>L. acidophilus</i>
G4	22	20 semaines	Bœuf (20% MG)
G5	20		Bœuf (20% MG) et <i>L. acidophilus</i>

Les auteurs ont uniquement étudié l'incidence des tumeurs (pas leur nombre).

Nous avons inclus 2 études issues de cet article à la méta-analyse :

Goldin 1980 1 : comparaison de G2 et G3

Goldin 1980 2 : comparaison de G4 et G5



1.8. Goldin 1996

Au travers de cet article [71], Goldin étudie l'impact de l'apport de probiotiques sur le cancer du côlon, en fonction de la teneur en matières grasses de l'aliment et du moment auquel est administré le probiotique par rapport au traitement carcinogène.

Les animaux utilisés sont des rats mâles F344.

Le traitement carcinogène consiste à réaliser 16 injections hebdomadaires de DMH (20 mg/kg/sem).

L'aliment de base distribué aux rats est, soit un aliment à 20% de matières grasses (20% protéines, 15% d'amidon de maïs), soit un aliment à 5% de matières grasses (20% de protéines, 15% d'amidon de maïs).

Le probiotique utilisé est *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* GG (*Lactobacillus* GG), mélangé à l'aliment à la dose de 2.10^{11} ufc/g (soit environ 2.10^{10} ufc/rat/j). *Lactobacillus* GG est ajouté à l'aliment soit à partir de 3 semaines avant la première injection de DMH, soit à partir de la neuvième injection de DMH. La distribution du probiotique se poursuit ensuite quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérience.

12 groupes de rats ont été étudiés :

	n	DMH	<i>Lactobacillus</i> GG	Régime alimentaire
G1	21	+	3 semaines avant la 1° injection de DMH	20% matières grasses
G2	20	+	-	
G3	9	- (saline)	-	
G4	21	+	A partir de la 9° injection de DMH	20% matières grasses
G5	21	+	-	
G6	8	- (saline)	-	
G7	21	+	3 semaines avant la 1° injection de DMH	5% matières grasses
G8	21	+	-	
G9	9	- (saline)	-	
G10	20	+	A partir de la 9° injection de DMH	5% matières grasses
G11	21	+	-	
G12	?	- (saline)	-	

Tous les animaux ont été sacrifiés 8 semaines après la dernière injection de DMH.

Les auteurs ont présenté les incidences et le nombre moyen de tumeurs par animal atteint (moyennes +/- SE) pour les groupes 1 à 9. Pour les groupes 10 à 12, seule l'incidence des tumeurs est citée dans l'article, car il n'y a «pas de différence significative entre les différents groupes».

Nous avons uniquement calculé les SD. Toutes les autres données nécessaires étaient disponibles sous forme numérique dans le texte.

Nous avons inclus cet article dans la méta-analyse en le divisant en 4 études :

Goldin 1996 1 : comparaison de G1 et G2

Goldin 1996 2 : comparaison de G4 et G5

Goldin 1996 3 : comparaison de G7 et G8

Goldin 1996 4 : comparaison de G10 et G11

1.9. Li 2003

Wei Li et Chong-Bi Li [72] ont utilisé des rats mâles Wistar pour étudier l'effet à long terme de *Lactococcus lactis* sur les tumeurs colorectales induites par 10 injections de DMH (40 mg/kg/sem, 10 semaines).

Le *Lc. lactis* a été administré par gavage pendant 12 semaines (ou jusqu'à la mort des rats), à la dose de 5.10^9 ufc/jour/rat, après la dernière injection de DMH.

L'aliment de base distribué est un aliment standard pour rongeurs.

6 groupes de 10 rats chacun ont été étudiés :

G1 : DMH et *Lc. lactis*

G2 : solution saline et solution utilisée pour administrer les bactéries (sans bactérie)

G3 : DMH

G4 : DMH et *Lc. lactis*

G5 : solution saline et solution utilisée pour administrer les bactéries (sans bactérie)

G6 : DMH

Les groupes 1, 2 et 3 ont été sacrifiés à 22 semaines. Les rats survivants des groupes 4, 5 et 6 ont été sacrifiés à 52 semaines.

Pour les trois premiers groupes, les auteurs ont étudié l'incidence des tumeurs, le nombre total de tumeurs (toutes tumeurs confondues, adénomes et carcinomes) pour le groupe, ainsi que le nombre de tumeurs par animal atteint (moyenne +/- SD).

Pour les trois derniers groupes, les auteurs n'ont publié (et peut être étudié) que le taux de survie à 52 semaines.

Nous avons inclus une étude issue de cet article à la métá-analyse :

Li 2003 : comparaison des groupes G1 et G3.

1.10. Mc Intosh 1999

Cet article [73] étudie l'effet de différentes espèces bactériennes sur les tumeurs intestinales induites par 4 injections de DMH (20 mg/kg/sem, SC, 4 semaines) chez des rats mâles Sprague-Dawley.

L'aliment de contrôle distribué aux rats est un aliment AIN93 modifié, contenant 20% de caséines, 30% d'amidon, et 20% de matières grasses (mélange 1 :1 lard et huile de tournesol).

4 probiotiques ont été utilisés : *Lactobacillus acidophilus* (souche Delvo Pro LA-1), *Bifidobacterium animalis* (souche CSCC 1941), *Lactobacillus rhamnosus* (souche GG), *Streptococcus thermophilus* (souche DD145).

Les probiotiques ont été mélangés sous forme lyophilisée à l'aliment, pendant toute la durée de l'expérience à partir de 4 semaines avant la première injection de DMH. Le nombre de bactéries viables de chaque espèce était au minimum 10^7 ufc/g d'aliment.

La quantité d'aliment consommée par les rats n'étant pas précisée, nous l'avons estimée à 10 à 20 g/rat/j. Cela entraîne une consommation de probiotique minimale de 10^8 ufc/rat/j

5 groupes de 20 rats ont été étudiés, tous recevant les mêmes injections de DMH :

G1 : aliment contrôle

G2 : aliment contrôle + *L. acidophilus*

G3 : aliment contrôle + *L. acidophilus* et de 1% de *B. animalis*

G4 : aliment contrôle + *L. rhamnosus*

G5 : aliment contrôle + *S. thermophilus*

Les animaux ont été sacrifiés 27 semaines après la dernière injection de DMH (35 semaines après le début de l'alimentation avec les prébiotiques, 31 après le début du traitement cancérigène).

L'auteur publie l'incidence des tumeurs pour chaque groupe, le nombre total de tumeurs au sein de chaque groupe, la nature histologique de ces tumeurs, et leur index de masse.

Il expose également ses résultats concernant le pH fécal et la composition fécale en acides gras à courte chaîne pour chaque groupe. Il a également dénombré les populations bactériennes issues de la complémentation probiotique présentes dans les selles.

Nous ne disposons que d'un seul groupe contrôle (G1) pour 4 groupes ayant consommé des probiotiques. Nous avons résolu dans le protocole de la méta-analyse de ne pas utiliser un même groupe contrôle plus de 2 fois. Nous avons donc choisi d'inclure 2 études issues de cet article :

McIntosh 1999 1 : comparaison de G1 et G2.

McIntosh 1999 2 : comparaison de G1 et G4.

Nous avons choisi d'inclure les groupes 2 et 3, car *L. acidophilus* et *L. rhamnosus* sont des bactéries qui ont été étudiées dans plusieurs autres expériences. Par ailleurs, elles ont été retrouvées dans les selles des rats, et une inhibition des tumeurs a été constatée pour ces 2 groupes.

Nous n'avons pu utiliser que l'incidence des tumeurs. En effet toutes les données concernant le nombre de tumeurs sont sous la forme de moyennes, sans écart-type.

L'étude a été financée par l'Australian Dairy Research and Development Corporation.

1.11. Nakanishi 2003

Cet article [74] relate les résultats d'une expérience menée sur des rats mâles F344.

Les ACF sont induits par 2 injections d'AOM (15 mg/kg SC) à une semaine d'intervalle.

L'aliment distribué aux rats est un aliment commercial « standard » dont la composition n'est pas détaillée dans l'article.

Le probiotique utilisé, *Clostridium butyricum*, a été administré par voie intragastrique deux fois par jour à la dose de 5.10^8 spores/mL, pendant le traitement carcinogène et jusqu'à la fin de l'expérience.

5 groupes de 8 rats (sauf le groupe 1, où n=7) ont été constitués.

Deux des groupes ont reçu un prébiotique, le HAS (High Amylose Starch).

G1 : solution saline

G2 : AOM

G3 : AOM + *C. butyricum* (10^9 spores/rat/jour)

G4 : AOM + HAS

G5 : AOM + HAS + *C. butyricum* (10^9 spores/rat/jour)

Tous les rats sont sacrifiés à la 5^e semaine de l'expérience.

Nous avons intégré deux études à la méta-analyse :

Nakanishi 2003 1 : comparaison des groupes G2 et G3.

Nakanishi 2003 2 : comparaison des groupes G5 et G6.

Nous avons supposé que les données étaient sous la forme « moyenne +/- SD » (ce n'était pas précisé).

1.12. Ohkawara 2005

L'article [75] relate les résultats de trois expériences sur les conséquences de l'administration de *Butyvibrio fibrisolvens* et *Clostridium butyricum* à des souris mâles Jcl:ICR. Seule la seconde expérience nous intéresse, car c'est la seule qui étudie les conséquences sur la formation d'ACF.

L'aliment distribué aux souris est composé à 25% de protéines brutes, 51% d'extractif non azoté, et 5% de matières grasses.

Le traitement cancérogène est effectué en gavant les animaux avec du DMH (0,75mg/souris), aux jours 6 et 10 de l'expérience.

Le probiotique est également administré par gavage, avant, pendant, et après le traitement carcinogène. La première administration de probiotique est réalisée 6 jours avant la première administration de DMH.

Les animaux sont sacrifiés 28 jours après le début de l'expérience (c'est à dire 22 jours après la première administration de carcinogène).

Ohkawara *et al.* ont constitué six groupes de 10 souris :

G1 : solution saline

G2 : DMH

G3 : DMH + cellules intactes de *B. fibrosolvens* (10^9 ufc/souris/jour), 1 fois / semaine

G4 : DMH + cellules intactes de *B. fibrosolvens* (10^9 ufc/souris/jour), 3 fois / semaine

G5 : DMH + cell homogenate de *B. fibrosolvens* (0,1 mL/souris/jour), 3 fois / semaine

G6 : DMH + cellules intactes de *C. butyricum* (10^9 ufc/souris/jour), 3 fois / semaine

Les auteurs présentent pour chaque groupe le nombre d'ACF, le nombre d'AC, le nombre de foci à 1 ou 2 AC et celui des foci à 3 ou 4 AC, ainsi que l'incidence des ACF de plus de 3 AC. Les données sont sous formes de moyennes +/- SEM ; nous avons calculé les SD.

Nous n'avons utilisé que les résultats obtenus en utilisant des cellules entières de *B. fibrosolvens*. Nous avons donc inclus 2 études à la méta-analyse :

Ohkawara 2005 1 : comparaison de G2 et G3

Ohkawara 2005 2 : comparaison de G2 et G4

1.13. Park 2007

Après une première étude en 2006 [76] (exclue de la méta-analyse, voir 2.12), l'équipe de Park a poursuivi son étude des propriétés inhibitrices du cancer colorectal de *Bacillus polyfermenticus* [50].

La cancérogenèse a été induite par 6 injections hebdomadaires de DMH (30 mg/kg, SC, une fois par semaine, 6 semaines).

Le probiotique utilisé, *B. polyfermenticus*, a été mélangé à l'aliment pendant toute la durée de l'expérience, à partir d'une semaine avant la première injection de DMH. Les auteurs estiment que chaque rat en a consommé 3.10^8 ufc/j.

L'aliment standard distribué aux rats comportait 20% de caséine, 51% d'amidon, et 22% de matières grasses (10% d'huile de maïs, 12% de lard).

Trois groupes de 10 rats mâles F344, ont été utilisés.

G1 : aliment standard + solution saline

G2 : aliment standard + DMH

G3 : aliment standard + DMH + *B. polyfermenticus* (3.10^8 ufc/rat/j).

Tous les rats ont été sacrifiés la 10^o semaine de l'expérience (soit 10 semaines après le début de l'administration du probiotique, ou 9 semaines après la première injection de DMH).

L'article a été intégré à la méta-analyse sous le nom **Park 2007** (comparaison de G2 et G3)

Les auteurs ont présenté leurs résultats sous forme de graphiques ; les nombres d'ACF par côlon, d'AC par côlon, et d'AC par ACF ont été mesurés sur les graphiques. Les données étant présentées sous la forme « moyennes +/- SE », nous avons calculé les SD = SEv10.

Notons que cet article aurait peut être été exclu de la méta-analyse, car il ressemble étrangement à un autre article, celui de Lee 2007 [77]. Cependant, compte tenu de la différence dans la précision des résultats et du compte rendu, nous avons considéré que l'article de Park était vraisemblablement l'article original, et celui de Lee avait utilisé cet article comme modèle pour présenter des résultats complémentaires (Voir également 2.7).

1.14. Rao 1999

Cette étude [78] évalue les effets de *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM sur les ACF provoqués par 2 injections d'AOM (15 mg/kg, 1 semaine d'intervalle) chez des rats mâles F344.

Lactobacillus acidophilus NCFMTM a été intégré sous forme de poudre lyophilisée ($4.2.10^9$ bactéries vivantes par gramme de poudre) dans l'aliment, à partir d'une semaine avant la première injection d'AOM, et pendant toute l'expérience, à raison de 2 % (G2, soit $8.4.10^7$ ufc/g d'aliment) ou 4% (G3, soit $1.7.10^8$ ufc/g d'aliment).

Les auteurs ne précisent pas la consommation quotidienne d'aliment des rats. Les rats consomment habituellement dans ce type d'expérience 10 à 20 g d'aliment par jour, ce qui correspond à une consommation de 10^9 ufc/rat/j (G2) ou 2.10^9 ufc/rat/j (G3).

L'aliment, dérivé de l'aliment AIN76, comportait 20% de caséine, 52% d'amidon de maïs, et 5% de matières grasses (huile de maïs).

Trois groupes de 12 rats mâles chacun ont été constitués :

G1 : Contrôle (AOM)

G2 : AOM + 2% NCFMTM lyophilisés dans l'aliment

G3 : AOM + 4% NCFMTM lyophilisés dans l'aliment

Rao *et al.* ont dénombré les ACF et les AC par côlon, ainsi que le nombre de cryptes par ACF (1,2, 3 ou 4 et plus).

Cette étude a été intégrée à la méta-analyse :

Rao 1999 1 : comparaison de G1 et G2

Rao 1999 2 : comparaison de G1 et G3

L'étude a été financée par la North Carolina Dairy Foundation, Raleigh, NC, USA.

1.15. Reddy 1993

Reddy et Rivenson ont étudié dans cette étude [48] l'effet de *Bifidobacterium longum* distribué à des rats F344 mâles et femelles recevant de façon concomitante de l'IQ dans leur alimentation (IQ : 2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline).

L'aliment, dérivé de l'aliment AIN76, comportait 23,5% de caséine, 32,9% d'amidon de maïs, et 23,5% de matières grasses.

Bifidobacterium longum a été intégré sous forme de poudre lyophilisée (2.10^{10} bactéries vivantes /g de poudre) à l'aliment, à raison de 0,5% (soit 10^8 bactéries/g d'aliment).

IQ a été mélangé à l'aliment à raison de 125 ppm.

Les auteurs ne précisent pas la consommation quotidienne d'aliment des rats ; nous l'estimons à 10 à 20 g/j, ce qui correspond à une consommation de 10^9 ufc/rat/j, et $1,25.10^{-3}$ à $2,5.10^{-3}$ g de IQ/rat/jour.

Les rats ont été séparés selon leur sexe, puis au hasard en trois groupes par sexe.

Rats mâles :

Gm1 : pas d'IQ, 18 rats

Gm2 : IQ, 30 rats

Gm3 : IQ et *B. longum*, 30 rats

Rats femelles :

Gf1 : pas d'IQ, 18 rats

Gf2 : IQ, 30 rats

Gf3 : IQ et *B. longum*, 30 rats

Tous les animaux ont été sacrifiés à la 58^e semaine de l'expérience.

Les auteurs donnent sous forme de tableau l'incidence et le nombre de tumeurs.

Les 2 groupes de rats femelles n'ont pas développé de tumeurs intestinales (incidence nulle de tumeurs du côlon et de l'intestin grêle). Ces animaux ont cependant été atteints de tumeurs mammaires et hépatiques.

Les auteurs ont observé des tumeurs du côlon, de l'intestin grêle et du foie chez les rats mâles.

Nous avons intégré cet article à la méta-analyse en 2 études :

Reddy 1993 1 : rats mâles, Gm2 comparé à Gm3

Reddy 1993 2 : rats femelles, Gf2 comparé à Gf3

1.16. Rowland 1998

Cette expérience [49] a été menée sur des rats mâles Sprague-Dawley.

La cancérogenèse a été induite par 2 injections d'AOM (12,5 mg/kg) à une semaine d'intervalle.

Le probiotique *Bifidobacterium longum* a été mélangé à l'aliment à la dose de $4,1 \cdot 10^8$ bactéries viables par gramme d'aliment, à partir d'une semaine après la seconde injection d'AOM, tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience. Les rats ont consommé en moyenne 14 g d'aliment chaque jour, ce qui correspond à une dose d'environ $6 \cdot 10^9$ ufc/rat/j.

Les auteurs ont également testé les conséquences de l'administration d'inuline (un prébiotique) mélangée à l'aliment (5%), seule ou associée à *B. longum*.

L'aliment de base CO25 distribué à tous les rats est composé de 24,5% de caséine, 45% d'amidon de maïs, 25% de matières grasses (huile de maïs).

4 groupes de 15 rats ont été étudiés. Tous ont reçu le même traitement cancérigène.

G1 : CO25

G2 : CO25 + *B. longum*

G3 : CO25 + inuline

G4 : CO25 + *B. longum* + inuline

Les nombres moyens d'ACF, ACF à moins de 4 AC, et ACF à 4 AC et plus ont été mesurés sur les graphiques. Les données sont de la forme « moyenne +/- SEM », nous avons calculé les SD.

Nous avons divisé cet article en deux études pour l'inclure à la méta-analyse :

Rowland 1998 1 : comparaison de G1 et G2

Rowland 1998 2 : comparaison de G3 et G4

1.17. Takano 1985

Takano et son équipe ont mené trois expériences pour étudier les effets du lait aigre, fermenté par *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* et *Candida utilis*, sur la longévité et la tumorogénèse chez des souris et des rats. Cet article [79] relate les résultats des 3 expériences.

Les deux premières expériences ne nous intéressent pas dans le cadre de notre méta-analyse : les auteurs ont évalué, chez des souris ICR, les effets du lait aigre sur la longévité et le développement de tumeurs ascitiques Ehrlich.

Dans la troisième expérience, les auteurs ont évalué les effets du lait aigre sur les tumeurs colorectales chimio-induites par 16 injections de DMH (20 mg/kg IP, une fois par semaine) chez des rats mâles F344.

L'alimentation de tous les rats a la même composition chimique : 25% de protéines, 60% d'extractif non azoté, et 4% de matières grasses.

L'alimentation expérimentale a été distribuée à tous les rats du début (1[°] injection de DMH) à la fin de l'expérience.

4 groupes de rats ont été étudiés :

G1 : aliment de contrôle

G2 : aliment de contrôle et lait aigre acidifié par *L. helveticus* et *C. utilis*

G3 : aliment de contrôle et lait acidifié par 2,4% d'acide lactique

G4 : aliment de contrôle et ferments (*L. helveticus* et *C. utilis*)

Les rats ont tous été sacrifiés 10 semaines après la dernière injection de DMH, c'est à dire après 26 semaines d'alimentation expérimentale.

Nous avons intégré l'article en deux études à la méta-analyse :

Takano 1985 1 : comparaison des groupes G1 et G4

Takano 1985 2 : comparaison des groupes G2 et G3

Les auteurs donnent l'incidence des tumeurs colorectales (nombre de rats atteints pour chaque groupe) et le nombre moyen de tumeurs par rats, sous forme de moyenne, sans écart type. Nous avons donc uniquement utilisé les données de l'incidence.

1.18. Yamazaki 2000

L'article [80] relate les résultats de deux expériences menées sur des rats mâles Sprague-Dawley.

Le probiotique utilisé est un *Lactobacillus casei* ssp. *Shirota* (LcS) lyophilisé, mélangé dans l'aliment.

L'aliment de base distribué est composé de 54% d'amidon, 24% de protéines, 5% de matières grasses, et 3,2% de fibres.

Les deux expériences diffèrent notamment par le traitement carcinogène, la durée de l'expérience, et les critères de jugements étudiés.

► *Expérience 1 : expérience à court terme*

	n	Carcinogène	LcS	Endpoint
G1	20	Eau distillée	-	ACF par côlon ACF > 4 AC, par côlon
G2	20	AOM, 15 mg/kg/sem, 5 semaines	-	
G3	20	AOM, 15 mg/kg/sem, 5 semaines	10^{10} ufc/rat/j, du début à la fin de l'expérience	

Les rats des groupes A, B et C ont été sacrifiés à 8 ou 12 semaines. Cependant, le nombre de rats de chaque groupe sacrifiés à ces dates n'est ni spécifié, ni calculable. Nous n'avons donc pas pu intégrer cette étude à la méta-analyse.

► *Expérience 2 : expérience à long terme*

	n	Carcinogène	LcS	Endpoint
G4	10	Eau distillée		Tumeurs
G5	15	AOM, 7,4 mg/kg/sem, 10 semaines		
G6	15	AOM, 7,4 mg/kg/sem, 10 semaines	10^{10} ufc/rat/j, du début à la fin de l'expérience	

Tous les rats de cette expérience ont été sacrifiés à 25 semaines après la première injection d'AOM.

Seule l'incidence des tumeurs a pu être utilisée dans la méta-analyse. Les données concernant le nombre de tumeurs sont en effet des moyennes, sans écart-type.

Seule l'expérience 2 a été intégrée à la méta-analyse (**Yamazaki 2000** : comparaison de G5 et G6).

2. Articles exclus

2.1. Balansky 1999

Balansky *et al.* [42] ont mené une série d'expériences sur des rats BD6 et des hamsters dorés. La cancérogenèse a été induite par 20 injections hebdomadaires de DMH (21 mg/kg/sem) chez les rats, et l'ajout de DEN (diethylnitrosamine) à l'aliment des hamsters. Le DEN induit des tumeurs des voies respiratoires supérieures chez les hamsters ; seules les expériences chez le rat pourraient nous intéresser pour la méta-analyse.

L'aliment de base distribué aux rats est un aliment standard pour rongeurs. Du lait écrémé fermenté par l'une des 2 souches bactériennes *Lactobacillus bulgaricus* souche LBB.B144 ou *Lactobacillus bulgaricus* souche LBB.B5 a été ajouté à l'alimentation de certains groupes de rats. Le lait fermenté a été ajouté sous forme lyophilisée, 5 jours par semaines, pendant toute la durée de l'expérience à partir de 3 semaines avant la première injection de DMH.

Des rats mâles et femelles ont été utilisés ; pour chaque sexe, les mêmes 7 groupes (avec le même nombre de rats dans chaque groupe) ont été étudiés :

	n	DMH	Régime alimentaire
G1	32	+	aliment standard
G2	24	+	aliment standard + lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i> LBB.B144 (2,5 g/rat/j)
G3	24	+	aliment standard + lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i> LBB.B144 (1,3 g/rat/j)
G4	24	+	aliment standard + lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i> LBB.B5 (2,5 g/rat/j)
G5	10	-	aliment standard + lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i> LBB.B144 (2,5 g/rat/j)
G6	10	-	aliment standard + lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i> LBB.B144 (1,3 g/rat/j)
G7	10	-	aliment standard + lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i> LBB.B5 (2,5 g/rat/j)

Les 268 rats utilisés ont été sacrifiés 8 mois après la première injection de DMH.

Nous n'avons pas inclus cet article dans la méta-analyse : en effet, l'objectif de l'étude était d'évaluer l'effet du lait fermenté par les Lactobacilles sur les tumeurs. Notre méta-analyse porte uniquement sur l'effet des probiotiques (Lactobacilles dans le cas présent). Or, le groupe G1, qui est le seul qui aurait pu servir de contrôle, a été nourri avec l'aliment standard. Pour pouvoir évaluer de façon rigoureuse l'effet des Lactobacilles, il aurait fallu que les groupes contrôles reçoivent du lait mélangé à leur alimentation (lait écrémé éventuellement acidifié, dans les mêmes proportions que pour les groupes « lait fermenté »).

2.2. Gallaher 1996

Cet article [81] décrit quatre expériences menées par l'équipe de Gallaher sur des rats mâles Wistar.

Dans toutes les expériences, la cancérogenèse a été induite par l'administration de DMH (15 mg/kg), par gavage, deux fois à une semaine d'intervalle.

Remarquons que la description du protocole des expériences est un peu confuse et assez difficile à comprendre.

L'aliment de base distribué aux rats (tous les groupes, toutes les expériences) était une version modifiée de l'AIN-76 (20% de protéines, 45% d'amidon de maïs, 10% d'huile de maïs).

Le « traitement » a débuté une semaine après la seconde administration de DMH.

Plusieurs groupes ont été constitués pour chaque expérience. Chacun a reçu en plus de l'aliment standard :

► *Expérience 1 :*

G1 : Lait écrémé

G2 : Bifidobactéries et FOS

► *Expérience 2 :*

G1 : Solution saline

G2 : Lait écrémé

G3 : Bifidobactéries

G4 : Bifidobactéries et FOS

G5 : Lait écrémé et FOS

► *Expérience 3 :*

G1 : Lait écrémé

G2 : Bifidobactéries

G3 : Bifidobactéries et FOS

G4 : Lait écrémé et FOS

► *Expérience 4 :*

G1 : Lait écrémé

G2 : Lait écrémé et FOS

G3 : Bifidobactéries et FOS

G4 : *Lactobacillus acidophilus* et FOS

G5 : Bifidobactéries, *Lactobacillus acidophilus* et FOS

Les rats ont été sacrifiés à 24 et 25 jours pour la première expérience, 29 à 35 jours pour la seconde, et 28 à 31 jours pour la troisième. Nous ignorons si le même nombre de rats de

chaque groupe a été tué à chaque fois. Les rats de la quatrième expérience ont été sacrifiés en dupliqué (un rat de chaque groupe), du jour 44 au jour 66.

Parmi tous les groupes cités ci-dessus, seuls deux seraient comparables : les groupes 1 et 3 de l'expérience 2. Parmi tous les autres, il n'y a pas, au sein d'une même expérience, de groupe « probiotique » qui reçoive exactement le même régime alimentaire qu'un groupe contrôle sans probiotique.

Or, les résultats pour les deux groupes qui pourraient nous intéresser (de même que pour la plupart des autres groupes) ne sont pas répartis de façon normale : les auteurs présentent les résultats sous forme de médianes, accompagnées des premiers et troisièmes quartiles pour chaque groupe.

Nous avons donc exclu cet article de la méta-analyse.

2.3. Gallaher 1999

Gallaher et Khil ont étudié les effets de symbiotiques sur la Cancérogenèse colique chimio-induite par le DMH chez des rats [82]. Ils reprennent dans cet article les résultats publiés dans l'article « Gallaher 1996 » [81]. Le protocole des expériences n'est pas décrit. En outre, il semble que ces expériences étudient uniquement les effets de bifidobactéries associées à différents prébiotiques.

Nous avons donc exclu cet article de la méta-analyse.

2.4. Horie 1999

Horie et son équipe ont étudié l'influence de la flore intestinale sur le développement des tumeurs coliques chimio-induites chez des souris par 10 injections de DMH (une injection par semaine, 15 mg/kg) [83].

9 groupes de 16 à 20 souris ont été étudiés : un groupe axénique, 6 groupes gnotoxéniques (gavés avec l'une des espèces bactériennes suivantes : *Mitsuokella multiacida*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium longum*, *Clostridium paraputrificum*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*), un groupe « conventionalisé » avant le traitement carcinogène, et un groupe « conventionalisé » après le traitement carcinogène. Les souris « conventionalisées » ont été gavées avec les selles de souris normales.

Les souris ont été sacrifiées 24 semaines après la dernière injection de DMH.

Aucune étude n'a pu être intégrée à la méta-analyse, car il aurait fallu comparer l'un des groupes gnotoxéniques « *L. acidophilus* » ou « *B. longum* » au groupe axénique. Or, nous avons précisé dans le protocole que nous désirions utiliser uniquement des animaux avec une flore digestive naturelle.

2.5. Koo 1991

L'expérience rapportée dans cet article [84] étudie les effets de l'administration par voie orale de Bifidobactéries sur les cryptes aberrantes induites chez des souris femelles CF1 ayant reçu 6 injections hebdomadaires de DMH (20 mg/kg/sem).

Les Bifidobactéries utilisées ont été isolées des selles de souris CF1. Elles ont été administrées par gavage à partir d'une semaine après la dernière injection de DMH, jusqu'au sacrifice des souris (10^9 ufc/souris, deux fois par semaines).

L'aliment de base utilisé est l'aliment AIN76A.

3 groupes de souris ont été étudiés :

G1 : DMH + AIN76 + Néosugar + Bifidobactéries

G2 : DMH + AIN76

G3 : AIN76

4 souris des groupes 1 et 2, et 2 souris du groupe 3 sont sacrifiées 18 semaines après la dernière injection de DMH.

3 souris des groupes 1 et 2, et 1 souris du groupe 3 sont sacrifiées 28 semaines après la dernière injection de DMH.

Les autres souris (respectivement 13, 14 et 2) sont sacrifiées 38 semaines après la dernière injection de DMH.

Nous avons exclu cet article de la méta-analyse, car il étudie un synbiotique, et non un probiotique.

2.6. Kulkarni 1994

Des rats F344 mâles ont été utilisés ici pour étudier l'effet de *Bifidobacterium longum* sur les ACF induits par 2 injections d'AOM (20 mg/kg) à une semaine d'intervalle. La description du protocole est un peu confuse.

Les rats ont été nourris avec un aliment composé de 20% de caséine, 52% d'amidon de maïs, et 5% de matières grasses.

Le probiotique lyophilisé (2.10^{10} bactéries viables par gramme) a été mélangé à l'aliment, à hauteur de 1,5% ou 3%, 5 semaines avant la première injection d'AOM, et jusqu'à la fin de l'expérience.

Il semble que 4 groupes de rats aient été constitués et sacrifiés 6 semaines après la seconde injection d'AOM :

G1 : contrôle négatif (injections de solution saline)

G2 : contrôle positif (injections d'AOM)

G3 : AOM + 1,5% *B. longum*

G4 : AOM + 3% *B. longum*

Le nombre d'animaux de chaque groupe est inconnu.

Nous avons exclu cet article de la méta-analyse en raison des incertitudes portant sur le protocole, notamment en ce qui concerne les nombres de rats.

2.7. Lee 2007

L'équipe de Lee s'est intéressée aux propriétés de *Bacillus polyfermenticus* [77]. L'article est la synthèse d'expériences *in vitro* et *in vivo* de la souche SCD.

L'expérience *in vivo* a utilisé deux groupes de 9 rats mâles F344, qui ont reçu 6 injections de DMH à une semaine d'intervalle (DMH : 30 mg/kg, SC, une fois par semaine, 6 semaines).

L'aliment standard distribué aux rats comportait 51% d'amidon, 20% de caséine, et 22% de matières grasses.

G1 : groupe contrôle : aliment standard.

G2 : aliment standard et *B. polyfermenticus* (3.10^6 ufc/j/rat, pendant toute la durée de l'expérience, à partir d'une semaine avant la première injection de DMH).

Tous les rats ont été sacrifiés 10 semaines après le début de l'expérience.

Nous avions dans un premier temps inclus cette étude à la méta-analyse ; elle présente en effet les critères définis dans le protocole. Cependant, le protocole expérimental est identique à celui décrit dans l'article de Park 2007 [50], à l'exception du nombre de rats par groupe (9 chez Lee, 10 pour Park) et de bactéries administrées (3.10^6 ufc/j/rat au lieu de 3.10^8 ufc/j/rat). Les résultats présentés dans chacun des deux articles sont les mêmes (à une petite différence près, mais nous les avons mesurés sur les graphiques dans les deux cas).

Park est noté en deuxième auteur de l'article de Lee ; il est vraisemblable que les résultats des deux articles soient issus d'une même expérience.

Nous aurions pu exclure les deux articles ; comment savoir lequel est exact ? Nous avons cependant choisi de conserver les résultats de Park pour l'intégrer à la méta-analyse globale, car cet article est très clair, très détaillé, et les résultats sont complets.

2.8. Marotta 2003

Cet article [61] a été exclu de la méta-analyse car le protocole décrit dans l'article, ainsi que les résultats présentés arboraient plusieurs anomalies.

Pour dénombrer les ACF dans les côlons des rats sacrifiés, Marotta ne précise pas qu'il colore les tissus. Par contre, pour dénombrer les tumeurs, les côlons sont colorés à l'hémalun-éosine, alors qu'il n'est pas nécessaire de procéder à une coloration pour ce type de mesure. De plus, à en croire le procédé décrit, les côlons subissent une seconde coloration, au bleu de méthylène cette fois, afin d'établir la nature histologique des tumeurs, ce qui paraît aberrant. Enfin, les résultats discutés dans le texte sont différents de ceux présentés dans le tableau récapitulant le nombre de tumeurs observées...

2.9. Ohno 2000

Des souris transgéniques mâles et femelles, porteuses du gène humain eHa-ras ont été utilisées dans cette expérience [85]. Elles ont reçu 20 injections de DMH (20 mg/kg, une fois par semaine, 20 semaines). De la pectine de pomme et/ou un condensé de culture de *Bifidobacterium longum* ont été ajoutés à leur alimentation.

Toutes les souris ont été sacrifiées 4 semaines après la dernière injection de DMH.

Cette étude a été exclue de la méta-analyse : elle utilise des souris transgéniques, et non un modèle de cancérogenèse chimio-induite, et un condensé de culture en guise de probiotique, et, qui plus est, ne précise en rien les conditions d'obtention de cette substance.

2.10. O'Mahony 2001

O'Mahony *et al.* ont étudié le développement de tumeurs colorectales chez des souris IL-10 knockout, en l'absence ou en présence de *Lactobacillus salivarius* [86].

Cette étude n'a pas été incluse dans la méta-analyse ; en effet, les tumeurs ne sont pas chimio-induites.

2.11. Onoue 1997

L'article [87] comporte deux études dont l'objectif est d'éclaircir le rôle joué par la flore intestinale dans l'induction d'ACF par le DMH chez des rats. Pour ce faire, Onoue *et al.* ont utilisé des rats mâles et femelles F344/Yit axéniques de 10 semaines.

Dans la première étude, les rats ont été répartis en 3 groupes :

GF : « Germ free », rats axéniques

GB : gnotobiotiques, rats axéniques auxquels a été associé une flore intestinale qualifiée «à haut risque » par les auteurs, car ils ont sélectionné des souches bactériennes reconnues pour leurs capacités à synthétiser des mutagènes ou des cancérogènes (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. uniformis*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium coccoides*, *C. cocleatum*, *C. oroticum*, *C. clostridiforme*, *Escherichia coli*).

Cvd : « Conventionalized », rats axéniques inoculés par voie orale avec une suspension fécale provenant d'un rat normal « conventionnel ».

Dans la seconde étude, seuls 2 groupes de rats ont été constitués.

GB : gnotobiotiques (même flore que précédemment)

GB+B : gnotobiotiques + *Bifidobacterium breve*

Les rats GB et Cvd ont été inoculés par voie orale avec les bactéries voulues, 3 semaines avant la première injection de DMH.

Tous les rats ont reçus deux injections de 20 mg/kg de DMH à une semaine d'intervalle.

Après la seconde injection de DMH, les rats ont été nourris avec un aliment riche en matières grasses (14.4%) et en protéines (34.1%) afin de favoriser le développement des ACF.

Les rats ont été sacrifiés 11 et 34 semaines après la seconde injection de DMH afin de dénombrer les ACE.

Aucune de ces études n'a été incluse dans la méta-analyse.

La première n'utilisait pas de probiotique.

La première n'utilisait pas de probiotique. La seconde utilisait un probiotique, *Bifidobacterium breve*, mais le groupe contrôle était constitué par des rats gnotoxéniques dont la flore intestinale était uniquement constituée de bactéries favorables au développement du cancer.

2.12. Park 2006

Les auteurs de cet article [76] ont étudié les effets d'un aliment complémenté avec *Bacillus polyfermenticus* et d'autres substances « physiologiquement actives » sur la formation d'ACF et le système anti-oxydant de rats mâles F344 traités par le DMH.

Pour ce faire ils ont étudié 3 groupes de rats.

G1 : Aliment standard + saline

G2 : Aliment standard + DMH

G3 : Aliment standard + DMH + complément alimentaire contenant *Bacillus polyfermenticus*.

Parmi les autres « composés physiologiquement actifs » du complément distribué aux rats du groupe 3, il y a du chitosan, de la chicorée, de l'a-tocophérol et des flavonoïdes.

Il nous a paru incorrect d'inclure cette étude dans la méta-analyse, car l'alimentation du groupe témoin et celle du groupe « probiotique » ne sont pas comparables.

2.13. Shackelford 1983

Au cours de cette expérience [88], des rats femelles F344 soumises à des injections de DMH (20 mg/kg/sem, 20 semaines) ont reçu du lait fermenté par *Lactobacillus bulgaricus* ou *Streptococcus thermophilus* mélangé à leur eau de boisson. Après 36 semaines de ce régime, commencé 2 semaines avant la première injection de DMH, les rates ont été sacrifiées, et les tumeurs colorectales, intestinales et du conduit auditif ont été dénombrées.

Toutes les rates ont été alimentées pendant toute la durée de l'expérience avec un aliment pour rongeurs standard.

4 groupes de 30 animaux ont été étudiés :

G1 : aliment standard, et lait écrémé mélangé à l'eau

G2 : aliment standard, et lait fermenté par *S. thermophilus* mélangé à l'eau

G3 : aliment standard, et lait fermenté par *L. bulgaricus* mélangé à l'eau

G4 : aliment standard et eau

Les animaux des groupes 1, 2 et 3 ont reçu des injections de DMH. Les animaux du groupe 4 ont reçu des injections de solution saline.

Nous avons choisi d'exclure cet article de la méta-analyse pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, rien ne permet d'indiquer le nombre de bactéries consommées par les animaux. Ensuite, le nombre de tumeurs indiqué par les auteurs est le nombre total de tumeurs pour l'ensemble du groupe, nous ne disposons pas de la répartition des tumeurs chez les animaux (la moyenne est calculable, pas l'écart-type).

Enfin, les auteurs présentent un taux de survie à 36 semaines pour chaque groupe, ce qui nous a permis de calculer le nombre d'animaux effectivement utilisés pour les analyses des tumeurs (respectivement 22, 27, 28 et 30). Or, dans le tableau des incidences et du nombre de tumeurs, les auteurs précisent que le nombre d'animaux de chaque groupe est égal à 28, ce qui ne correspond ni au nombre initial d'animaux dans chaque groupe, ni au nombre d'animaux survivants à l'issue des 36 semaines. L'incidence des tumeurs est donc impossible à calculer.

2.14. Tavan 2002

Le cancérogène utilisé dans cette expérience [56] est un mélange d'amines aromatiques hétérocycliques : IQ (2-amino-3-méthylimidazo[4,5-*f*]quinoline), MeIQ (2-amino-3,4-diméthylimidazo[4,5-*f*]quinoline), et PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine) en quantité équivalente.

Ce mélange a été administré chaque jour pendant 7 semaines à des rats mâles F344, dans leur aliment. La dose totale de HAA consommée par les rats est 250 mg.

L'aliment de base distribué aux rats est un aliment pour rongeurs du commerce.

A cela a été ajouté soit du lait écrémé, soit du lait écrémé fermenté par *Bifidobacterium animalis* DN 173-010 (souche Danone, utilisée dans les yaourts Activia) ou *Streptococcus thermophilus* DN 001-158 (également fourni par Danone).

Le lait a été ajouté dans l'aliment du début à la fin de l'expérience. Les HAA ont été ajoutées pendant les 7 premières semaines de l'expérience.

4 groupes de 8 rats ont été étudiés :

G1 : aliment + HAA + 20% eau

G2 : aliment + HAA + 30% lait écrémé

G3 : aliment + HAA + 30% lait écrémé fermenté par *B. animalis*

G4 : aliment + HAA + 30% lait écrémé fermenté par *S. thermophilus*

Les animaux qui ont reçu le lait fermenté ont consommé en moyenne $5,4 \cdot 10^8$ ufc/rat/j.

Tous ces rats ont été sacrifiés 15 semaines après le début de l'expérience.

Les auteurs ont indiqué sous forme de tableau le nombre de rats avec des cryptes aberrants et le nombre de cryptes aberrantes par rat porteur (moyennes +/- SD).

Nous n'avons pas pu inclure cet article à la méta-analyse, car les données ne correspondent pas aux critères de jugement retenus. En effet, nous avons décidé d'étudier l'incidence et éventuellement la multiplicité des tumeurs, ou le nombre de cryptes aberrantes ou de foyers de cryptes aberrantes. Dans le cas des cryptes aberrantes et ACF, ce nombre est une moyenne calculée sur l'ensemble des animaux du groupe, car l'incidence est de 100%. Il est inutile d'inclure une étude dans la méta-analyse si l'on ne peut pas comparer les données avec celles d'autres études.

3. Bilan des données recueillies

Nous avons retenu 18 articles parmi les 31 qui correspondaient à la question de recherche. De ces 18 articles, nous avons extrait 44 études.

3.1. Critères de jugement

17 études, pour un total de 680 animaux, ont utilisé les tumeurs comme critère de jugement. L'incidence des tumeurs est toujours disponible, le nombre de tumeurs par rat atteint de tumeur ne l'est que dans 4 études.

Les animaux ont été sacrifiés 20 à 58 semaines après le début du traitement carcinogène.

27 études (501 animaux) ont utilisé les ACF comme critère de jugement ; 9 ont utilisé les cryptes aberrantes (178 animaux). Certains auteurs donnent à la fois un nombre d'ACF et un nombre de cryptes aberrantes. Le nombre d'ACF à plus de 4 cryptes aberrantes est disponible dans 4 études (108 animaux).

3.2. Animaux

L'espèce animale la plus utilisée dans les études retenues est le rat. Trois études uniquement utilisent des souris.

Toutes les souris utilisées sont de la souche ICR ; les rats sont des rats Fischer 344 (F344), ou Sprague-Dawley (environ moitié moitié), à l'exception d'une étude qui utilise des rats Wistar. Les mâles sont les animaux les plus utilisés pour les deux espèces : une seule étude a utilisé des femelles (rates F344, dans l'essai « Reddy 1993 2 »).

3.3. Régimes alimentaires

On peut distinguer deux grandes catégories d'aliment : ceux riches en matières grasses (20% de matières grasses ou plus) et ceux pauvres en matières grasses (4 à 5%).

La teneur en protéines des aliments est moins variable que la teneur en matières grasses : 18 à 25%.

La teneur en amidon est également très variable : 15% dans les expériences de Goldin en 1996 [71], 70% dans les expériences de Bolognani en 2001 [67]. Cela influe certainement sur la cancérogenèse, d'une part parce que l'amidon est le substrat qui donne le plus de butyrate lorsqu'il est fermenté, et d'autre part parce qu'un aliment composé de 70% d'amidon, 20% de protéines et 5% de matières grasses ne contient quasiment pas de fibres. Cependant, nous n'avons pas relevé la teneur en fibres des aliments distribués, car elle était rarement disponible.

3.4. Probiotiques

Deux genres sont très représentés dans les études retenues : *Bifidobacterium* (13 études sur 44) et *Lactobacillus* (27 études sur 44). Deux études utilisent à la fois des Lactobacilles et des Bifidobactéries.

La plupart des Bifidobactéries étudiées sont des *B.longum*, et les Lactobacilles sont surtout *L.acidophilus* et *L.casei*.

Trois études ont étudié uniquement le rôle anti-promoteur des probiotiques (Fukui 2001, Rowland 1998 1, et Rowland 1998 2).

Le rôle anti-initiateur des probiotiques (administration pendant ou avant et pendant le traitement carcinogène) a été étudié dans cinq études (Abdelali 1995 1, Abdelali 1995 2, Bolognani 2001 1b, Reddy 1993 1 et Reddy 1993 2).

Dans toutes les autres études, les probiotiques ont été administrés à la fois pendant et après (et éventuellement avant) le traitement carcinogène, ce qui ne permet pas d'identifier la phase de la cancérogenèse sur laquelle agissent les probiotiques.

Les doses de probiotiques administrées varient entre 4.10^7 et 2.10^{10} ufc/animal/jour. Cependant, les doses les plus courantes sont comprises entre 10^9 et 6.10^9 ufc/animal/j (23 études).

3.5. Carcinogènes

Le traitement carcinogène a été effectué avec des amines hétérocycliques pour trois études (IQ dans 2 études (Reddy 1993 1 et 2), MNU dans une étude (Bolognani 2001 1e)). Tous les autres traitements ont été effectués avec de l'AOM ou du DMH.

Les doses totales d'AOM injectées vont de 25 mg/kg (2 injections de 12,5 mg/kg à une semaine d'intervalle) à 74 mg/kg (10 injections de 7,4 mg/kg à une semaine d'intervalle, Yamazaki 2000). Cependant, à l'exception de Yamazaki, tous les auteurs ayant utilisé l'AOM ont réalisé 2 injections, de 12,5 à 16 mg/kg.

Les doses cumulées de DMH injectées varient entre 50 et 400 mg/kg.

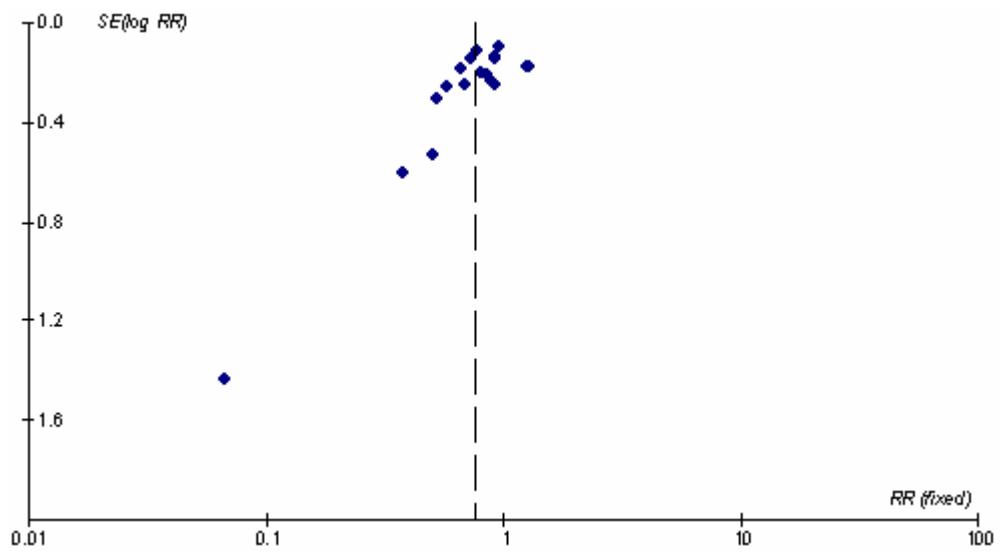


Figure 7 : Funnel plot pour le critère tumeurs

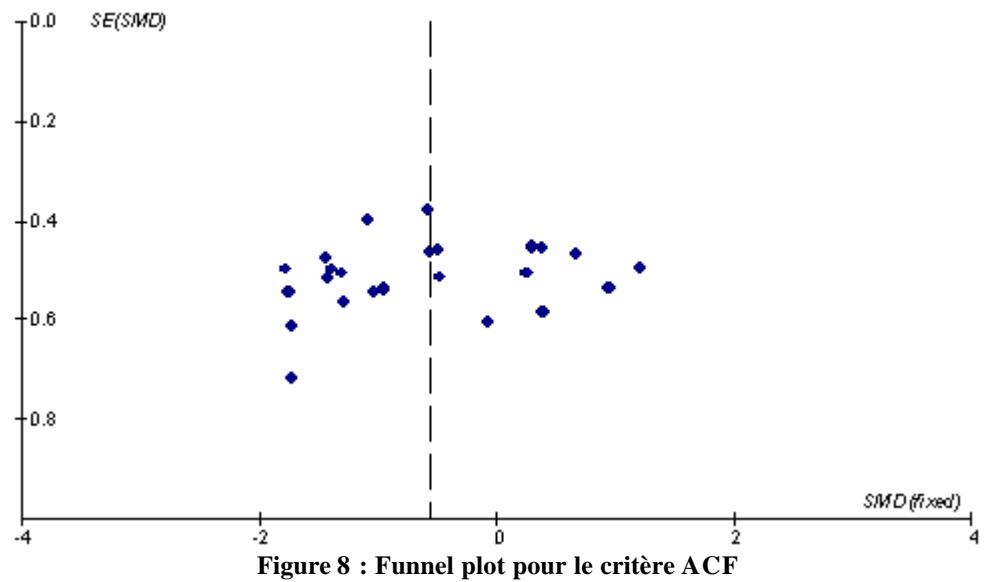


Figure 8 : Funnel plot pour le critère ACF

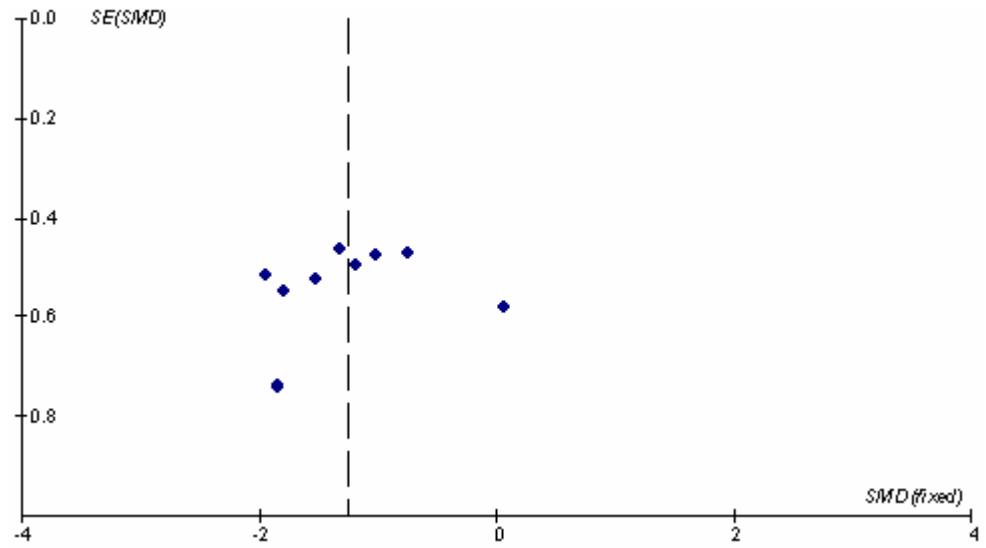


Figure 9 : Funnel plot pour le critère AC

Chapitre III

Résultats

1. Vérification de l'absence de biais de publication

L'un des biais les plus importants dans une méta-analyse est le biais de publication. En effet, lorsque l'on effectue la recherche de données, on recherche en général des données publiées. C'est ce que nous avons fait dans le cas présent. Or, les auteurs ont tendance à publier préférentiellement les études qui montrent un effet important du traitement, et il est possible que l'on ne trouve pas d'études publiées qui mettent en évidence un effet faible ou négatif de ce traitement. Afin de vérifier l'absence de ce biais, il existe une représentation graphique appelée « funnel plot », dont l'interprétation est détaillée en Annexe 3.

Nous avons réalisé un funnel plot pour chacun des critères de jugement évalué : incidence des tumeurs (Figure 7), nombre de foyers de cryptes aberrantes (Figure 8), et nombre de cryptes aberrantes (Figure 9).

Pour chaque critère étudié, le funnel plot est à peu près symétrique par rapport à l'axe vertical représentant l'estimation de l'effet global, ce qui signifie que nous avons trouvé à la fois des essais qui démontrent un effet positif, et d'autres qui démontrent un effet négatif. Le biais de publication est donc réduit pour tous les critères.

Pour le critère « incidence des tumeurs », l'erreur standard associée au risque relatif est assez réduite, à l'exception d'une étude en bas à gauche du graphique qui correspond à l'essai « Reddy 1993 2 ». Ceci signifie que les résultats sont assez précis.

Pour les critères ACF et AC, en revanche, les erreurs standards associées à l'effet standardisé sont comprises entre 0,4 et 0,8 ce qui indique une imprécision dans l'estimation de l'effet du traitement.

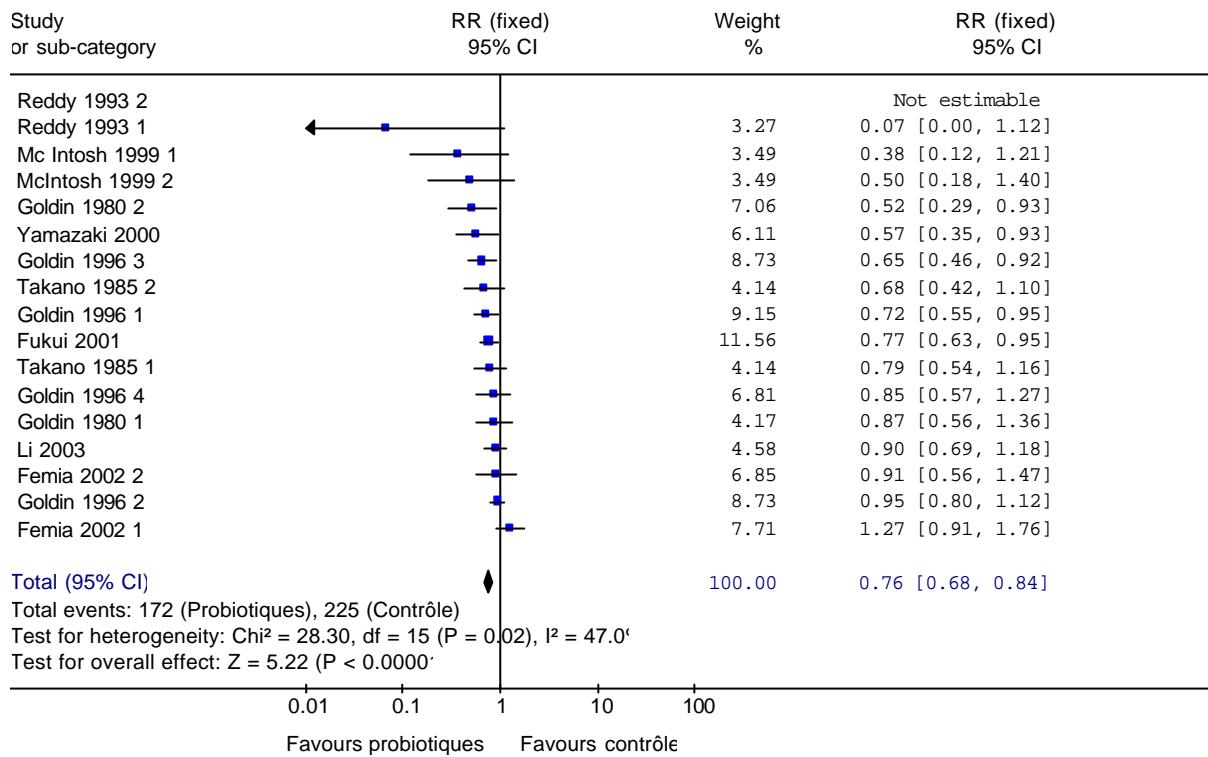


Figure 10 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle fixe

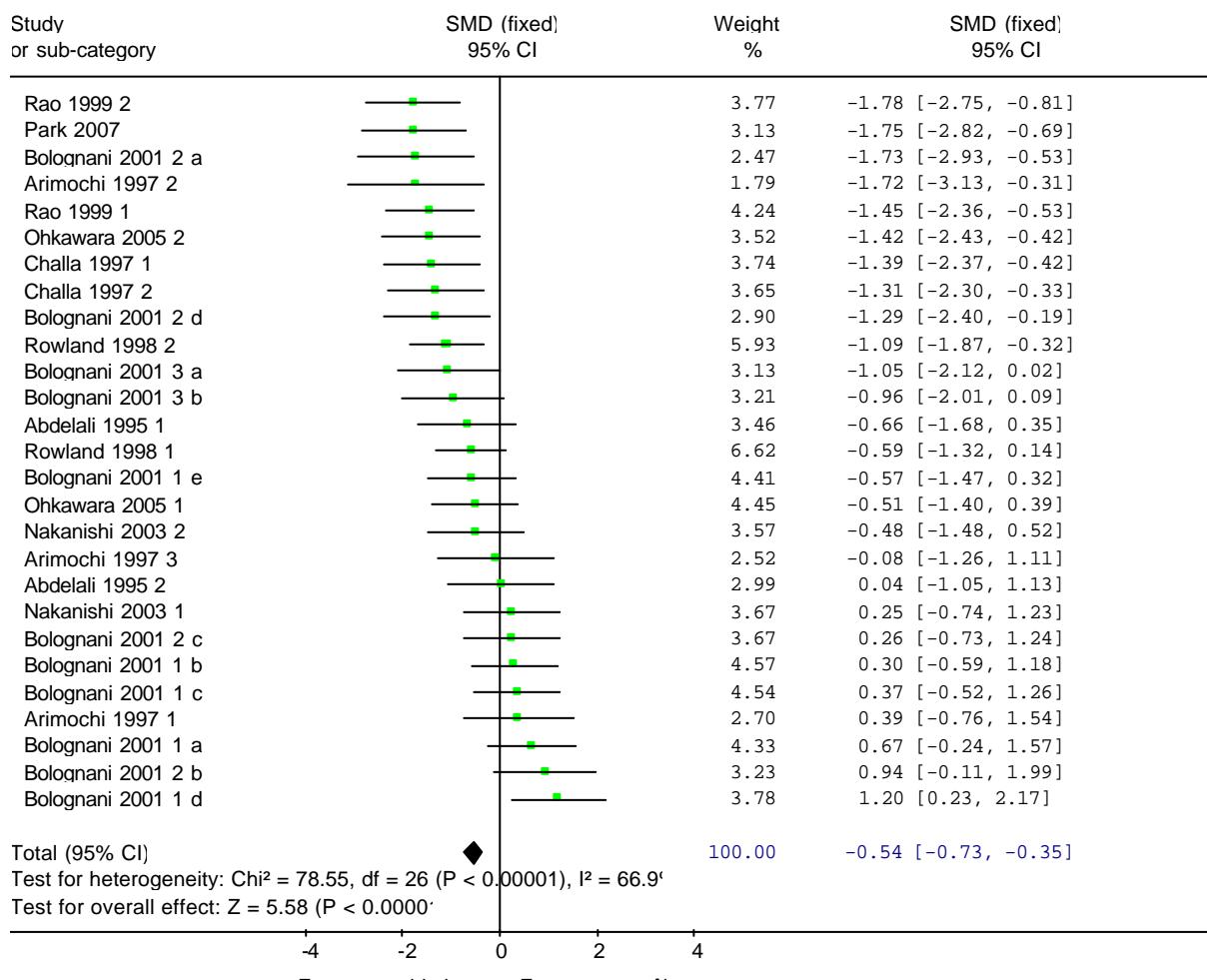


Figure 11 : Forest plot pour le critère ACF, modèle fixe

2. Méta-analyse globale utilisant un modèle fixe

Nous avions prévu dans un premier temps de faire une méta-analyse globale en utilisant un modèle fixe. Le test d'association et la notion d'homogénéité sont expliqués en Annexe 3.

2.1. Critère de jugement tumeurs, modèle fixe

La Figure 10 ci-contre présente le forest plot obtenu en utilisant tous les essais pour lesquels l'incidence des tumeurs était disponible.

L'hypothèse d'homogénéité est rejetée pour cette analyse : le «p» qui accompagne le test du chi-deux est égal à 0,02 et on utilise en général une valeur de 0,05 comme valeur seuil d'acceptation.

2.2. Critère de jugement ACF, modèle fixe

La Figure 11 ci-contre présente le forest plot obtenu en utilisant tous les essais pour lesquels le nombre d'ACF était disponible.

L'hypothèse d'homogénéité est rejetée aussi pour cette analyse : le «p» qui accompagne le test du chi-deux est inférieur à 0,00001, et même la valeur I^2 est supérieure à 66,9%.

2.3. Critère de jugement AC, modèle fixe

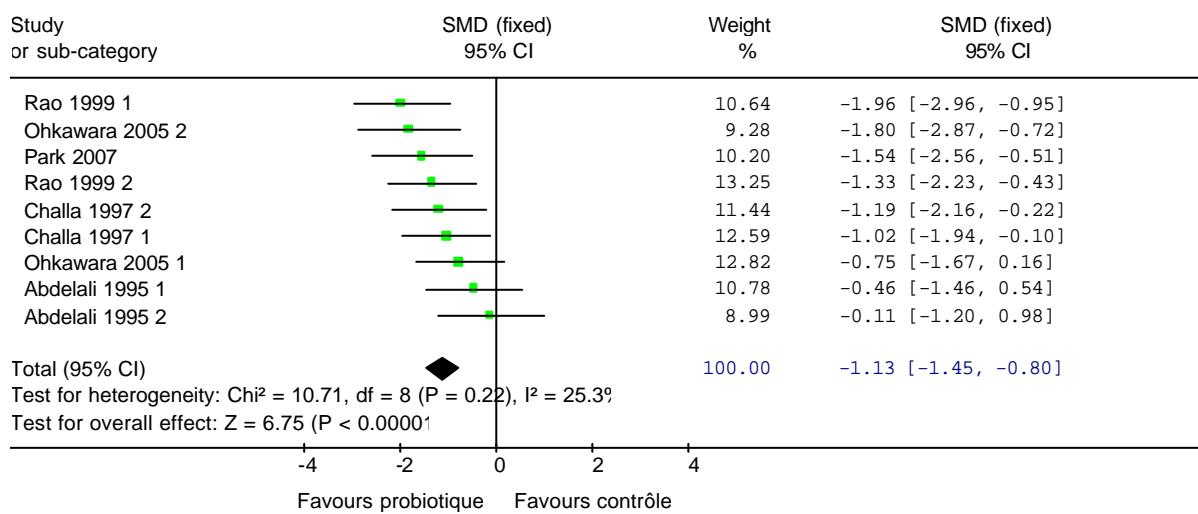


Figure 12 : Forest plot pour le critère cryptes aberrantes, modèle fixe

L'hypothèse d'homogénéité est ici acceptée, et on observe un effet standardisé significatif. Cependant, nous avons décidé de n'utiliser le modèle fixe pour aucun des critères de jugement. L'hétérogénéité observée lors de l'analyse pour les critères de jugement « incidence des tumeurs » et « ACF » est une des raisons qui nous ont amené à faire ce choix ; les autres sont détaillées dans le paragraphe suivant.

2.4. Conclusions sur l'utilisation du modèle fixe

Le modèle fixe est utilisé lorsque l'on veut obtenir la meilleure estimation possible d'un effet que l'on estime identique pour chaque essai. Dans le cas présent, les facteurs de variabilité sont si nombreux que l'on voit mal comment l'effet du traitement pourrait être le même dans chaque essai ; il varie forcément selon les différents facteurs et les interactions qui existent entre eux.

L'utilisation d'un modèle aléatoire permettra de tenir compte de cette variation de l'effet du traitement, sans pour autant expliquer l'hétérogénéité que l'on observe entre les différents essais. Nous allons donc procéder à une mét-a-analyse globale en utilisant le modèle aléatoire de Der Simonian et Laird, puis aux mét-a-analyses en sous-groupes prévues dans le protocole, afin d'étudier l'influence des différents facteurs de variation sur l'effet standardisé.

La réalisation d'une première mét-a-analyse en utilisant un modèle fixe n'est cependant pas inutile. En effet, le modèle aléatoire a pour objectif d'estimer l'effet moyen du traitement. Pour cela, ce modèle se base sur l'hypothèse que l'effet du traitement est distribué suivant une loi normale ; l'effet moyen du traitement correspond à la moyenne de cette loi normale. Lorsque l'effet du traitement que l'on étudie est réellement distribué suivant une loi (approximativement) normale, l'effet standardisé calculé avec le modèle fixe est très proche de l'effet standardisé calculé avec le modèle aléatoire ; si ce n'est pas le cas, cela signifie que l'on a calculé un effet qui ne correspond à aucune situation réelle.

Pour plus d'explications sur le modèle fixe et le modèle aléatoire, se reporter à l'Annexe 3.

3. Méta-analyse globale utilisant un modèle aléatoire

3.1. Critère de jugement incidence des tumeurs

Nous avons dans un premier temps réalisé une méta-analyse globale (utilisant tous les essais) en modèle aléatoire (Figure 13).

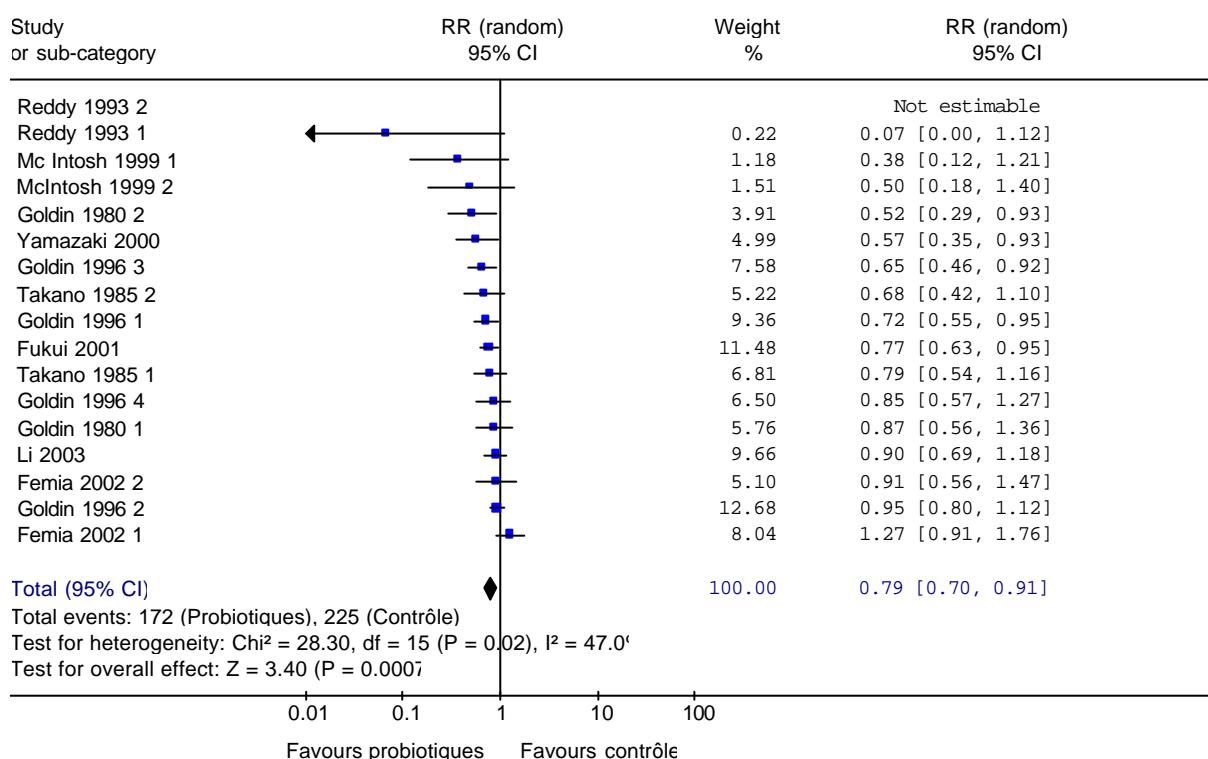


Figure 13 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, tous les essais

Remarquons tout d'abord que le modèle aléatoire prend en compte l'hétérogénéité dans le calcul du risque relatif, mais il ne permet ni d'éliminer ni d'expliquer cette hétérogénéité (le « p » du test du chi-deux est toujours le même).

On peut également remarquer que le risque relatif (RR) calculé en utilisant le modèle aléatoire est assez proche de celui calculé avec le modèle fixe. Nous pouvons donc considérer que le choix du modèle aléatoire n'est pas abusif, et que l'effet est représentatif d'une situation réelle.

L'hypothèse nulle du test d'association est rejetée, avec une valeur p de 0,0004, ce qui signifie que l'effet des probiotiques sur l'incidence des tumeurs est statistiquement différent de zéro. Le risque relatif pour le critère incidence des tumeurs est de 0,79. Cela signifie que l'administration des probiotiques aux rats multiplie leur « chance » de développer une ou plusieurs tumeurs par 0,79 par rapport aux rats qui ne reçoivent pas de probiotiques.

3.2. Critère de jugement ACF

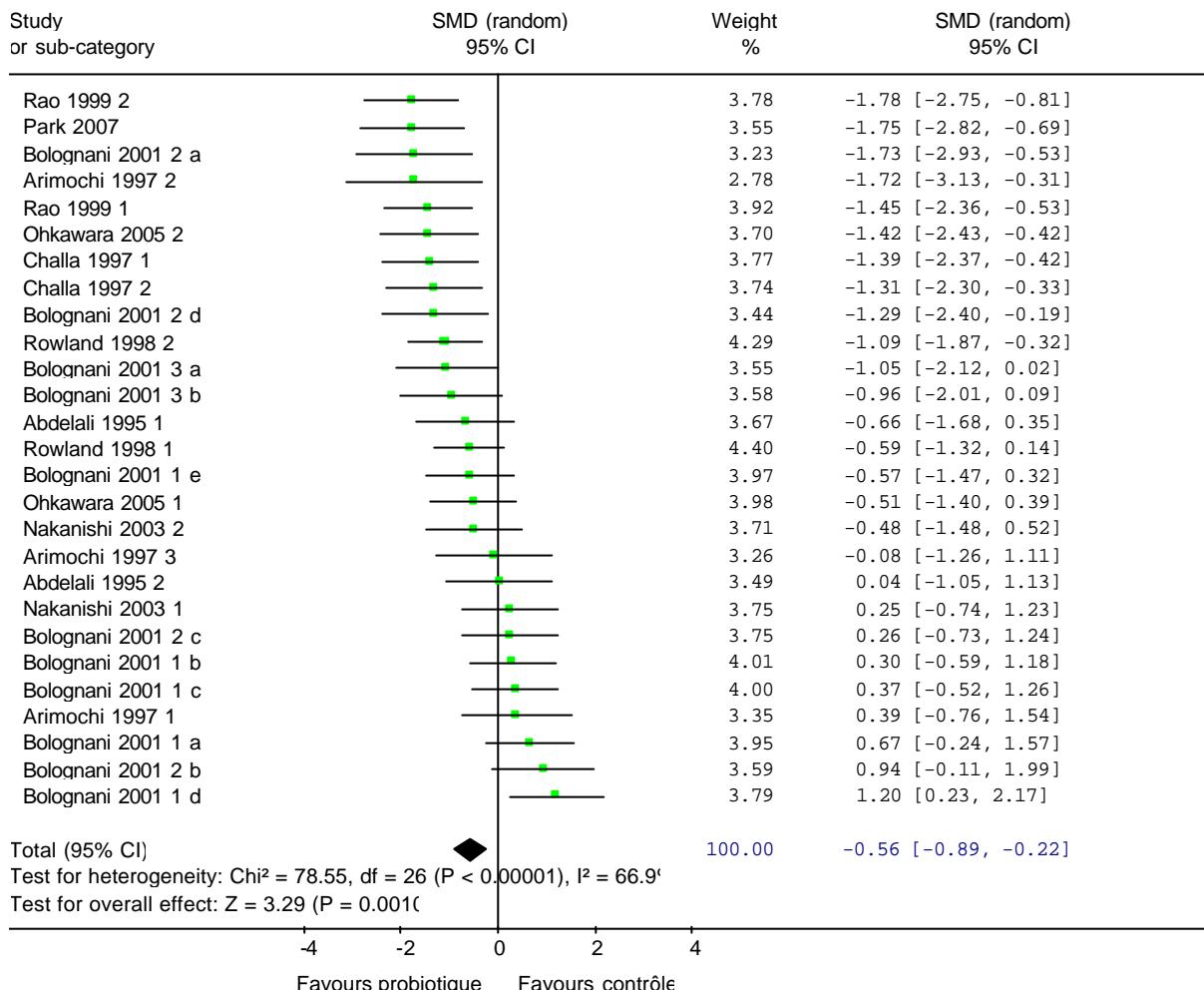


Figure 14 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, tous les essais

On constate ici encore que le recours au modèle aléatoire n'a pas permis d'éliminer l'hétérogénéité (ce n'est pas son rôle).

L'estimation de l'effet standardisé commun (ES) est assez proche de celle que l'on avait obtenue en utilisant un modèle fixe (-0,56 en modèle aléatoire contre -0,54 en modèle fixe). La pertinence de l'utilisation du modèle aléatoire n'est donc pas remise en cause.

L'effet des probiotiques sur le critère ACF est statistiquement différent de 0 (rejet de l'hypothèse nulle du test d'association).

L'effet standardisé commun est estimé à -0,56. Son intervalle de confiance à 95% est égal à [-0,89;-0,22]. Cet effet standardisé correspond à une taille d'effet moyenne.

3.3. Critère de jugement AC

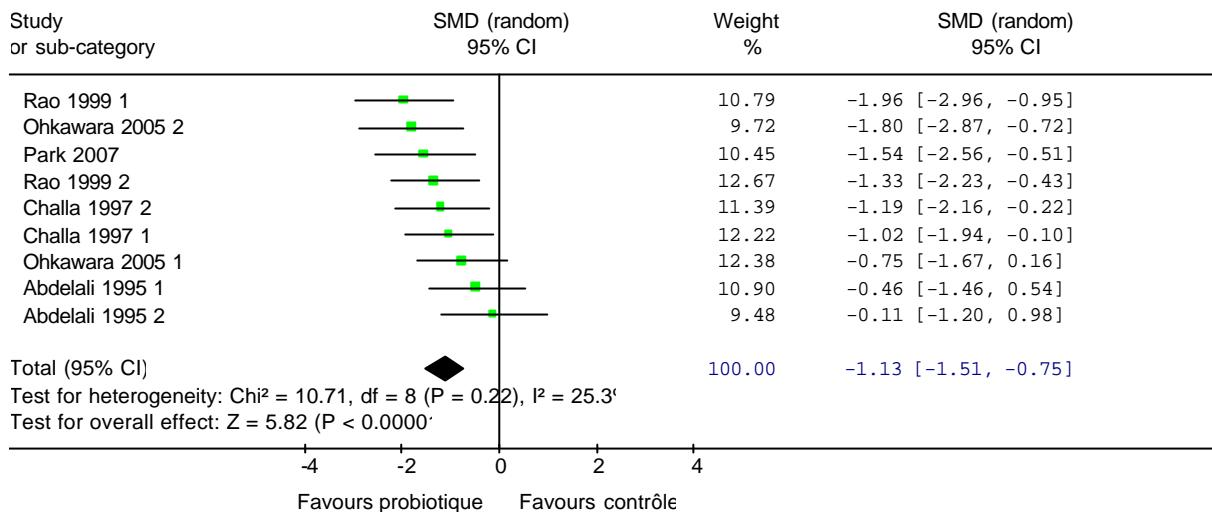


Figure 15 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, tous les essais

Pour le critère cryptes aberrantes, l'hypothèse d'homogénéité est retenue.

Le test d'association rejette l'hypothèse nulle : l'effet de l'administration des probiotiques sur le nombre de cryptes aberrantes est statistiquement significatif.

L'estimation de l'effet standardisé commun est similaire à celle que l'on avait obtenue en utilisant un modèle fixe (-1,13). L'utilisation du modèle aléatoire est donc acceptable.

L'effet standardisé commun est égal à -1,13. Son intervalle de confiance est [-1,51;-0,75]. Cela correspond à une taille d'effet importante.

3.4. Conclusions sur les résultats de la métá-analyse globale en modèle aléatoire

Les résultats obtenus pour les trois critères de jugement sont cohérents : dans tous les cas, l'administration des probiotiques exerce un effet inhibiteur de la cancérogenèse significatif.

Les métá-analyses en sous-groupes devraient nous permettre d'identifier à présent les facteurs de variation les plus importants de cet effet inhibiteur. Si l'un des facteurs de variabilité identifiés permet de scinder les études en sous-groupes tous homogènes, cela nous permettra d'identifier la source d'hétérogénéité prépondérante.

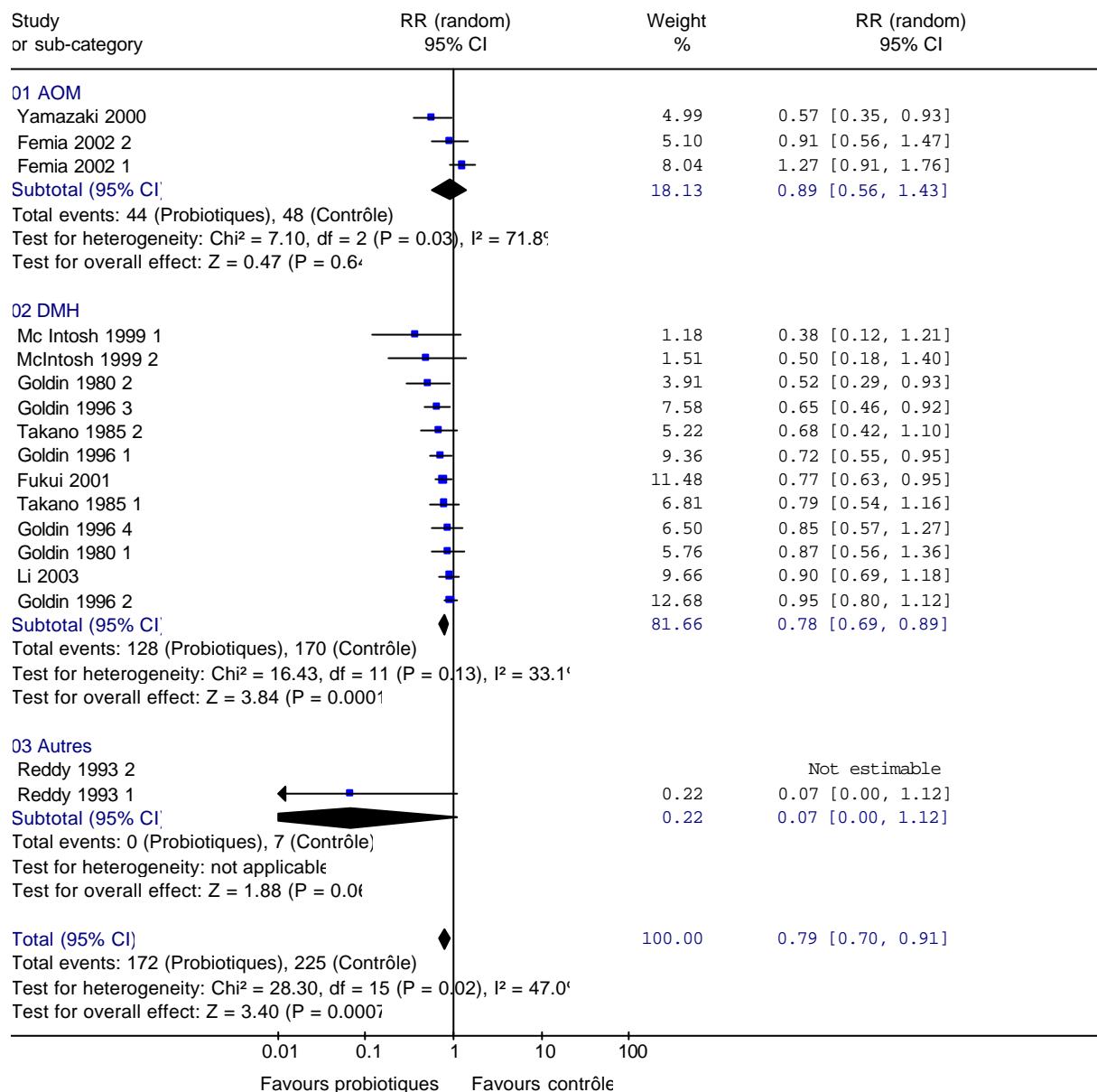


Figure 16 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, en fonction du carcinogène utilisé

4. Méta-analyses en sous-groupes (modèle aléatoire)

4.1. Variable « Carcinogène »

4.1.1. *Nature du carcinogène*

Nous avons constitué trois sous-groupes pour l'étude de ce facteur de variation : «DMH», «AOM», et «Autres». Le sous-groupe «autres» comprend les études qui ont employé des amines hétérocycliques. L'AOM est un métabolite du DMH; ces deux carcinogènes sont donc très proches. Nous avons quand même choisi de les étudier séparément, car nous avons prévu de faire une analyse en fonction des doses administrées après cette première analyse en sous-groupes, et les doses d'AOM et de DMH ne sont pas comparables.

► *Critère de jugement incidence des tumeurs (Figure 16)*

Le sous-groupe «AOM» n'est composé que de trois études, et il est quand même hétérogène. L'hypothèse nulle du test d'association pour ce sous-groupe n'est pas écartée : on ne peut pas conclure à un effet des probiotiques pour ce sous-groupe.

Le sous-groupe «Autres» est composé de deux études. Cependant, l'une d'entre elle (Reddy 1993 2) n'est pas exploitable, car aucune tumeur n'a été observée, ni sur les animaux du groupe expérimental, ni sur les animaux du groupe contrôle. Une seule étude est donc utilisée ; le test d'hétérogénéité n'a pas lieu d'être. On ne peut pas conclure sur l'effet, car l'intervalle de confiance est trop étendu.

Pour le sous-groupe «DMH», il n'y a pas d'hétérogénéité, et l'effet des probiotiques est statistiquement significatif. Le risque relatif commun est 0,78 avec un intervalle de confiance de [0,6 ; 0,81]. Ce risque relatif est très proche de celui calculé dans la mété-analyse de l'ensemble des essais.

On ne peut pas tirer de conclusions sur l'importance du facteur de variabilité «Nature du carcinogène» à l'issue de cette analyse : les résultats pour le sous-groupe DMH sont quasiment identiques à ceux de la mété-analyse globale, ce qui est logique puisque ce sous-groupe rassemble 12 des 17 études.

L'hétérogénéité constatée dans la mété-analyse globale est sans doute due à quelques essais isolés, notamment de celui de Reddy pour lequel le risque relatif est beaucoup plus faible que celui des autres essais.

► Critère de jugement ACF

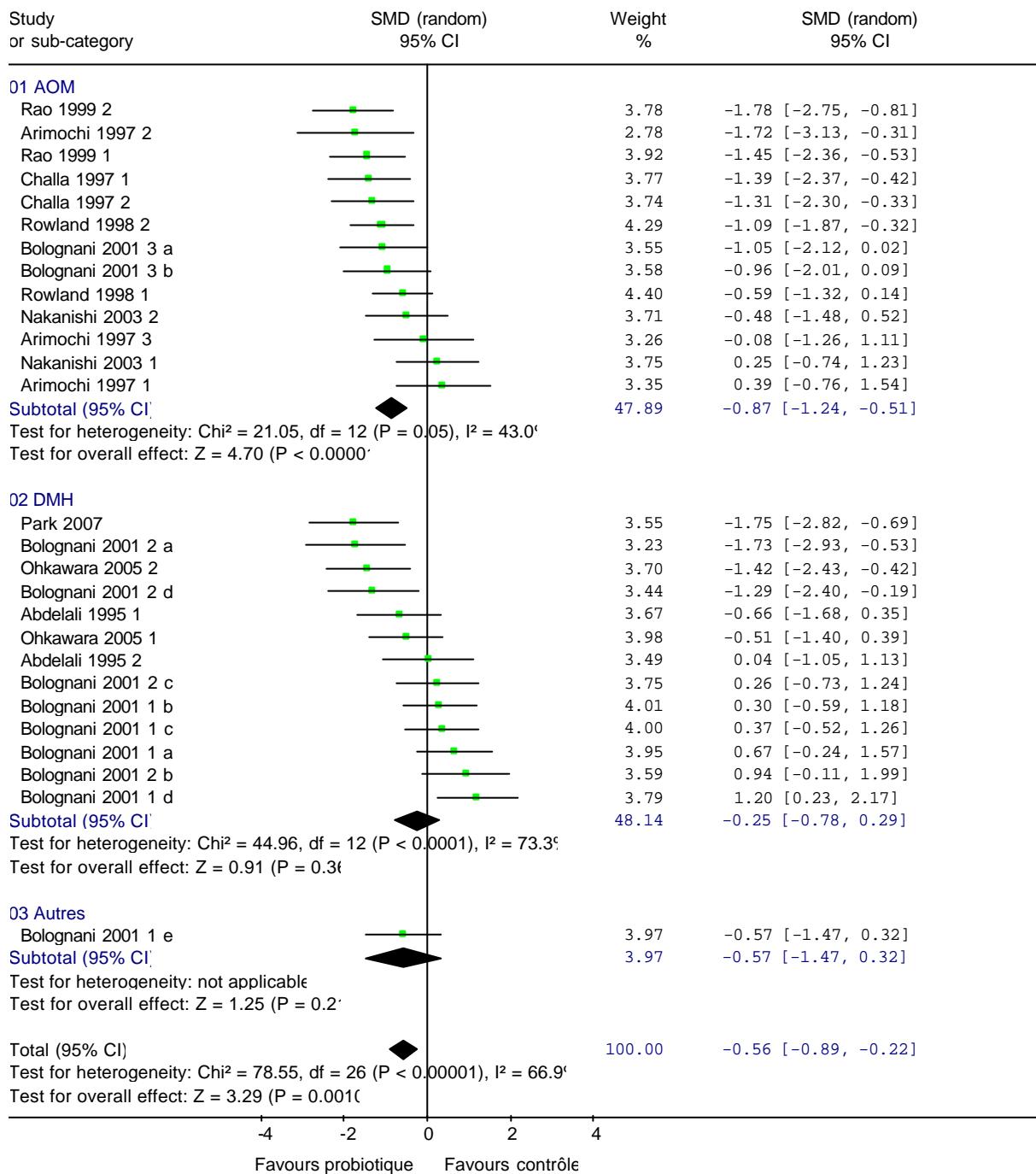


Figure 17 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, en fonction du carcinogène utilisé

Les deux sous-groupes « AOM » et « DMH » sont hétérogènes : le facteur de variabilité « Nature du carcinogène » ne permet pas d'expliquer l'hétérogénéité observée dans la métanalyse globale.

Un effet standardisé statistiquement significatif est obtenu pour le sous-groupe « AOM » (ES = -0,87 ; IC = [-1,248 ; -0,51]). Par contre, aucun effet significatif n'est détecté lorsque le carcinogène utilisé est le DMH.

On remarque que la plupart des essais du sous-groupe « DMH » ont été réalisés par l'équipe de Bolognani en 2001. Lorsqu'on les retire de la méta-analyse, on obtient un effet standardisé significatif similaire à celui du sous-groupe « AOM » (ES = -0,86 ; IC = [-1,47 ; -0,25] ; graphique non présenté). Cela ne signifie pas que ces essais sont mauvais, mais il est probable qu'un autre facteur de variabilité présent dans ces essais et absent des autres « neutralise » l'effet inhibiteur des probiotiques.

L'intervalle de confiance associé à l'estimation de l'effet standardisé de la seule étude qui utilise des amines hétérocycliques est trop large pour que l'on puisse conclure à un effet des probiotiques sur le développement des ACF (l'hypothèse nulle du test d'association est acceptée).

► *Critère de jugement cryptes aberrantes*

Les résultats obtenus pour le critère cryptes aberrantes ne sont pas présentés, car ils n'apportent rien. La méta-analyse globale rassemblait des études dont l'effet était jugé homogène ; les sous-groupes « AOM », « DMH » et « Autres » aussi. L'effet standardisé moyen du groupe « AOM » est inférieur à celui du groupe DMH, mais les intervalles de confiance sont très étendus et se superposent largement.

► *Conclusions sur l'importance du facteur de variabilité « Nature du carcinogène »*

Ce facteur est *a priori* un facteur de variabilité important. Cependant, la constitution de sous-groupes en fonction du carcinogène utilisé n'a pas permis d'expliquer l'hétérogénéité observée dans la méta-analyse globale du critère ACF. Le faible nombre d'études ayant utilisé des amines aromatiques, et la similarité des carcinogènes AOM et DMH en sont certainement en partie responsables : nous pouvons presque considérer qu'un seul et même carcinogène a été utilisé dans toutes les expériences.

Le regroupement de la quasi-totalité des articles de Bolognani dans le sous-groupe « DMH » met en évidence l'un des travers de la méta-analyse en sous-groupes : l'absence de prise en compte des relations entre les différents facteurs de variation, et par conséquent le risque de conclure de façon erronée. En effet, certains facteurs sont liés entre eux (par exemple l'administration d'amines aromatiques se fait toujours par voie orale). On peut ainsi imputer un effet à un facteur donné, alors que le vrai responsable de cet effet est un facteur différent, non identifié, qui lui est lié.

4.1.2. *Dose totale de DMH administrée*

Nous avons uniquement étudié l'incidence du facteur « dose » sur l'effet du traitement pour les études qui ont utilisé le DMH comme carcinogène. En effet, les doses d'AOM administrées étaient toutes à peu près similaires, à l'exception d'une étude utilisant l'incidence des tumeurs comme critère de jugement.

Nous avons constitué deux sous-groupes : « Dose totale administrée inférieure à 100 mg/kg », et « Dose totale administrée supérieure à 100 mg/kg ».

Les graphiques ne sont pas présentés, car les résultats ne sont pas exploitables en raison du nombre insuffisant d'études dans certains sous-groupes.

Pour le critère tumeurs, seules deux études ont utilisé une dose inférieure à 100 mg/kg, et ces deux études ont été extraits du même article (Mc Intosh 1999 [73]).

Pour le critère ACF, une étude a utilisé plus de 100 mg/kg (Park 2007 [50]). Les douze autres études ayant utilisé le DMH l'ont employé à des doses inférieures à 100 mg/kg, et ce sous-groupe est très hétérogène.

Pour le critère cryptes aberrantes, le sous-groupe « Dose totale administrée inférieure à 100 mg/kg » comprend quatre études homogènes. Le second sous-groupe n'est constitué que d'une seule étude.

4.1.3. *Voie d'administration*

Les probiotiques pourraient inhiber la cancérogenèse en métabolisant les carcinogènes, ou en les liant et en les neutralisant. Il serait donc logique que leur effet soit différent selon que les carcinogènes sont administrés par voie systémique ou par voie orale.

Nous avons donc séparé les études en deux sous-groupes pour chaque critère : « Carcinogène administré par voie parentérale » ou « Carcinogène administré par voie orale ».

► *Critère de jugement incidence des tumeurs*

Les probiotiques ont été administrés par voie orale dans seulement deux essais, dont un inexploitable. Ces essais sont ceux de Reddy 1993, pour lesquels le carcinogène utilisé est une amine aromatique.

Le graphique n'est pas présenté ; il n'apporte que peu de renseignements complémentaires par rapport à celui de la méta-analyse globale en modèle aléatoire.

Pour le sous-groupe « Administration du carcinogène par voie parentérale » (regroupant tous les essais à l'exception de ceux de Reddy 1993), l'hypothèse d'homogénéité est retenue, et l'effet des probiotiques est statistiquement significatif (RR= 0,80 ; IC = [0,71;0,91]). Cet effet est quasiment identique à l'effet estimé dans la méta-analyse globale en modèle aléatoire.

► *Critère de jugement ACF*

Pour le critère ACF (Figure 18), les deux sous-groupes sont hétérogènes : la voie d'administration du carcinogène n'est pas un facteur prépondérant d'hétérogénéité.

Les probiotiques inhibent significativement l'apparition des ACF induits par l'administration de cancérogènes par voie parentérale. Par contre, ils ne semblent pas exercer d'effet significatif lorsque le cancérogène est administré par voie orale.

Cette constatation est surprenante : les modes d'action supposés des probiotiques laissent envisager un effet protecteur plus important lorsque le carcinogène est administré par voie orale.

On peut remarquer que 9 des 11 études du sous-groupe « Administration du carcinogène par voie orale » ont été réalisées par l'équipe de Bolognani, et ce sont les mêmes qui constituaient le groupe « DMH » dans l'analyse en sous-groupes en fonction de la nature du carcinogène. L'utilisation de la voie orale est liée à l'utilisation du DMH. Nous avons donc réalisé une autre analyse en sous-groupe pour le critère ACF, en reprenant uniquement les études qui ont utilisé le DMH (Figure 19, page suivante).

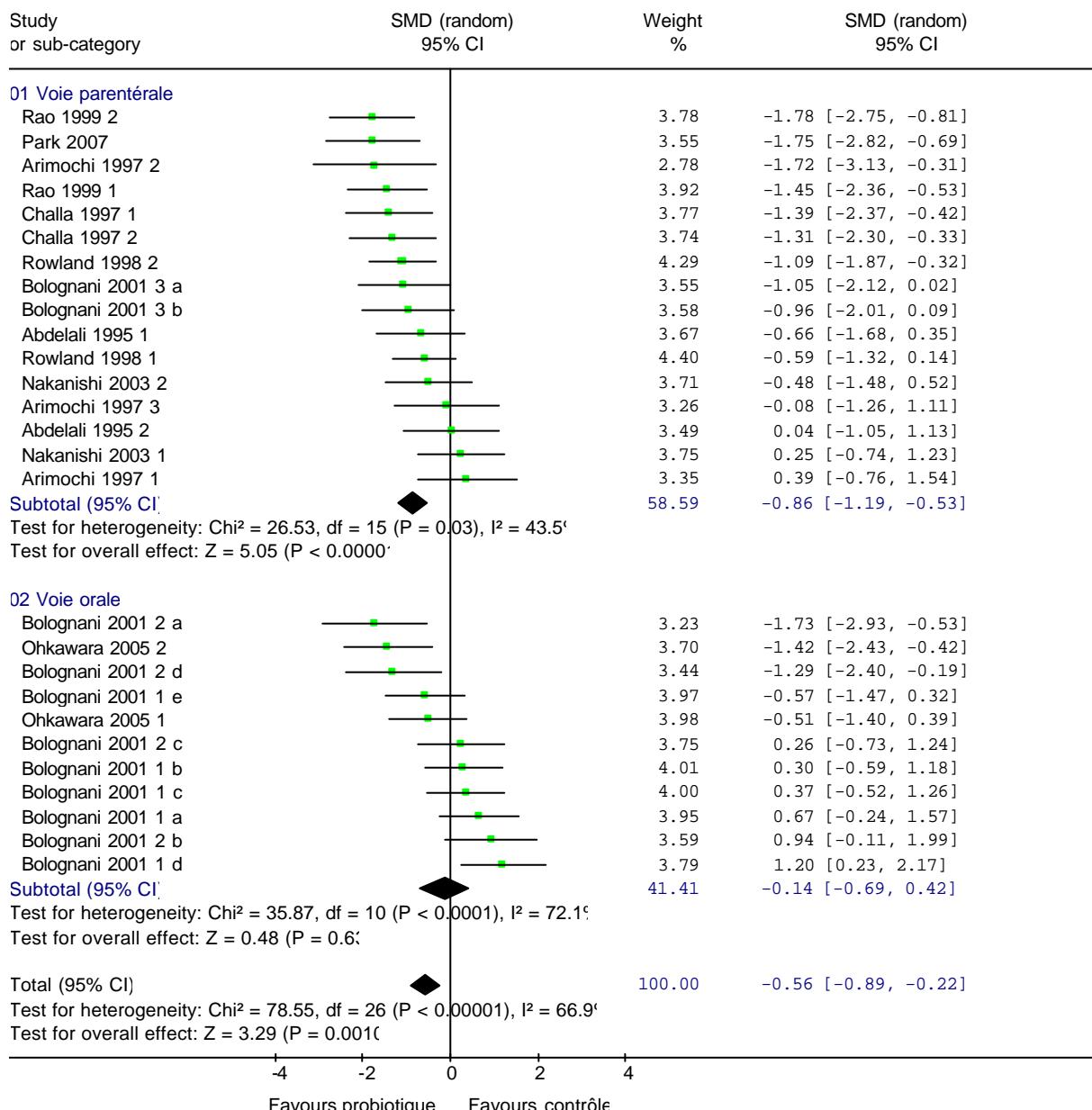


Figure 18 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, en fonction de la voie d'administration du carcinogène

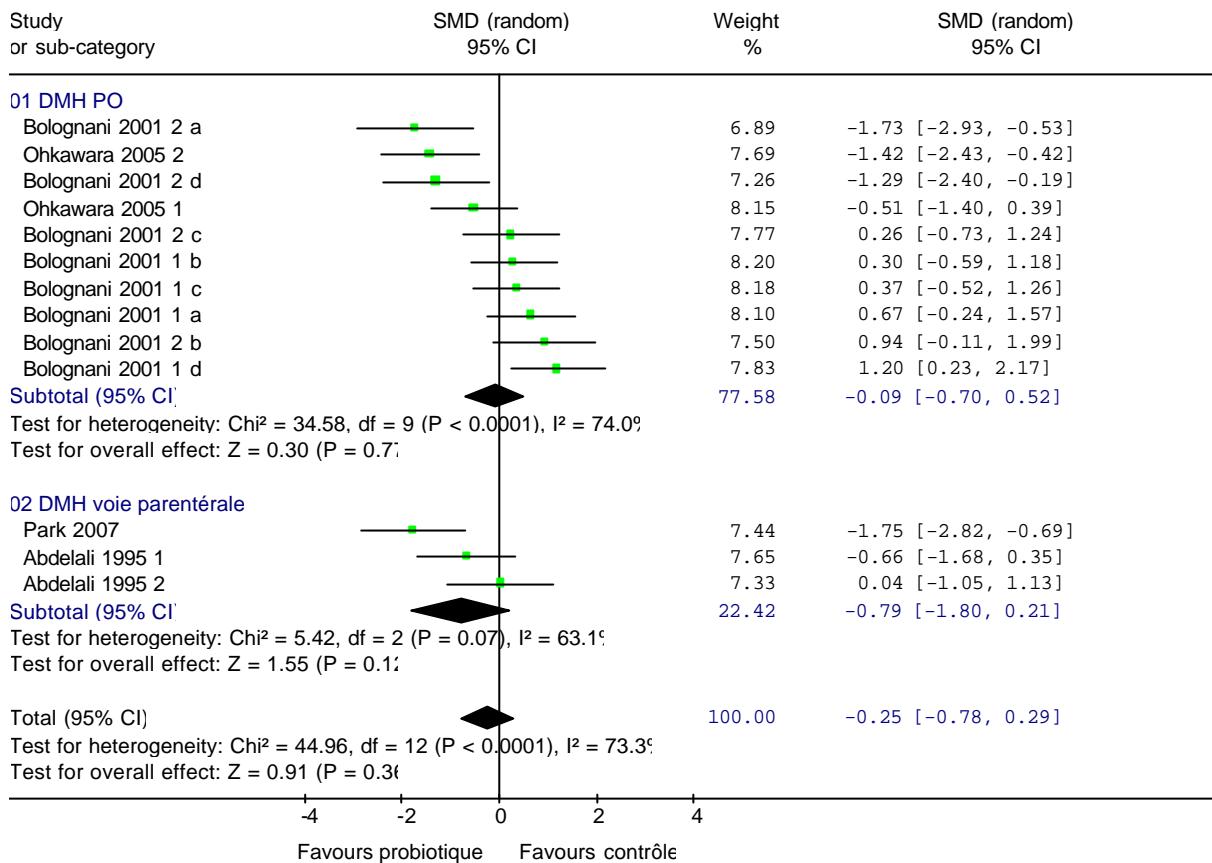


Figure 19 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, études ayant utilisé le DMH comme carcinogène, en fonction de la voie d'administration

Trois études ont administré le DMH par voie parentérale (Abdelali 1995 1, Abdelali 1995 2, Park 2007). Les dix autres l'ont administré par voie orale. L'hypothèse nulle du test d'association est acceptée pour chacun de ces sous-groupes : on ne démontre pas d'effet des probiotiques sur le nombre d'ACF induits par le DMH, quelle que soit la voie d'administration du cancérogène.

Les résultats sont toutefois différents : lorsque le DMH est administré par voie orale, l'effet standardisé est proche de zéro. Lorsque le DMH est administré par voie parentérale, l'effet standardisé est très inférieur à zéro ; cet effet est non significatif parce que son intervalle de confiance est étendu, et qu'il englobe la valeur zéro.

► *Critère de jugement cryptes aberrantes (Figure 20)*

Les deux sous-groupes sont constitués d'études homogènes, et l'effet standardisé commun calculé pour chaque sous-groupe est statistiquement significatif.

Les effets communs des deux sous-groupes sont assez similaires à celui calculé pour l'ensemble des études.

Nous pouvons conclure à un effet protecteur des probiotiques contre le développement des cryptes aberrantes, quel que soit le mode d'administration du carcinogène.

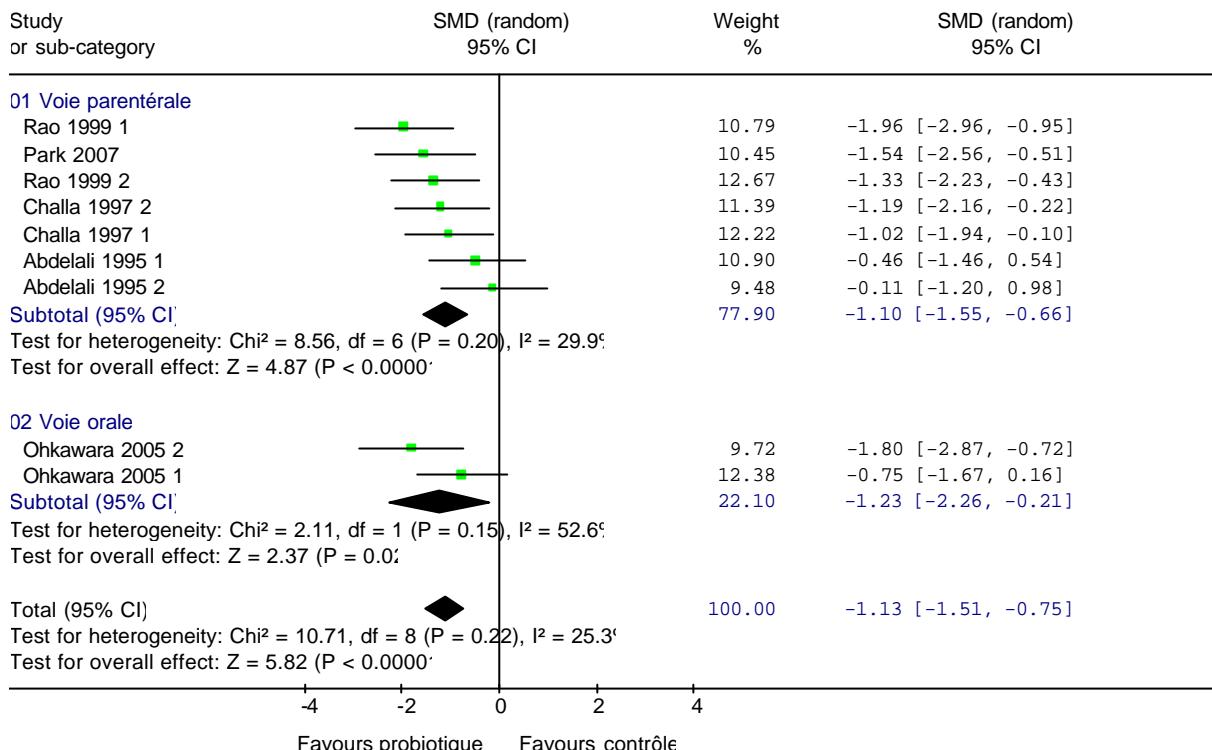


Figure 20 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, en fonction de la voie d'administration du carcinogène

► *Conclusions sur le facteur de variation « Voie d'administration du carcinogène »*

Pour le critère de jugement incidence des tumeurs, nous ne pouvons pas conclure sur l'importance du facteur de variation « Voie d'administration du carcinogène ». Une seule étude a utilisé la voie orale, et qui plus est, le carcinogène utilisé est radicalement différent de celui utilisé dans les autres études. Nous avons décidé d'éjecter les essais « Reddy 1993 1 » et « Reddy 1993 2 » des analyses suivantes, car ces études sont les seules qui diffèrent des autres en ce qui concerne la nature et la voie d'administration du carcinogène. Leur risque relatif est nettement inférieur à celui des autres essais, leur poids dans le calcul de l'effet standardisé commun est faible (0,22%, contre 1 à 12% pour les autres études), et leur élimination permet d'accepter l'hypothèse nulle du test d'homogénéité pour les autres essais. De plus, bien que cela n'intervienne pas dans notre choix d'éjecter cette étude des analyses suivantes, nous pourrons utiliser une échelle plus appropriée pour la présentation des graphiques.

Pour le critère ACF, nous avons observé tout d'abord une absence d'effet lorsque le carcinogène était administré par voie orale. Toutefois, l'utilisation de la voie orale est très liée à l'utilisation du DMH, et aux études de Bolognani.

Pour le critère cryptes aberrantes, l'effet observé est du même ordre de grandeur quelle que soit la voie d'administration.

Il semble que l'effet protecteur des probiotiques soit inférieur lorsque la Cancérogenèse est induite par du DMH administré par voie orale. Cependant, toutes les études ayant utilisé du DMH par voie orale sont celles de Bolognani et Ohkawara. Nous ne pouvons pas éjecter l'existence d'un autre facteur lié à ces études. Nous refusons donc de conclure à un effet protecteur supérieur lorsque le carcinogène est administré par une voie plutôt qu'une autre.

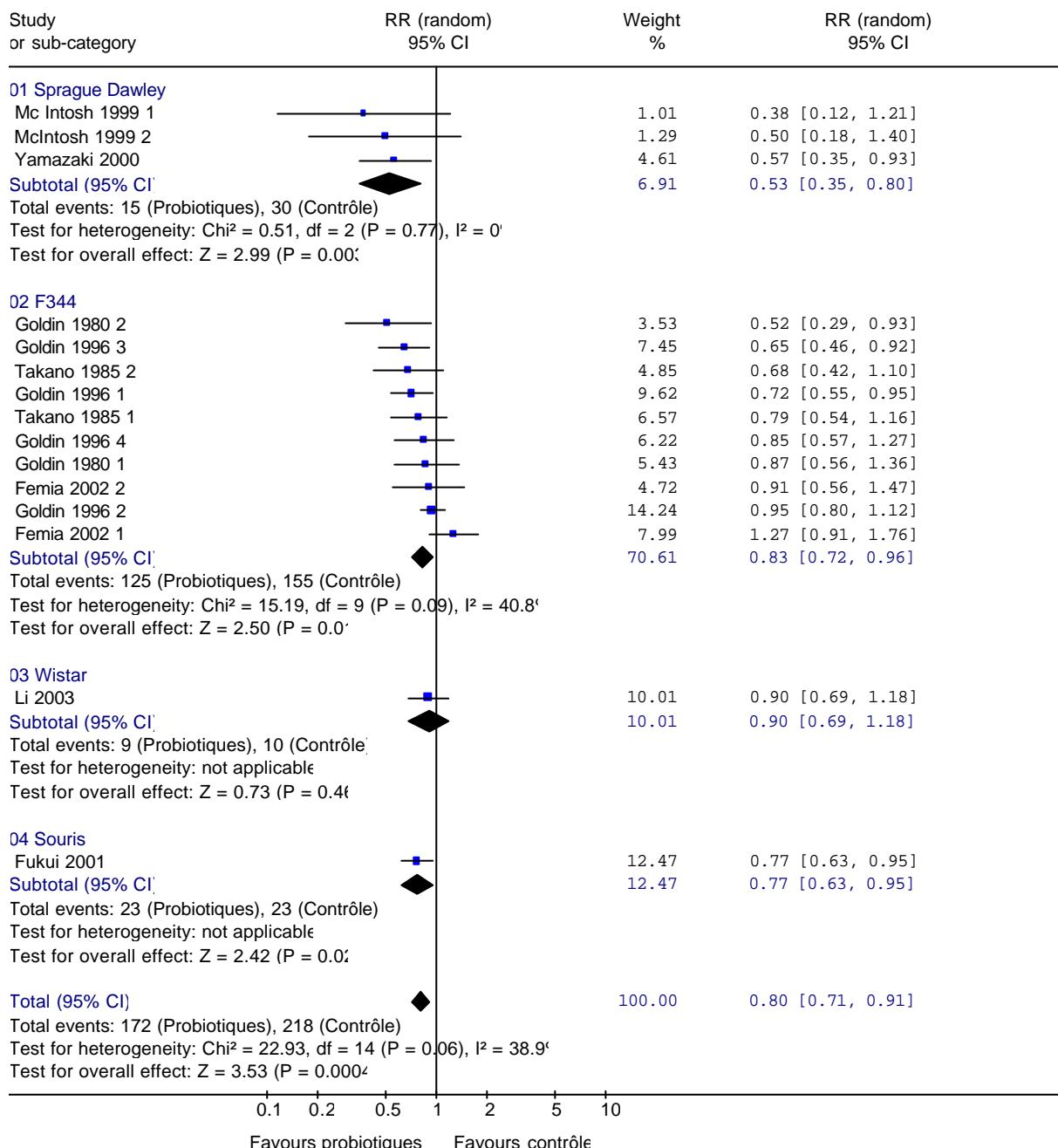


Figure 21 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, en fonction de l'espèce et de la lignée utilisée

4.2. Variable « Animal »

4.2.1. *Sexe*

Nous avions prévu de réaliser une analyse en sous-groupes suivant le sexe des animaux ; nous ne l'avons pas fait. En effet, une seule étude a utilisé des animaux femelles. Il s'agit de l'étude « Reddy 1993 2 », qui a utilisé l'incidence des tumeurs comme critère de jugement. Or, le traitement carcinogène a été réalisé avec une amine hétérocyclique, l'IQ, et aucun animal, ni dans le groupe contrôle, ni dans le groupe probiotique, n'a développé de tumeurs. Cette méta-analyse n'avait donc pas lieu d'être.

4.2.2. *Espèce et lignée*

Nous avons réalisé une seule méta-analyse en sous-groupes afin d'examiner les rôle de ces deux facteurs de variation.

Nous avons constitué quatre sous-groupes : « Rats Sprague-Dawley », « Rats F344 », « Rats Wistar », « Souris ICR ».

► *Critère de jugement incidence des tumeurs (Figure 21)*

Nous avons exclu les essais de Reddy de cette analyse. Les rats utilisés étaient des F344.

Il n'y a qu'une étude dans chacun des sous-groupes « Rats Wistar » et « Souris ICR ». Les valeurs des risques relatifs de ces deux sous-groupes sont proches de celle calculée pour l'ensemble des essais dont le critère de jugement est l'incidence des tumeurs.

L'hypothèse d'homogénéité est retenue pour les deux autres sous-groupes.

L'hypothèse nulle du test d'association est rejetée pour ces deux sous-groupes : l'effet du traitement est significatif dans les deux cas.

Le risque relatif du sous-groupe « Rats Sprague-Dawley » est RR = 0,53 ; IC = [0,35 ; 0,80].

Le risque relatif du sous-groupe « Rats F344 » est RR = 0,83 ; IC = [0,72 ; 0,96].

L'écart entre ces deux risques relatifs est important, et les intervalles de confiance qui leur sont associés se superposent à peine.

Le risque relatif concernant le groupe « Rats F344 » est similaire à celui calculé pour l'ensemble des essais. Ce n'est pas le cas pour le groupe « Rats Sprague-Dawley ».

L'administration des probiotiques semble exercer un effet protecteur supérieur chez les rats Sprague-Dawley par rapport aux rats F344 pour l'incidence des tumeurs.

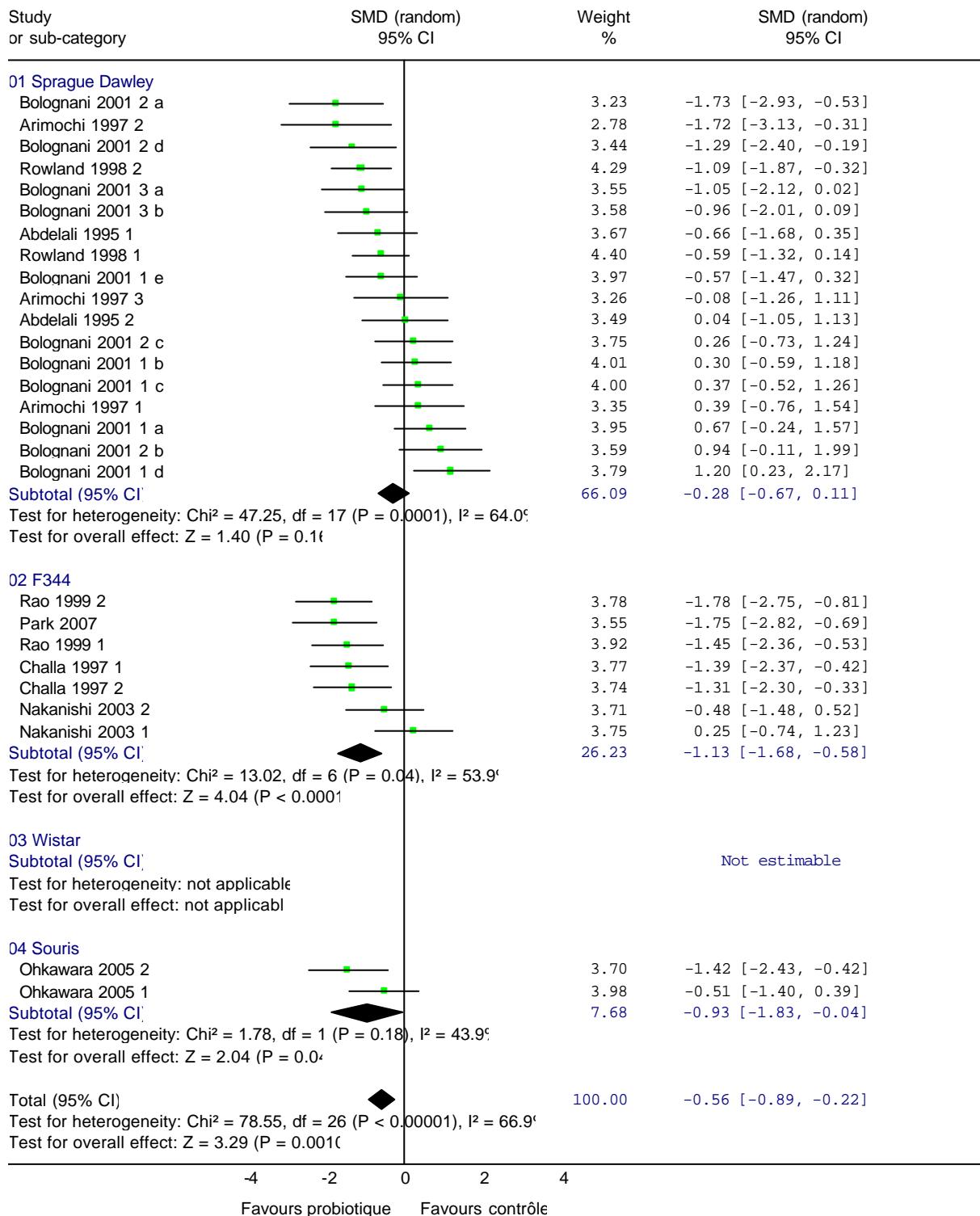


Figure 22 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon l'espèce et la lignée utilisée

► *Critère de jugement ACF*

Deux essais uniquement ont utilisé des souris. Ces deux essais ont été extraits du même article, Ohkawara 2005 [75]. L'effet standardisé moyen de ce sous-groupe est inférieur à celui calculé dans la méta-analyse globale. Cependant, l'intervalle de confiance est tellement large qu'il englobe complètement l'intervalle de confiance de la méta-analyse globale. On ne peut donc pas conclure à une taille d'effet différente selon l'espèce.

Aucun essai n'a utilisé de rat Wistar.

Les sous-groupes « Rats Sprague-Dawley » et « Rats F344 » rassemblent l'essentiel des essais.

Ces deux sous-groupes sont hétérogènes : malgré la différence d'effet observée entre les deux, la lignée des rats utilisé n'explique pas à elle seule l'hétérogénéité de tous les articles.

L'effet des probiotiques est non significatif chez les rats Sprague-Dawley, alors qu'il est significatif et important chez les rats F344 (ES = -1,13 ; IC = [-1,68 ; -0,58]).

Nous constatons que tous les essais de Bolognani (qui a utilisé du DMH administré par voie orale comme traitement carcinogène dans la majorité des cas) sont à nouveau réuni dans le même sous-groupe, «Rats Sprague-Dawley». Ils sont associés cette fois à d'autres articles d'auteurs différents, ayant utilisé des carcinogènes différents, administrés par voie parentérale.

Nous avons tout de même effectué une analyse sans les essais de Bolognani : on obtient pour le groupe «Sprague-Dawley» un effet significatif (ES = -0,54 ; [-1,01 ; -0,08]). Cet effet est tout de même beaucoup moins important que celui observé chez les rats F344.

Il semble donc que le phénomène décrit pour le critère de jugement incidence des tumeurs soit inversé pour le critère de jugement ACF : les probiotiques exercent un effet protecteur plus important chez les rats F344 que chez les rats Sprague-Dawley.

► *Critère de jugement cryptes aberrantes*

Les résultats observés pour le critère cryptes aberrantes sont similaires à ceux observés pour les ACF (Figure 40, en annexe).

Les groupes «Sprague-Dawley» et «F344» sont homogènes. L'effet des probiotiques chez les Sprague-Dawley est non significatif (ES = -0,30 ; IC = [-1,04 ; 0,44]), tandis que l'effet observé chez les F344 est significatif et important (ES = -1,39 ; IC = [-1,81 ; -0,96]).

► *Conclusions sur le facteur de variabilité « Espèce et lignée »*

Seules trois études ont utilisé des souris : l'une a étudié le critère de jugement incidence des tumeurs, les deux autres ont étudié le critère ACF. Le nombre d'études incluses dans les sous-groupes est insuffisant pour en tirer quelque conclusion que ce soit (on considère habituellement qu'il faut un minimum de trois études pour faire une méta-analyse).

Par contre, le nombre d'essais inclus dans chacun des sous-groupes «Rats Sprague-Dawley» et « Rats F344 » est supérieur à trois, à la fois pour le critère incidence des tumeurs et pour le critère ACF.

Nous avons remarqué que les probiotiques semblaient exercer un effet protecteur supérieur chez les rats Sprague-Dawley lorsque l'on étudie le critère incidence des tumeurs. Inversement, l'effet protecteur semble plus important chez les rats F344 lorsque l'on étudie le critère ACF. Cela est étonnant : les ACF sont supposés être des lésions néoplasiques corrélées au développement des tumeurs.

Pour le critère incidence des tumeurs, les trois études du groupe «Rats Sprague-Dawley» proviennent de deux articles. L'effet standardisé estimé pour ce sous-groupe est peut être biaisé en raison d'un nombre insuffisant d'études et d'auteurs...

Il existe peut être également un facteur de variation lié au facteur «Lignée», présent dans les études qui étudient les tumeurs et absent dans les études qui étudient les ACF (ou vice versa). Enfin, une troisième hypothèse pour expliquer ces résultats surprenants et apparemment incohérents est que les ACF sont corrélés différemment à l'apparition des tumeurs selon la lignée de rats étudiée...

4.3. Variable « Conditions d'élevage » : teneur de l'aliment en matières grasses

Nous avons restreint notre étude de la variable «Conditions d'élevage » à un seul facteur de variation : la teneur de l'aliment en matières grasses.

Nous avons réalisé deux sous-groupes pour chaque critère de jugement : « Teneur en matières grasses inférieure ou égale à 5% » (« MG<5% »), et « Teneur en matières grasses supérieure ou égale à 20% » (« MG>20% »). Aucune étude n'a utilisé d'aliment avec une teneur en matière grasse intermédiaire, ce qui a facilité le choix de ces seuils.

► Critère de jugement incidence des tumeurs

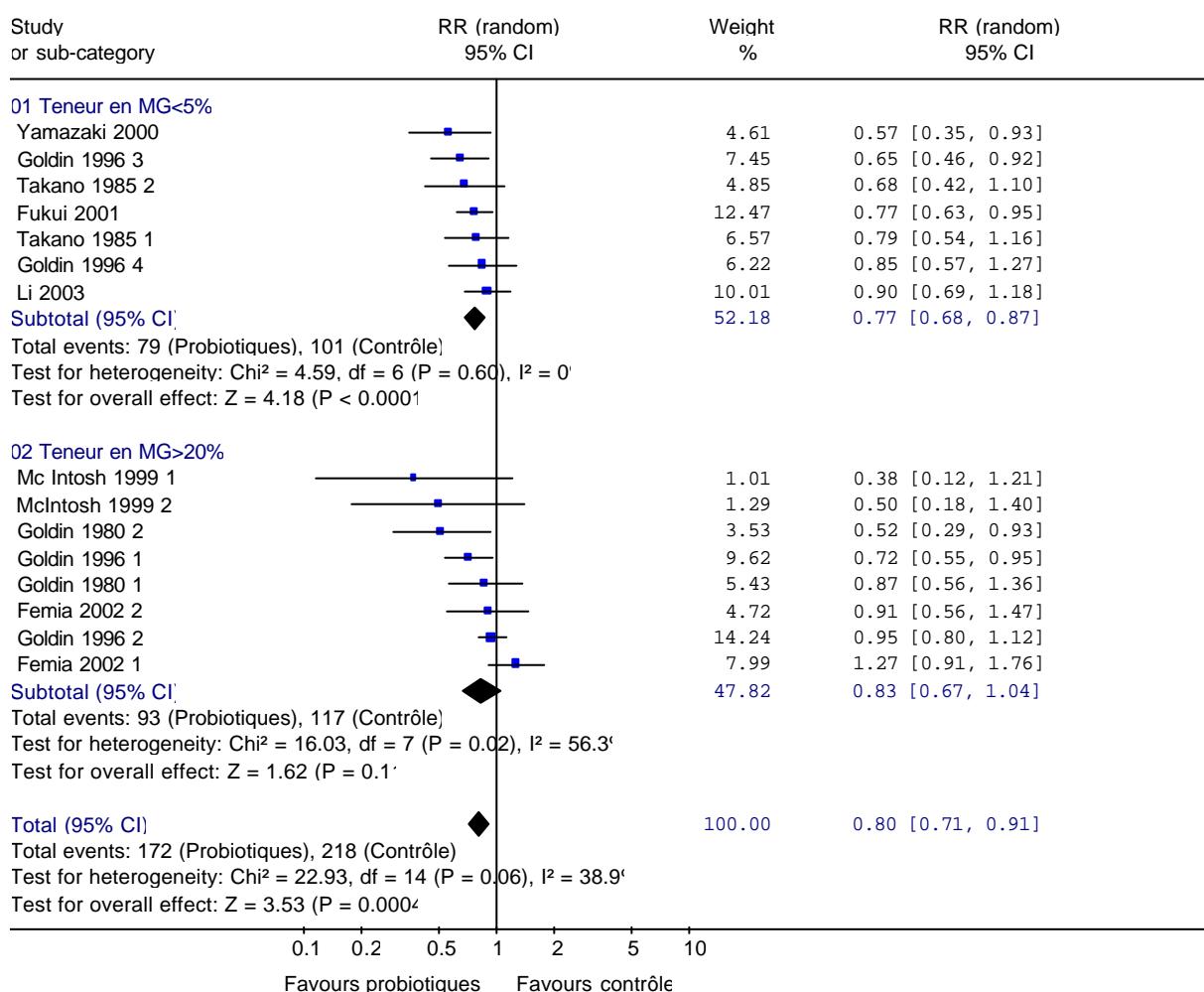


Figure 23 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon la teneur en matières grasses de l'aliment

Le sous-groupe « MG<5% » est homogène et l'effet observé est significatif : RR = 0,77 ; IC = [0,68 ; 0,87]. Cet effet est très proche de celui observé pour l'ensemble des études.

Le sous-groupe « MG>20% » est quant à lui hétérogène, et nous n'observons pas d'effet significatif car l'intervalle de confiance associé au risque relatif s'étend au-delà de la valeur 1.

Bien que l'on n'observe pas d'effet significatif dans le sous-groupe « MG>20% », les risques relatifs des deux sous-groupes sont assez proches. De plus, l'intervalle de confiance du sous-groupe « MG<5% » est entièrement inclus dans l'intervalle de confiance du sous-groupe « MG>20% ».

Nous ne pouvons donc pas conclure à un effet protecteur supérieur des probiotiques lorsque l'aliment est plus riche en matières grasses.

► *Critère de jugement ACF*

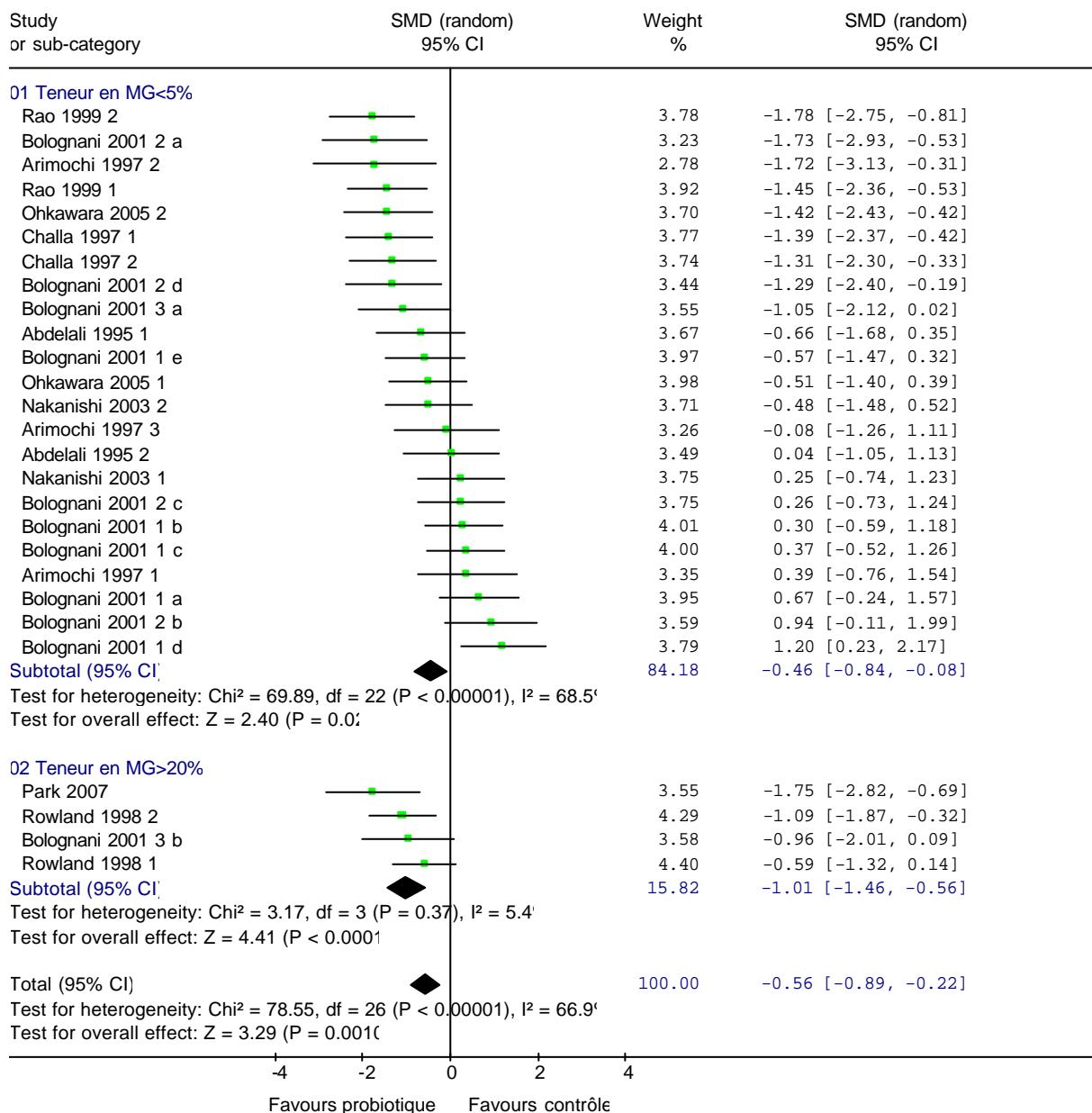


Figure 24 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon la teneur en matières grasses de l'aliment

L'hypothèse d'homogénéité est écartée pour le sous-groupe « MG<5% », mais elle est retenue pour le sous-groupe « MG>20% ». La teneur en matières grasses n'est pas un facteur prépondérant d'hétérogénéité.

L'hypothèse nulle du test d'association est rejetée dans les deux cas : l'effet des probiotiques sur les ACF est significatif quelle que soit la teneur en matières grasses de l'aliment.

On note pour le sous-groupe « MG<5% » : ES = -0,46 ; [-0,84 ; -0,08].
Pour le sous-groupe « MG>20% » : ES = -1,01 ; [-1,46 ; -0,56].

L'effet standardisé commun du sous-groupe « MG>20% » est nettement inférieur à celui du sous-groupe « MG<5% ».

Il semble que les probiotiques exercent un effet protecteur supérieur contre le développement des ACF lorsque l'alimentation est riche en matières grasses.

► *Critère de jugement cryptes aberrantes*

Le graphique n'est pas présenté.

Le sous-groupe « MG<5% » est homogène.

Il n'y a qu'une seule étude dans le sous-groupe « MG>20% » (Park 2007).

L'effet des probiotiques est significatif dans les deux sous-groupes.

Pour le sous-groupe « MG<5% » : ES = -1,08 ; [-1,49 ; -0,67].

Pour le sous-groupe « MG>20% » : ES = -1,54 ; [-1,54 ; -0,51].

Bien que les effets standardisés soient différents, les intervalles de confiance se recouvrent largement.

On ne peut donc pas conclure à un effet protecteur supérieur contre le développement des cryptes aberrantes lorsque l'alimentation est riche en matières grasses.

► *Conclusion sur le facteur de variabilité « Teneur de l'aliment en matières grasses »*

Pour les critères de jugement incidence des tumeurs et cryptes aberrantes, on ne peut pas conclure à un effet protecteur différent des probiotiques selon la teneur en matières grasses de l'aliment.

Pour le critère ACF, il semble que les probiotiques sont plus protecteurs lorsque l'alimentation est riche en matières grasses.

Pour le critère cryptes aberrantes, nous n'avons pas mis de différence en évidence selon la teneur de l'aliment en matières grasses.

En conclusion, nous n'avons pas démontré de façon formelle l'incidence de la teneur en matières grasses de l'aliment sur l'effet protecteur des probiotiques.

4.4. Variable « Probiotique »

4.4.1. *Genre bactérien utilisé*

Les genres bactériens les plus utilisés sont les Lactobacilles et les Bifidobactéries.

La plupart des auteurs n'ont utilisé qu'une espèce bactérienne par essai. Cependant, certains auteurs ont associé différentes bactéries entre elles, parfois du même genre (Fukui 2001 [69] : association de quatre espèces différentes de Lactobacilles), parfois de genres différents (Femia 2002 [68] : *L.delbrueckii* et *B.lactis*). Takano [79] a utilisé du lait fermenté par *L.helveticus jugurti* et *Candida utilis*, une levure.

Nous avons donc constitué trois sous-groupes : « Lactobacilles », « Bifidobactéries », et « Autres ».

Lorsque plusieurs espèces bactériennes étaient associées, nous avons classé l'étude dans le sous-groupe « Lactobacilles » ou « Bifidobactéries » si toutes les espèces étaient des Lactobacilles ou des Bifidobactéries. Si les espèces appartenaient à des genres différents (même si l'auteur utilisait un *Lactobacillus* et un *Bifidobacterium*), nous avons classé l'essai dans le sous-groupe « Autres ».

► *Critère de jugement incidence des tumeurs (Figure 25)*

Le sous-groupe « Lactobacilles » est homogène, et l'effet de ces bactéries est significatif. RR = 0,74 ; IC = [0,63 ; 0,88].

Aucune étude n'a utilisé uniquement des Bifidobactéries.

Le sous-groupe « Autres » est homogène. L'effet est non significatif.

RR = 0,92 ; IC = [0,75 ; 1,12].

Li a utilisé *Lactococcus lactis*. Femia a employé une association de *L.delbrueckii* et *B.lactis*. Takano s'est servi de *L.helveticus jugurti* et *Candida utilis*, une levure.

Il est difficile de conclure dans ces conditions à l'efficacité supérieure d'un genre par rapport aux autres. Toujours est-il que les probiotiques issus du genre *Lactobacillus* diminuent significativement le risque relatif de l'incidence des tumeurs.

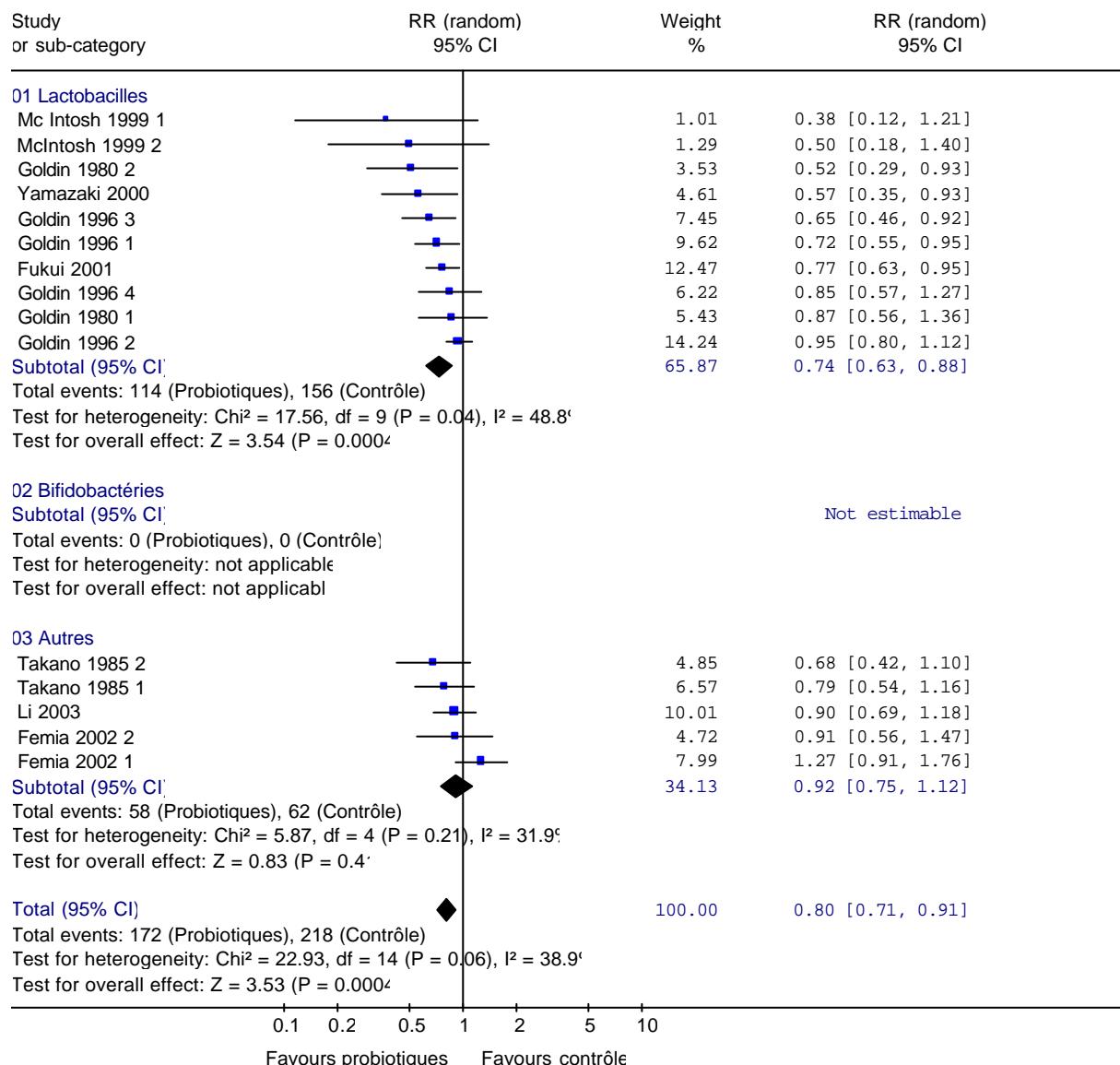


Figure 25 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon le genre bactérien utilisé

► Critère de jugement ACF

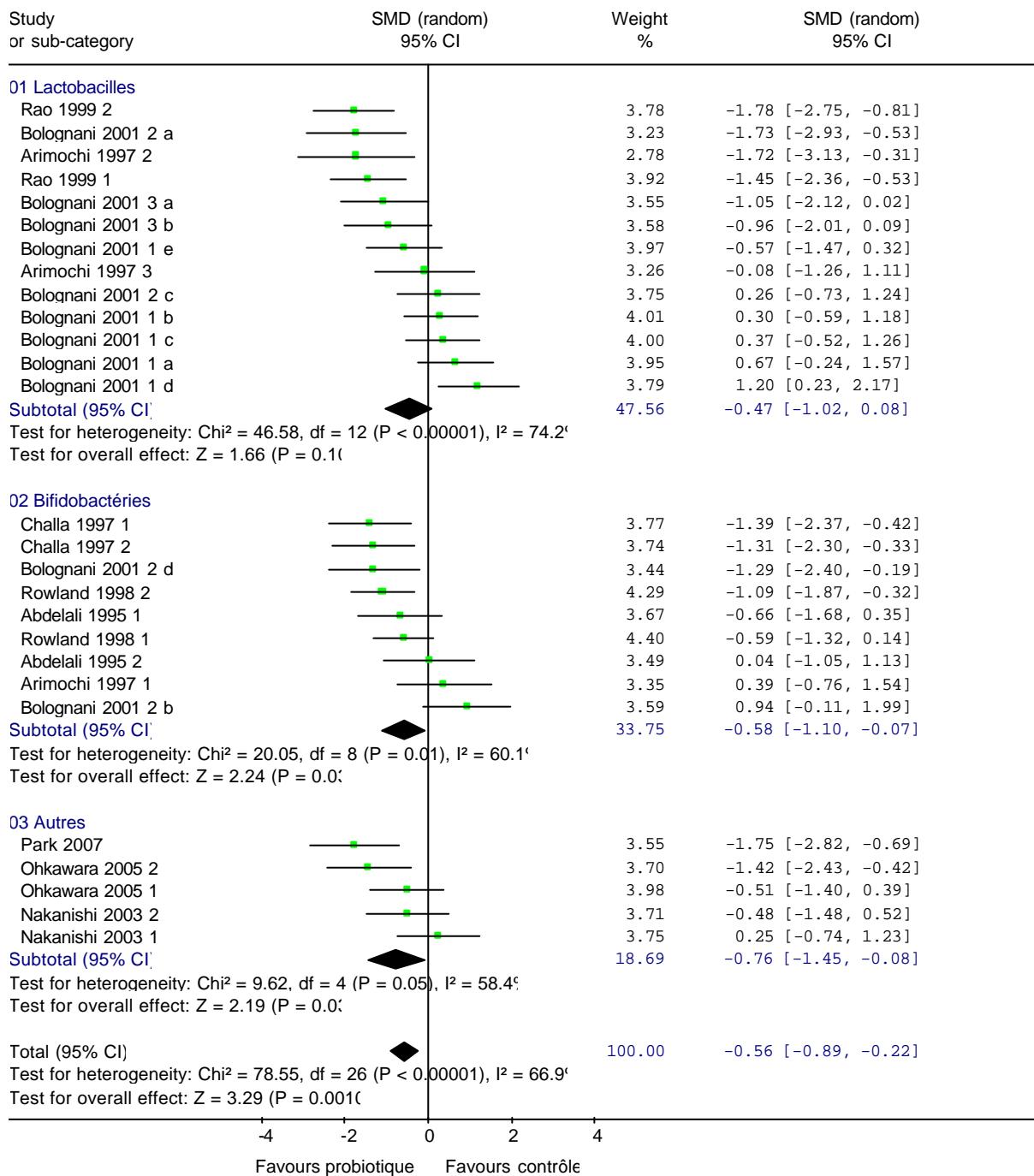


Figure 26 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon le genre bactérien utilisé

Le sous-groupe « Lactobacilles » est très hétérogène. L'effet des probiotiques est non significatif (ES = -0,47 ; IC = [-1,02 ; 0,08]).

Le sous-groupe « Bifidobactéries » est également hétérogène. L'effet des probiotiques est par contre significatif : ES = -0,58 ; IC = [-1,10 ; -0,07].

Le sous-groupe « Autres » est (étonnamment !) homogène. L'effet des probiotiques est significatif : ES = -0,76 ; IC = [-1,45 ; -0,08].

Ohkawara a utilisé *Butyvibrio fibrosolvens*, Park *Bacillus polyfermenticus*, et Nakanishi *Clostridium butyricum*.

Les probiotiques exercent un effet protecteur quel que soit le genre bactérien utilisé. Nous ne pouvons pas conclure à un effet supérieur d'un genre plus que d'un autre.

► *Critère de jugement cryptes aberrantes*

Tous les sous-groupes sont homogènes, et l'effet est significatif dans tous les cas.

« Lactobacilles » : deux études (Rao 1999 1 et 2).

ES = -1,61 ; IC = [-2,28 ; -0,94].

« Bifidobactéries » : quatre études (Challa 1997 1 et 2 ; Abdelali 1995 1 et 2).

ES = -0,74 ; IC = [-1,23 ; -0,24].

« Autres » : trois études (Park 2007, Ohkawara 2005 1 et 2).

ES = -1,31 ; IC = [-1,94 ; -0,68].

Tous les intervalles de confiance se chevauchent.

Il semble que les Bifidobactéries exercent un effet protecteur plus faible que les Lactobacilles, mais le nombre d'études dans le sous-groupe « Lactobacilles » est limité à deux études du même auteur.

► *Conclusions sur le critère de jugement « Genre bactérien utilisé »*

Nous concluons à un effet protecteur des Lactobacilles et des Bifidobactéries pour les trois critères étudiés. Nous ne pouvons pas conclure à un effet protecteur d'un genre par rapport à l'autre.

Le sous-groupe « Autres » rassemble des espèces très diverses. Il est donc délicat d'en tirer une conclusion. Il semble que l'association de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Femia 2002 1 et 2) ne donne pas de résultats supérieurs à ceux obtenus en utilisant un seul genre bactérien pour le critère incidence des tumeurs.

4.4.2. Dose administrée

Nous avons constitué trois sous-groupes, que nous avons appliqué à chaque critère de jugement : « Moins de 10^9 ufc/animal/jour », « 10^9 à 6.10^9 ufc/animal/jour », et « Plus de 10^{10} ufc/animal par jour »

► Critère de jugement incidence des tumeurs

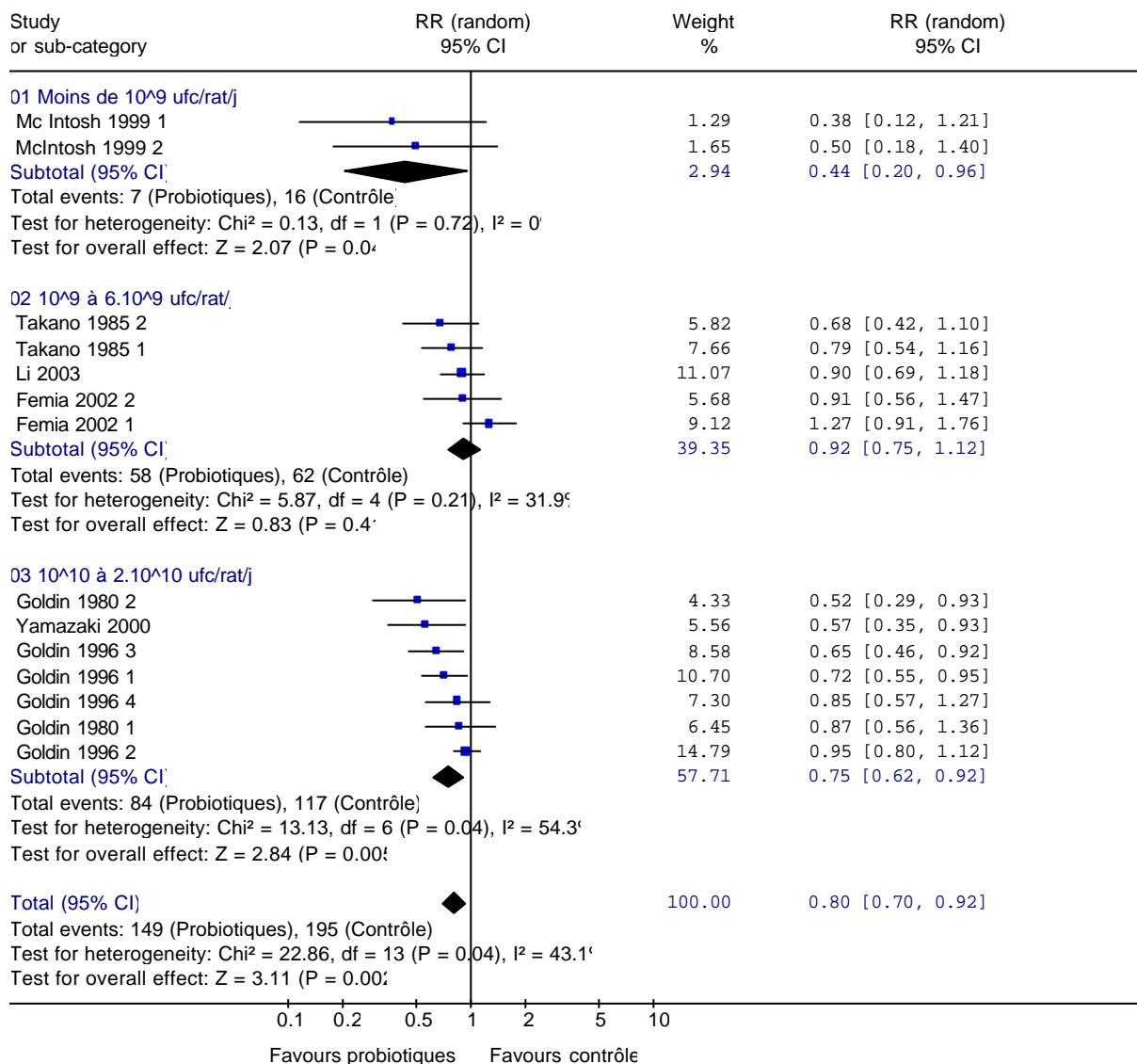


Figure 27 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon la dose de probiotique administrée quotidiennement

Les trois sous-groupes sont homogènes. L'effet des probiotiques sur l'incidence des tumeurs n'est pas significatif pour le sous-groupe « 10^9 à 6.10^9 ufc/animal/j » ; il l'est pour les deux autres sous-groupes.

Les risques relatifs moyens de chaque sous-groupe sont (très) différents. Cependant, tous les intervalles de confiance se superposent plus ou moins.

On ne peut donc pas conclure qu'une dose donnée de probiotiques est plus efficace qu'une autre.

► *Critère de jugement ACF*

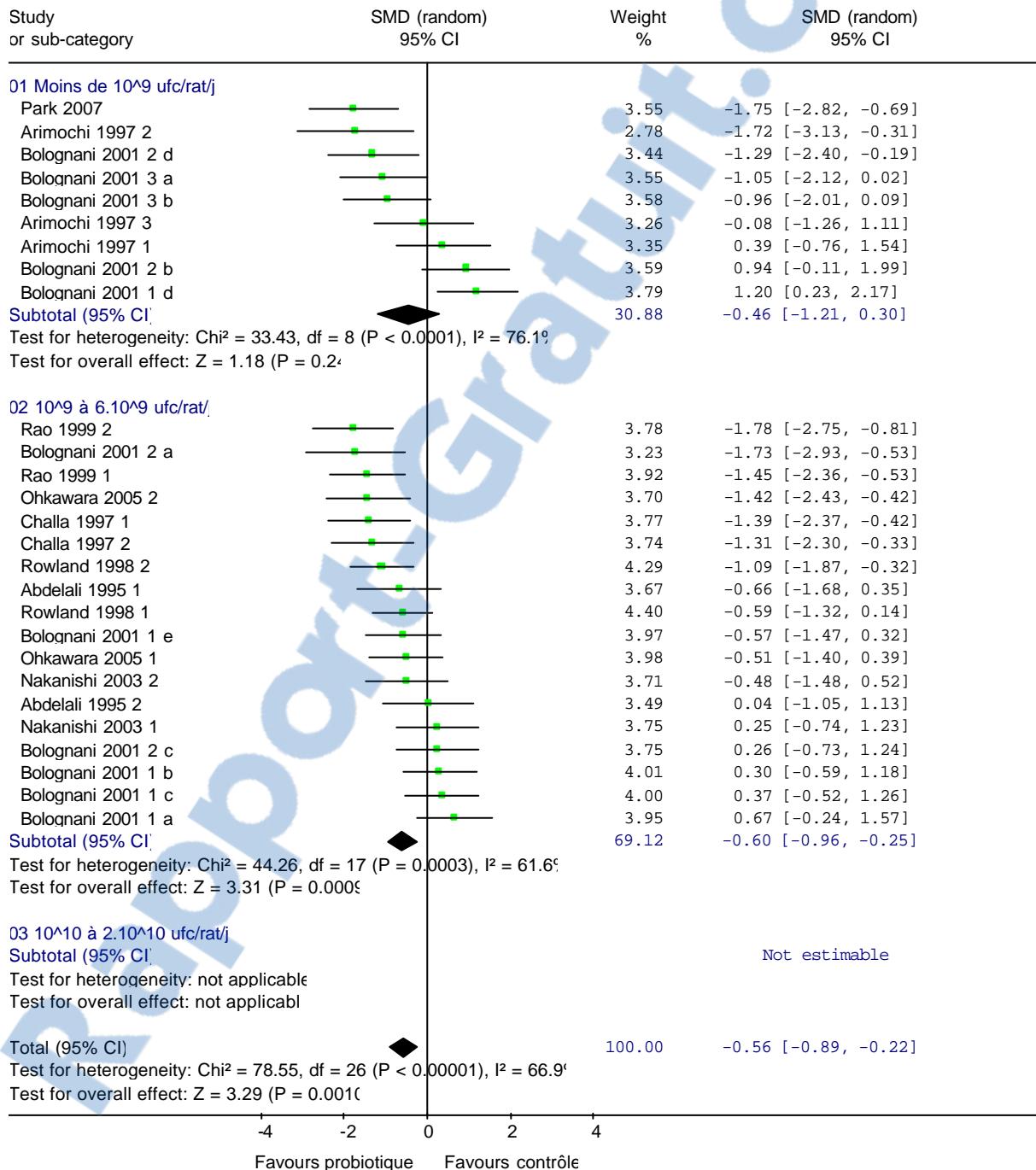


Figure 28 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon la dose de probiotique administrée quotidiennement

Il n'y aucune étude dans le groupe « Plus de 10^{10} ufc/animal par jour ».

Les deux autres groupes sont hétérogènes. L'effet des probiotiques est non significatif dans le groupe « Moins de 10^9 ufc/animal/j » (ES = -0,46 ; IC = [-1,21 ; 0,30]). Il est significatif dans le groupe « 10^9 à 6.10^9 ufc/animal/jour » (ES = -0,60 ; IC = [-0,96 ; -0,25]).

Il ne semble pas y avoir de différence entre ces deux groupes.

► *Critère de jugement cryptes aberrantes*

Un seul auteur a distribué moins de 10^9 ufc/animal et par jour (Park 2007). L'effet est significatif (ES = -1,54 ; IC = [-2,56 ; -0,51]).

Tous les autres ont distribué 10^9 à 6.10^9 ufc/animal/jour. Ce groupe est homogène, et l'effet est significatif (ES = -1,08 ; IC = [-1,49 ; -0,67]).

Pour le nombre de cryptes aberrantes, la dose de probiotique distribuée ne semble pas affecter l'effet protecteur.

► *Conclusion sur le facteur de variation « Dose de probiotique »*

La quantité de probiotique distribuée ne semble pas jouer de rôle dans la variation de l'effet protecteur des probiotiques, quel que soit le critère de jugement considéré.

4.4.3. *Période d'administration par rapport au traitement carcinogène*

Nous avons constitué trois sous-groupes afin d'étudier le rôle de ce facteur dans la variabilité de l'effet du traitement.

Le sous-groupe « Distribution des probiotiques (avant, pendant et après) ou (pendant et après) le traitement carcinogène » est constitué d'études qui ont distribué les probiotiques à la fois pendant la phase d'initiation et pendant la phase de promotion.

Le sous-groupe « Distribution des probiotiques (uniquement pendant) ou (avant et pendant) le traitement carcinogène » est constitué d'essais qui permettent d'étudier l'effet des probiotiques lorsqu'ils sont distribués uniquement pendant la phase d'initiation.

Le sous-groupe « Distribution des probiotiques uniquement après le traitement carcinogène » est constitué d'essais qui permettent d'étudier l'effet des probiotiques lorsqu'ils sont distribués uniquement pendant la phase de promotion.

► Critère de jugement incidence des tumeurs

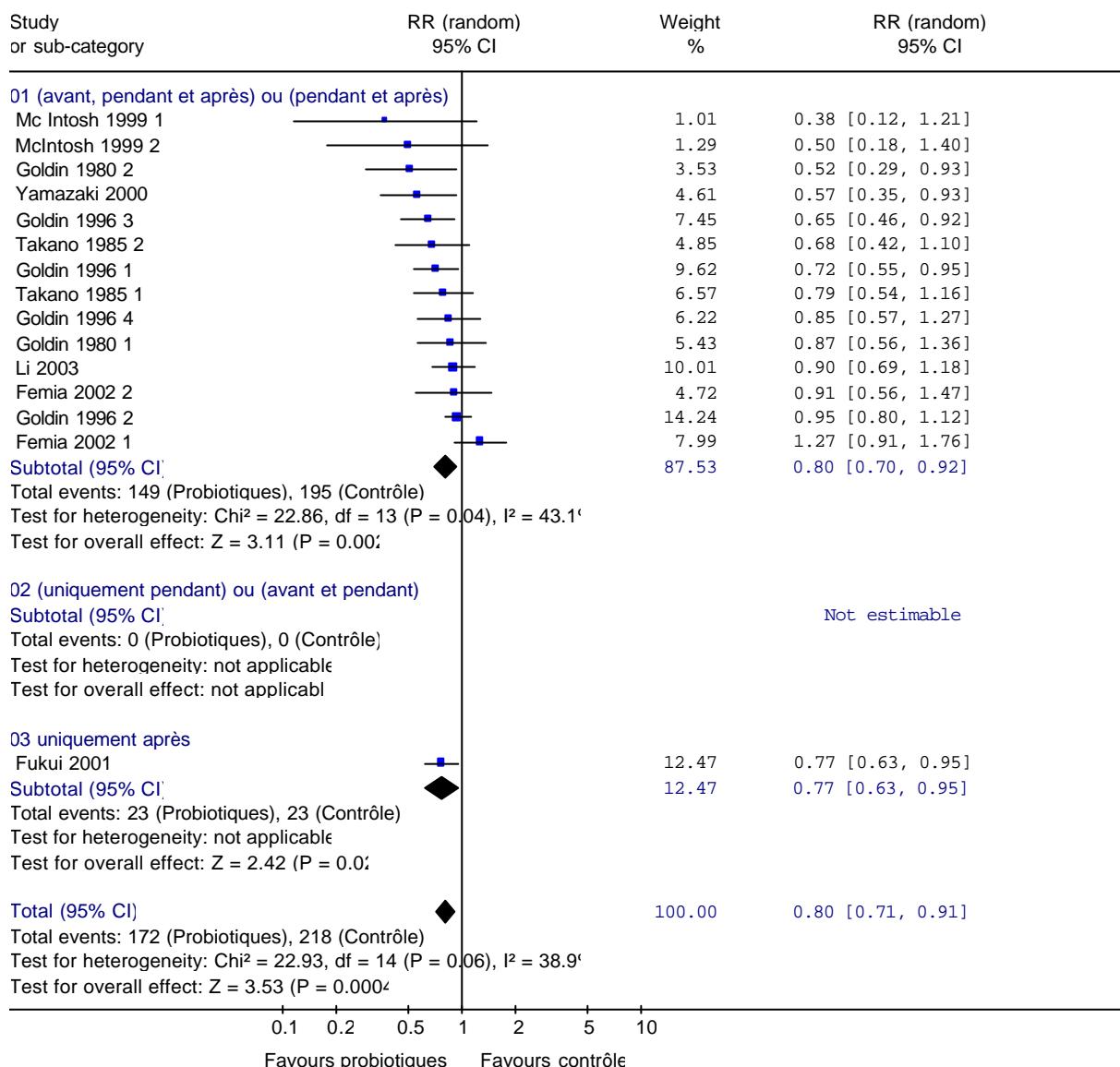


Figure 29 : Forest plot pour le critère incidence des tumeurs, modèle aléatoire, selon la période d'administration des probiotiques par rapport au traitement carcinogène

Il n'y a aucune étude dans le sous-groupe « (uniquement pendant) ou (avant et pendant) ». Il n'y en a qu'une seule dans le sous-groupe « uniquement après ». L'effet de cette étude est significatif.

Le sous-groupe « (avant, pendant et après) ou (pendant et après) » est homogène ($I^2 = 43\%$). L'effet des probiotiques dans cette étude est significatif.

Les risques relatifs des deux sous-groupes sont quasiment identiques, et leurs intervalles de confiance se superposent.

On considère qu'il n'y a pas de différence d'activité des probiotiques, qu'ils soient distribués pendant les phases d'initiation et de promotion des tumeurs, ou uniquement pendant la phase de promotion.

► *Critère de jugement ACF*

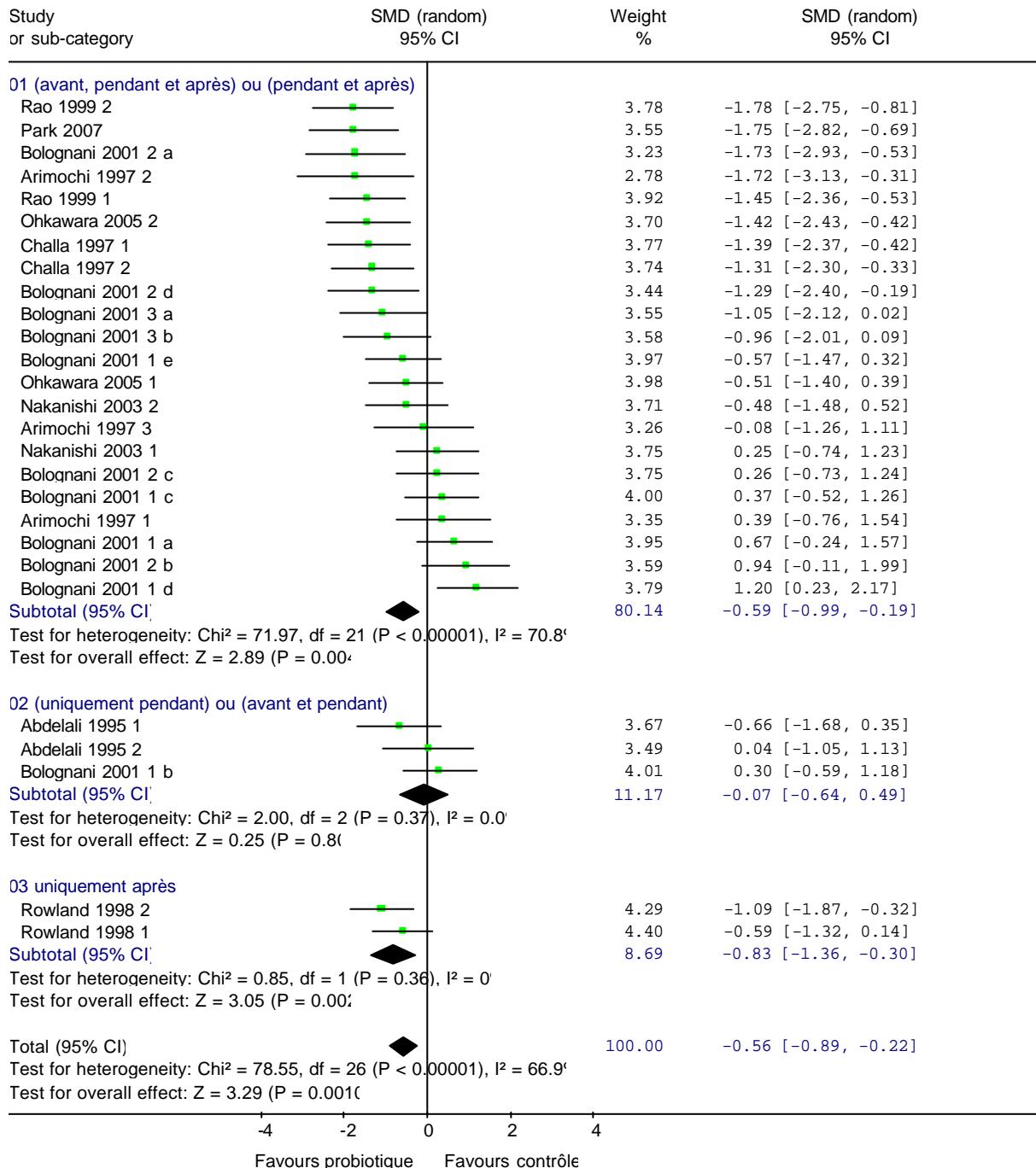


Figure 30 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire, selon la période d'administration des probiotiques par rapport au traitement carcinogène

Le sous-groupe « (avant, pendant et après) ou (uniquement pendant) » est hétérogène. L'effet standard calculé est significatif (ES = -0,59 ; IC = [-0,99 ; -0,19]).

Le sous-groupe «(uniquement pendant) ou (avant et pendant)» est homogène. L'effet standard calculé est non significatif, et proche de zéro.

Le sous-groupe «uniquement après» est homogène. L'effet standard calculé est significatif (ES = -0,83 ; IC = [-1,36 ; -0,30]).

Il semble que les probiotiques soient plus efficaces s'ils ne sont pas distribués uniquement pendant la phase d'initiation.

► *Critère de jugement cryptes aberrantes*

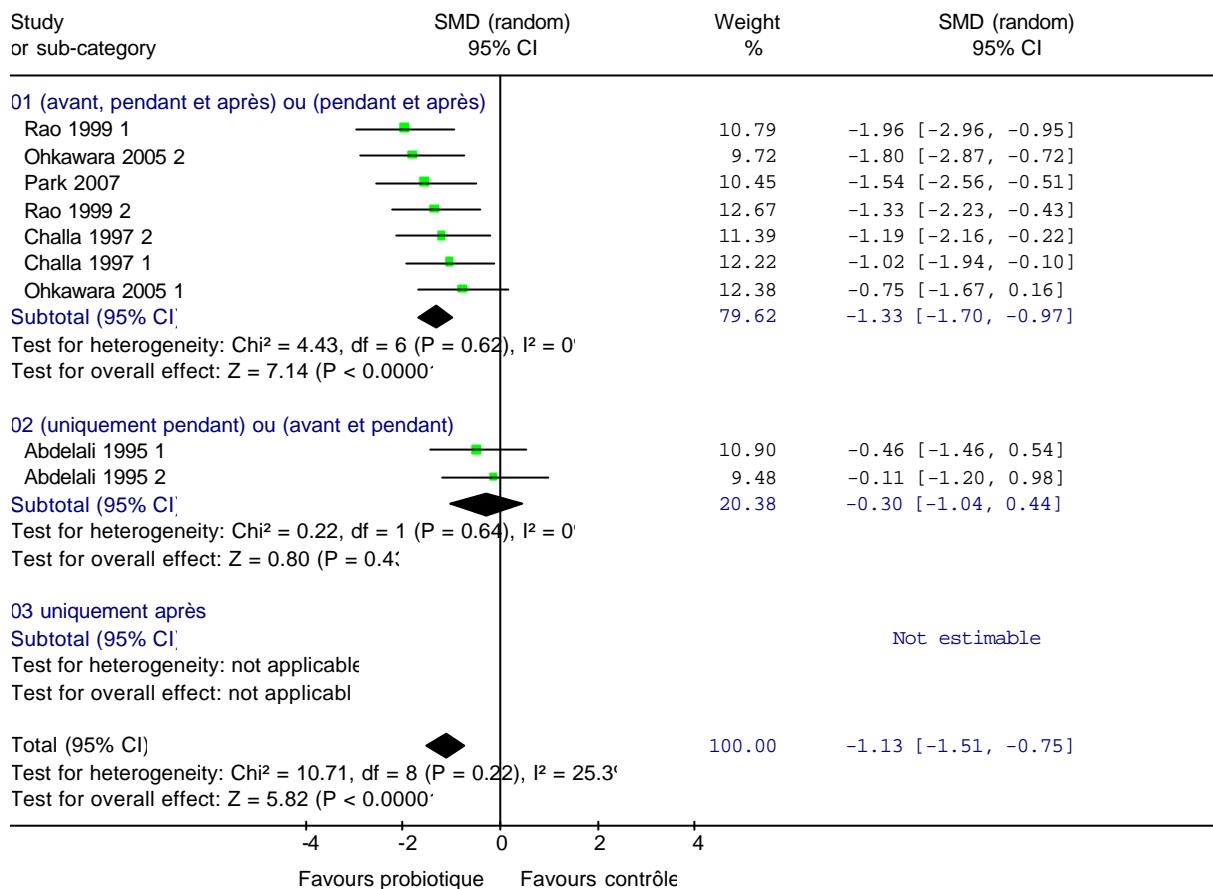


Figure 31 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, selon la période d'administration des probiotiques par rapport au traitement carcinogène

Il n'y a aucune étude dans le sous-groupe «uniquement après».

Il y en a deux du même auteur dans le sous-groupe «(uniquement pendant) ou (avant et pendant)». Ces essais sont homogènes, leur effet est non significatif (ES = -0,30 ; IC = [-1,04 ; 0,44]).

Le sous-groupe «(avant, pendant et après) ou (pendant et après) » est homogène.

L'effet des probiotiques dans cette étude est significatif (ES = -1,33 ; IC = [-1,70 ; -0,97]).

Les effets standardisés moyens sont très différents, les intervalles de confiance ne se recoupent qu'à peine. Il semble que les probiotiques soient plus efficaces s'ils ne sont pas distribués uniquement pendant la phase d'initiation.

► *Conclusions sur le facteur de variation « Phase de distribution des probiotiques »*

Pour les critères de jugement ACF et cryptes aberrantes, aucun effet significatif des probiotiques n'a été démontré lorsqu'ils sont distribués uniquement pendant la phase d'initiation de la cancérogenèse.

Par contre, qu'il s'agisse du critère incidence des tumeurs, ACF ou cryptes aberrantes, l'effet des probiotiques est toujours significatif et protecteur lorsqu'ils sont distribués pendant la phase de promotion en plus de la phase d'initiation.

Il semble donc que l'efficacité soit supérieure lorsque les probiotiques sont distribués pendant la phase de promotion.

4.5. Conclusion sur les analyses en sous-groupes

Les analyses en sous-groupes nous ont permis de déterminer plusieurs facteurs de variation majeurs sur l'efficacité des probiotiques en tant qu'inhibiteurs de la cancérogenèse.

Les facteurs de variation les plus nets sont des facteurs extrinsèques aux probiotiques. Ainsi, l'administration de DMH par voie orale nous paraît être un facteur inhibiteur de l'activité des probiotiques.

La lignée des rats semble également un facteur de variation important. Cependant, il nous semble très étrange que l'effet protecteur des probiotiques soit plus important chez les rats Sprague-Dawley que chez les F344 lorsque l'on étudie le critère incidence des tumeurs, alors que l'on constate le contraire lorsque l'on étudie les critères de jugement ACF et cryptes aberrantes.

Nous n'avons pas conclu sur le rôle que joue la teneur en matières grasses sur la variation de l'effet protecteur des probiotiques. L'effet protecteur semble plus important lorsque la ration est riche en matières grasses pour le critère ACF, mais on ne constate pas de différence d'effet suivant la teneur en matières grasses pour les critères incidence des tumeurs, et cryptes aberrantes.

Les facteurs de variation intrinsèques aux probiotiques ne paraissent pas avoir beaucoup d'importance sur leur rôle protecteur : on constate globalement un effet protecteur significatif pour tous les critères de jugement, quelles que soient l'espèce et la dose du probiotique utilisé.

Il semble que la période de distribution du probiotique par rapport au traitement carcinogène joue un rôle sur son efficacité : elle est meilleure lorsque le probiotique est distribué pendant la phase de promotion.

	Carcinogène			Animal	Environnement	Probiotique		
	Nature	Dose DMH	Voie	Lignée de rat	Tx MG aliment	Genre	Dose	Période
Tumeur RR = 0,76 ; IC = [0,68:0,84]	AOM : NS, h DMH : S, H 0,78:[0,69:0,89] Autres : NS Reddy	<100 mg : S, H 0,44:[0,20:0,96] >100 mg : S, H 0,80:[0,72:0,90]	Parentérale : S, H 0,80:[0,71:0,91] PO : NS (Reddy 1993)	SP : S, H 0,53:[0,35:0,80] F344 : S, H 0,83:[0,72:0,96] Wistar : NS Souris : S Une seule étude 0,77:[0,63:0,95]	<5% : S, H 0,77:[0,68:0,87] >20% : NS, h	Lacto : S, H 0,74:[0,63:0,88] Bifido : NE Autres : NS, H 0,92:[0,75:1,12]	<10⁹ : S, H 2 études McIntosh 0,44:[0,20:0,96] 10⁹-6.10⁹ : NS, H >10⁹ : S, h 0,75:[0,62:0,92]	AvPAp/PAp : S, H 0,80:[0,70:0,92] P : NE Ap : S Une seule étude 0,77:[0,63:0,95]
ACF ES = -0,54 ; IC = [-0,73:-0,35]	AOM : S, H -0,87:[-1,24:-0,51] DMH : NS, h Autres : NS Une seule étude (Park 2007) -1,75:[-2,82:-0,69]	<100 mg : NS, h >100 mg : S Une seule étude (Park 2007) -1,75:[-2,82:-0,69]	Parentérale : S, h -0,86:[-1,19:-0,53] PO : NS, h	SP : NS, h F344 : S, h -1,13:[-1,68:-0,58]	<5% : S, h -0,46:[-0,84:-0,08] >20% : S, H -1,01:[-1,46:-0,56]	Lacto : NS, h Bifido : S, h -0,58:[-1,10:-0,07] Autres : S, H -0,76:[-1,45:-0,08]	<10⁹ : NS, h 10⁹-6.10⁹ : S, h -0,60:[-0,96:-0,25] >10⁹ : NE	AvPAp/PAp : S, h -0,59:[-0,99:-0,19] P : NS Ap : S, H 2 études Rowland -0,83:[-1,36:-0,30]
AC ES = -1,13 ; IC = [-1,45:-0,80]	AOM : S, H -1,35:[-1,83:-0,88] DMH : S, H -0,92:[-1,53:-0,32] Autres : NE	<100 mg : S, H -0,77:[-1,45:-0,10] >100 mg : S Une seule étude (Park 2007) -1,54:[-2,56:-0,51]	Parentérale : S, H -1,10:[-1,55:-0,66] PO : S, H 2 études Ohkawara (souris) -1,23:[-2,26:-0,21]	SP : NS, h F344 : S, H -1,39:[-1,81:-0,96] Souris : S, H 2 études -1,23:[-2,26:-0,21]	<5% : S, H -1,08:[-1,49:-0,67] >20% : S Une seule étude -1,54:[-2,56:-0,51]	Lacto : S, H -1,61:[-2,28:-0,96] Bifido : S, H -0,74:[-1,23:-0,24] Autres : S, H -1,31:[-1,94:-0,68]	<10⁹ : S Une seule étude -1,54:[-2,56:-0,51] 10⁹-6.10⁹ : S, H -1,08:[-1,49:-0,67] >10⁹ : NE	AvPAp/PAv : S, H -1,33:[-1,70:-0,97] P : NS Ap : NE

Tableau 4 : Synthèse des résultats des métanalyses en sous-groupes

S : Significatif ; NS : Non significatif ; NE : Non estimable ; H : homogène ; h : hétérogène ; Av : avant ; P : pendant ; Ap : après

5. Cas des synbiotiques

Un synbiotique est une association entre un probiotique et un prébiotique. L'effet protecteur de cette association est censé être supérieur à la somme des effets de chacun des deux produits.

Nous avons démontré que les probiotiques avaient globalement un effet protecteur contre le cancer du côlon. Nous voudrions savoir si l'effet des probiotiques est supérieur lorsqu'ils sont administrés en même temps que des prébiotiques.

Pour ce faire, nous avons réalisé une méta-analyse sur les synbiotiques suivant le même principe que celle sur les probiotiques. Les articles utilisés ont déjà été présentés dans le Chapitre II de la deuxième partie, à l'exception de Caderni 2003 [89].

Nous avons dans chaque étude comparé deux groupes d'animaux strictement identiques, à l'exception de l'alimentation : le groupe contrôle a reçu uniquement l'aliment standard, tandis que l'autre a reçu un complément à base de probiotiques et de prébiotiques.

Nom de l'étude	Groupes utilisés*	Carcinogène	Animaux utilisés	Prébiotique	Probiotique	Sacrifice (après début carcinogène)	Critère de jugement
Caderni 2003 S 1		AOM, sc	Rats m F344	Raftilose synergy 1 (inuline)	<i>L.delbrueckii</i> (LGG) et <i>B.lactis</i> (Bb12)	7 semaines	ACF
Caderni 2003 S 2		AOM, sc	Rats m F344	Raftilose synergy 1 (inuline)	<i>L.delbrueckii</i> (LGG) et <i>B.lactis</i> (Bb12)	15 semaines	ACF
Challa 1997 S	C : 1 T : 4	AOM, sc	Rats m F344	Lactulose	<i>Bifidobacterium longum</i>	10 semaines	ACF
Femia 2002 S	C : 1 T : 4	AOM, sc	Rats m F344	Raftilose synergy 1 (inuline)	<i>L.delbrueckii</i> (LGG) et <i>B.lactis</i> (Bb12)	31 semaines	Incidence des tumeurs
Koo 1991 S		DMH, sc	Souris f CF1	Neosugar	<i>Bifidobacterium</i>	42 semaines	ACF
Nakanishi 2003 S	C : 2 T : 5	AOM, sc	Rats m F344	High Amylose Starch	<i>Clostridium butyricum</i>	5 semaines	ACF
Rowland 1998 S	C : 1 T : 4	AOM, sc	Rats m S D	Inuline	<i>Bifidobacterium longum</i>	14 semaines	ACF

Tableau 5 : Caractéristiques des études incluses dans la méta-analyse sur les synbiotiques

C : groupe contrôle ; T : groupe traitement (synbiotique) ; sc : voie sous-cutanée ; f : femelle ; m : mâle ; S D : Sprague-Dawley ; * : pour plus de précisions sur les groupes utilisés, se reporter aux caractéristiques des articles (deuxième partie, chapitre II)

Les types de mesures utilisés sont les effets standardisés pour les ACF, et les risques relatifs pour l'incidence des tumeurs.

Nous avons choisi de réaliser directement une méta-analyse en modèle aléatoire.

Compte tenu du petit nombre d'études sur le sujet, nous n'avons pas réalisé de méta-analyse en sous-groupes.

5.1. Critère de jugement « Incidence des tumeurs »

Le graphique pour ce critère n'est pas présenté, car une seule étude l'a utilisé (Femia 2002 S). On a : RR = 0,81 ; IC = [0,51 ; 1,27] (effet non significatif).

Bien que ce résultat ne soit pas significatif, le risque relatif moyen calculé est assez proche de celui calculé dans la méta-analyse globale des probiotiques.

Nous ne pouvons pas conclure à un effet supérieur des synbiotiques par rapport aux probiotiques pour le critère de jugement incidence des tumeurs.

5.2. Critère de jugement « ACF »

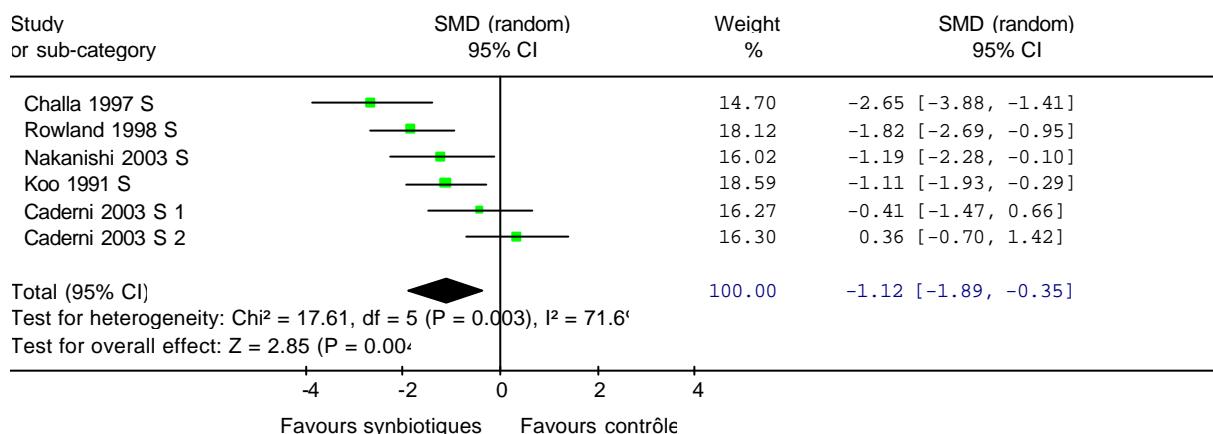


Figure 32 : Forest plot pour le critère ACF, modèle aléatoire

L'hypothèse d'homogénéité est rejetée.

On observe un effet significatif des synbiotiques sur le critère ACF (rejet de l'hypothèse nulle du test d'association). ES = - 1,12 ; IC = [-1,89 ; -0,35].

Cet effet standardisé correspond à une taille d'effet du traitement très importante.

L'effet standardisé commun calculé pour l'ensemble des études incluses dans la méta-analyse sur les probiotiques était ES = -0,56 ; [-0,84 ; -0,22]. L'effet protecteur des probiotiques seuls semble donc bel et bien inférieur à celui des synbiotiques.

5.3. Conclusion sur les synbiotiques

La seule étude ayant utilisé l'incidence des tumeurs comme critère de jugement ne met en évidence aucun effet des synbiotiques.

Pour le critère de jugement ACF, l'effet standardisé calculé pour les synbiotiques est inférieur à celui calculé pour les probiotiques. Les intervalles de confiance calculés pour chacun de ces effets se superposent en partie, mais les synbiotiques semblent plus protecteurs que les probiotiques seuls. Toutefois, la méta-analyse sur les synbiotiques ne comprend que 6 études.

Les facteurs qui expliquaient (en partie) la variabilité de l'effet du traitement dans l'analyse sur les probiotiques ne sont peut être pas présents de la même manière dans cette seconde méta-analyse : aucun protocole n'a utilisé de DMH par voie orale, un seul auteur a utilisé des rats Sprague-Dawley...

Chapitre IV

Discussion

Les méta-analyses que nous avons réalisées démontrent globalement un effet protecteur des probiotiques et symbiotiques contre la cancérogenèse colorectale chimio-induite chez les rongeurs de laboratoire.

Pour les probiotiques, cet effet est statistiquement significatif, et de taille moyenne. Pour l'incidence des tumeurs, le risque relatif est égal à 0,79 avec un intervalle de confiance à 95% égal à [0,70 ; 0,91]. Pour le critère de jugement ACF, nous avons observé un effet standardisé égal à -0,56 avec un intervalle de confiance à 95% égal à [-0,89 ; -0,22].

Pour les symbiotiques, nous n'avons pu réaliser de méta-analyse que pour le critère de jugement « ACF ». L'effet obtenu est statistiquement significatif, et de grande taille (ES = - 1,12 ; IC = [-1,89 ; -0,35]).

Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation de probiotiques ou de symbiotiques en chimioprévention humaine, mais quelle est leur validité ? En effet, la technique de méta-analyse que nous avons utilisée est-elle vraiment adaptée pour traiter des études comportant autant de facteurs de variations que celles que nous avons utilisées ? Quelles sont les applications de ces résultats ? Peut-on extrapoler à l'Homme des résultats obtenus chez les rongeurs ? Chez les rongeurs, les probiotiques et symbiotiques sont-ils plus intéressants que les autres substances déjà évaluées ? Enfin, comment pourrait-on les intégrer à l'alimentation humaine ?

1. Considérations « techniques » : validité de la méthode utilisée pour l'analyse des données

1.1. Répartition normale ou dissymétrique des données

La répartition normale des données est indispensable pour les utiliser dans la méta-analyse. Nous avons formulé le postulat initial : « à partir du moment où les auteurs donnent une moyenne et un écart-type, nous avons admis que les données étaient réparties suivant une loi normale ». Nous sommes assez démunis pour vérifier que les données suivent effectivement une loi normale. La seule indication qui nous permet de douter de la répartition normale des données est le rapport moyenne/variance : s'il est inférieur à 1, il est assez probable que les données ne suivent pas une loi normale. Cette situation n'est présente qu'une seule fois dans notre méta-analyse (ACF, Rowland 1998 2, groupe probiotique). D'après le manuel qui accompagne le logiciel [90], les méthodes statistiques utilisées pour la méta-analyse sont assez peu influençables par la dissymétrie, nous considérerons donc que les résultats sont corrects de ce point de vue là.

1.2. Hétérogénéité

Les études que nous avons rassemblées sont très différentes : les protocoles utilisés sont variables, tant au niveau du traitement carcinogène qu'au niveau des probiotiques ou des animaux utilisés. Il n'est donc pas surprenant que l'effet du traitement calculé diffère entre chaque étude.

Nous pouvons nous demander s'il est vraiment raisonnable d'utiliser ces études dans une même méta-analyse : l'effet commun calculé correspond-il à un effet réel ?

Nous avons dans un premier temps calculé un effet commun en utilisant un modèle fixe. Toutes les analyses suivantes ont été réalisées en utilisant un modèle aléatoire, qui intègre la variabilité de l'effet du traitement dans les calculs. L'effet moyen calculé en modèle fixe est quasiment identique à celui calculé en modèle aléatoire pour la méta-analyse globale, pour tous les critères de jugement considérés. Bien que l'effet du traitement varie selon les conditions expérimentales, l'effet moyen calculé correspond à l'effet du traitement rencontré le plus fréquemment.

1.3. Analyses en sous-groupes

Les analyses en sous-groupes ont pour objectif d'explorer l'hétérogénéité des études. En réalisant une analyse en sous-groupes pour chaque facteur de variation identifié, nous avons souhaité explorer toutes les pistes, afin d'identifier un facteur qui pourrait expliquer la variabilité de l'effet du traitement entre les études.

Un des problèmes avec les analyses en sous-groupes est d'utiliser le nombre d'analyses approprié : ni trop, ni trop peu.

Si l'on effectue trop d'analyses en sous-groupes, on risque d'identifier un facteur comme facteur de variabilité prépondérant à tort [90]. En caricaturant, si nous avions réalisé une analyse en sous-groupes en fonction du signe astrologique du soigneur des animaux, nous aurions peut être démontré que lorsque ce dernier est Sagitaire, l'effet des probiotiques est plus protecteur que si le soigneur est Cancer... Nous avons choisi les analyses en sous-groupes que nous souhaitions réaliser en fonction de connaissances scientifiques pour expliquer l'importance de chaque facteur étudié. Chacune des analyses que nous avons réalisé nous semble justifiée.

Au contraire, il est possible que nous n'ayons pas réalisé suffisamment d'analyses en sous-groupes. Par exemple, nous n'avons pas réalisé de méta-analyse en fonction de la teneur en amidon de l'aliment. Or, la seule étude utilisant le critère de jugement « incidence des tumeurs » pour lequel le risque relatif est supérieur à 1 est l'étude Fémia 2002. Fémia est le seul auteur à avoir précisé que l'aliment distribué aux rats ne contenait pas du tout d'amidon... Nous aurions également pu réaliser des méta-analyses en sous-groupes de sous-groupes (ce que nous avons en partie fait pour la voie d'administration du DMH), mais l'interprétation des résultats obtenus se serait révélée encore plus hasardeuse compte tenu du faible nombre d'études dans chaque sous-groupe.

Un second problème avec les analyses en sous-groupes est qu'elles ne tiennent pas compte des interactions entre les différents facteurs (voir ci-dessous), ni des facteurs liés. En effet, certains facteurs sont liés entre eux. On peut faire une analyse en sous-groupe pour étudier un

facteur « A » (par exemple la nature du cancérigène), puis une seconde pour étudier un facteur « B » (par exemple la voie d'administration du cancérigène), et constater qu'un sous-groupe de la seconde analyse contient exactement les mêmes études qu'un sous-groupe de la première analyse. Comment conclure dans ce cas ? Les possibilités sont multiples : le facteur « A » ou le facteur « B » peuvent être responsables à eux seuls de la variabilité du traitement, ou alors il faut qu'ils soient présents tous les deux pour avoir un effet, ou encore ils peuvent être liés à un troisième facteur que l'on n'a pas identifié...

Nous avons rencontré ce problème pour l'administration de DMH par voie orale : toutes les études qui ont utilisé ce moyen pour induire la cancérogenèse ont été réalisées par Bolognani, avec des rats Sprague-Dawley. L'effet des probiotiques serait-il similaire à celui calculé dans ce cas si le DMH avait été administré par voie orale à des rats F344 ? Ou si l'on avait administré de l'AOM par voie orale aux rats Sprague-Dawley ? Qui sait...

1.4. Modèles d'effets, interactions entre les facteurs de variabilité

Nous avons étudié les facteurs de variabilité au travers de méta-analyses en sous-groupes. Cependant, ce système utilise le postulat que les facteurs de variabilité sont additifs, et il ne prend pas en compte les interactions entre les différents facteurs.

Si l'on veut modéliser l'effet du traitement tel qu'on le conçoit dans une méta-analyse classique, on obtient :

$$E = \mu + F_1 + F_2 + \dots + F_i + \epsilon$$

avec E : effet du traitement dans l'étude ; μ : effet moyen du traitement ; F_1, F_2, \dots : facteurs de variabilité 1, 2, ... ; et ϵ : part du hasard.

Or, un facteur peut interagir avec un autre, et la modélisation de l'effet du traitement devient beaucoup plus complexe :

$$E = \mu + F_1 + F_2 + \dots + F_i + (F_1 \times F_2) + (F_1 \times F_3) + (F_1 \times F_i) + (F_2 \times F_k) + \dots + \epsilon$$

La méta-régression consiste à modéliser la taille de l'effet en fonction d'une ou plusieurs covariables, en employant les techniques de régression. Par rapport aux analyses en sous-groupes, la modélisation de l'effet permet une analyse plus fine dans le cas d'une covariable continue (là où l'analyse en sous-groupes découpe cette variable en classes). De plus, la prise en compte simultanée de plusieurs covariables devient possible. Cependant, bien souvent, la méta-régression n'apporte pas plus de renseignements qu'une analyse en sous-groupes bien conduite, moins exigeante au niveau des hypothèses statistiques faites sur les données [91].

Le logiciel RevMan ne permet pas de réaliser de méta-régression.

1.5. Utilisation de plusieurs études issues du même article

De nombreux articles ont « fourni » plusieurs études, deux dans la majeure partie des cas. Cependant, l'article de Bolognani paru en 2001 [67] nous a procuré 11 études. Conformément à notre protocole, chaque groupe contrôle a été utilisé deux fois au maximum.

D'un côté, cela nous permet d'intégrer plus d'études à la méta-analyse, ce qui augmente la puissance des tests statistiques utilisés, et permet de détecter de plus petits effets.

D'un autre côté, cela augmente le risque d'avoir des facteurs liés : dans le cas de Bolognani, tous les rats utilisés sont des Sprague-Dawley, et 8 études sur 11 utilisent le DMH par voie orale. De plus, nous avons tendance à être plus sceptique lorsque l'on observe un résultat intéressant, mais que toutes les études d'un auteur sont rassemblées dans un sous-groupe, tandis que celles des autres auteurs sont dans un autre sous-groupe.

Nous avons choisi d'inclure les 11 études de Bolognani car elles correspondaient aux critères que nous avions fixés dans le protocole. Ces 11 études utilisent toutes la même lignée de rats, mais elles diffèrent à de nombreux autres points de vue : carcinogène (nature, voie d'administration et dose) et probiotiques utilisés (espèce et dose). Nous ne pensons pas que ces études aient pu biaiser les résultats de la méta-analyse sur les probiotiques (les funnels plots ne suggèrent d'ailleurs rien de la sorte).

1.6. Interprétation des résultats non significatifs

Deux cas de figure peuvent expliquer un résultat non significatif (acceptation de l'hypothèse nulle du test d'association).

Dans le premier cas, l'effet moyen du traitement est quasiment nul (risque relatif proche de la valeur un, ou effet standardisé proche de zéro), et l'intervalle de confiance est plus ou moins resserré autour de cet effet moyen (par exemple RR = 0,98 ; IC = [0,90 ; 1,06]).

Dans le second cas, le risque relatif est nettement différent de un, ou l'effet standardisé est nettement différent de zéro, mais l'intervalle de confiance est suffisamment étendu pour englober à la fois des valeurs supérieures et inférieures à ces valeurs seuils (par exemple ES = -1,00 ; IC = [-2,06 ; 0,06]).

Nous avons choisi de commenter les résultats non significatifs en tenant compte de ces deux cas de figures, car il nous semble qu'ils n'ont pas la même valeur.

2. Application des résultats obtenus

L'objectif des études de chimioprévention est d'identifier des substances protectrices contre le cancer, afin de pouvoir intégrer ces substances dans l'alimentation humaine et réduire ainsi les risques de cancer.

Plusieurs problèmes se posent concernant l'application des résultats de nos méta-analyses. Les études ont été menées sur des rats ou des souris, dont les cancers sont chimio-induits : comment extrapoler les données obtenues à l'espèce humaine ?

Les probiotiques utilisés dans les études considérées sont variables. Bien que nous n'ayons pas démontré qu'un genre bactérien était plus protecteur qu'un autre, il existe certainement des bactéries plus appropriées que d'autres pour les utiliser comme probiotiques. Les propriétés protectrices des bactéries sont un critère à prendre en compte pour choisir une espèce plutôt qu'une autre, mais il est impératif de tenir compte d'autres facteurs pour faire ce choix (potentiel pathogène, conservation des bactéries, modifications des qualités organoleptiques des aliments si elles y sont incorporées).

2.1. Extrapolation des résultats des méta-analyses à l'espèce humaine

2.1.1. Induction de la cancérogenèse chez les rongeurs

Le modèle animal qui consiste à injecter de l'AOM ou du DMH à des rats, puis à dénombrer le nombre d'ACF ou de tumeurs paraît un modèle intéressant pour le cancer colorectal au niveau de la facilité d'utilisation et du coût (Taille des animaux, facilité de manipulation, coût des animaux et du traitement carcinogène, facilité d'utilisation de l'AOM et du DMH par rapport aux AAH et risque pour l'utilisateur moindre, coût inférieur aux souris Min).

Bien que les noix de cycas soient une source majeure d'amidon pour certaines populations de zones tropicales [27], l'AOM et le DMH ne sont pas normalement présents dans l'alimentation occidentale. L'extrapolation des résultats de ces expériences à l'espèce humaine semble donc délicate. Toutefois, la comparaison des résultats de méta-analyses similaires à la notre avec les résultats d'études d'intervention chez l'Homme a montré que les résultats obtenus dans les deux cas étaient cohérents, au moins pour l'aspirine, le calcium, et le carotène [92].

Un modèle de cancérogenèse colorectale radicalement différent a été développé par Newmark. Il a décidé d'alimenter des souris en leur donnant « *l'équivalent de nos mauvaises habitudes alimentaires* » [93].

Des souris normales C57Bl/6 mâles et femelles ont reçu une alimentation riche en matières grasses, et appauvrie en calcium, vitamine D, fibres, folates, méthionine et choline. Les taux de chacun de ces composés dans l'aliment distribué aux souris étaient similaires à ceux que l'on observe dans l'alimentation occidentale classique. Les souris n'ont reçu aucun carcinogène. Après 18 mois de cette alimentation, 5 des 12 souris (42%) avaient des tumeurs intestinales, dont un carcinome et quatre adénomes. Aucune des 10 souris qui recevaient une alimentation classique pour rongeur n'avait de tumeur.

Dans le cas particulier de l'étude des probiotiques, ce modèle nous semble particulièrement intéressant. En effet, on ignore les mécanismes d'action exacts des probiotiques.

Admettons que les bactéries considérées se lient directement aux carcinogènes ; leur affinité avec l'AOM, le DMH, ou leurs métabolites présents dans le gros intestin est certainement différente de celle des cancérogènes responsables du cancer colorectal chez l'homme.

Dans le cas où l'activité protectrice des probiotiques serait due à une modification du métabolisme des carcinogènes (que ce soit par les probiotiques eux-mêmes, par la flore endogène suite aux modifications de l'environnement colique, ou par les colonocytes), alors on peut penser que les substrats seront affectés différemment par ce changement, et les produits seront différents en fonction du carcinogène ou procarcinogène initial.

Les résultats des méta-analyses en sous-groupes laissent supposer une diminution de l'activité protectrice des probiotiques lorsque le traitement cancérogène est effectué avec du DMH administré par voie orale. Ces résultats nous paraissent un argument valable en faveur du modèle proposé par Newmark.

2.1.2. *Choix des critères de jugement*

L'incidence et le nombre de tumeurs sont les critères de jugement de référence. Nous n'avons étudié que l'incidence des tumeurs, en raison du nombre insuffisant d'études pour lesquelles le nombre de tumeurs était disponible (quatre études uniquement, dont trois du même auteur).

Les ACF sont des lésions préneoplasiques couramment utilisées comme critère de jugement dans les études de chimioprévention. Ces lésions sont sensées être corrélées à l'apparition des tumeurs. Cependant, le bien-fondé de l'utilisation des ACF comme critère de jugement a parfois été remis en question.

Dans la méta-analyse globale des probiotiques, on constate un effet protecteur, que l'on étudie le critère de jugement « incidence des tumeurs » ou le critère « ACF ». Cependant, dans deux des méta-analyses en sous-groupes (Nature du carcinogène et Lignée des animaux), le sous-groupe au sein duquel l'effet protecteur des probiotiques est le plus fort pour le critère « incidence des tumeurs » est celui pour lequel l'effet est le moins fort pour le critère « ACF ».

Les études qui ont utilisé le critère de jugement « incidence des tumeurs » ne sont pas les mêmes que celles qui ont utilisé le critère « ACF » ; les protocoles des études incluses dans chaque sous-groupe sont par conséquent différents. Des facteurs liés aux facteurs étudiés peuvent peut être expliquer les résultats contradictoires. Or, même en écartant les études qui utilisaient le DMH par voie orale de l'analyse en fonction de la lignée des animaux pour le critère « ACF », les résultats restent contradictoires avec ceux obtenus pour le critère « incidence des tumeurs ». Le critère de jugement « ACF » n'est peut être pas le meilleur critère à utiliser dans ce cas...

Caderni [89] a proposé d'utiliser une autre lésion microscopique, les foyers à production de mucine réduite (mucin-depleted foci) ou MDF, comme critère de jugement dans les études de chimioprévention. Les MDF sont des lésions dont les caractéristiques sont les suivantes :

- absence ou très faible production de mucines
- distorsion de la lumière des cryptes en comparaison avec les cryptes normales
- élévation de la lésion au-dessus de la muqueuse colique

- plus de trois cryptes anormales sont rassemblées

Le premier critère est pathognomonique, deux des autres critères au moins doivent être présents pour définir un MDF.

Ces lésions ont été observées dans le côlon de rats 7 semaines après la première de deux injections d'AOM. L'analyse histologique des MDF révèle des dysplasies plus nombreuses que celles observées dans les ACF. Dans l'expérience de Caderni, le nombre de MDF était corrélé avec l'incidence des tumeurs, tandis que le nombre d'ACF ne l'était pas.

2.1.3. *Problèmes relatifs à la flore digestive*

Chez l'Homme, la composition de la flore digestive varie selon les individus. Elle peut également changer, chez un même individu, en fonction de l'alimentation.

La flore digestive d'un Rat et celle d'un Homme sont différentes. Certaines bactéries présentes chez le Rat le sont peut être également chez l'Homme, mais leur métabolisme varie en fonction des conditions du milieu, et ces conditions varient en fonction (entre autres) de l'alimentation.

Les probiotiques interagissent certainement avec la flore intestinale « normale » (compétition pour les nutriments et les sites d'adhésion à la muqueuse, modifications du métabolisme, modifications des conditions physico-chimiques de l'intestin,...). Ces interactions interviennent probablement dans les mécanismes protecteurs des probiotiques contre le cancer.

La plupart des groupes de bactéries potentiellement pathogènes chez l'Homme le sont aussi chez la plupart des animaux (par exemple les Clostridies, les Salmonelles). Par conséquent, il n'est pas impossible que les répercussions de l'administration des probiotiques sur la flore intestinale soient similaires chez l'Homme et chez le Rat. Nous ne pouvons pas en être certains.

L'utilisation de rats gnotoxéniques à flore humaine permettrait de vérifier que les différences de flores digestives du Rat et de l'Homme n'empêchent pas toute extrapolation des résultats de l'un à l'autre pour les études de chémoprévention, notamment pour celles qui étudient les probiotiques.

2.1.4. *Lignée/souche des animaux utilisés*

Les rats sont plus ou moins sensibles à la cancérogenèse induite par le PhIP selon leur lignée [30]. Pourquoi n'en serait-il pas de même pour la cancérogenèse induite par l'AOM (ou le DMH) ?

Les résultats de la méta-analyse en fonction de la lignée des animaux suggèrent que ce facteur a une incidence sur le rôle protecteur des probiotiques. Pour le critère « incidence des tumeurs », les probiotiques semblent plus protecteurs chez les rats Sprague-Dawley que chez les rats F344. Par contre pour le critère ACF, c'est le contraire. Dans ce cas, quels sont les résultats qui sont les plus proches de ceux que l'on peut attendre chez l'Homme ? Bien que l'on n'observe pas d'effet protecteur dans une lignée donnée et d'effet promoteur dans l'autre (ce qui compliquerait encore le problème), les différences d'effet standardisé sont très importantes.

2.1.5. Régime alimentaire

Le Rat et l'Homme sont des mammifères omnivores dont les tubes digestifs sont assez similaires... En théorie, l'extrapolation des résultats obtenus chez le rat à l'espèce humaine n'est pas irréalisable. En pratique, les rats de laboratoires sont nourris essentiellement avec des céréales, bien que certains aliments soient enrichis en matières grasses, parfois d'origine animale, pour que leur régime alimentaire soit plus proche de celui des humains.

Nous avons réalisé une méta-analyse en sous-groupes en fonction de la teneur en matières grasses de l'aliment, à l'issue de laquelle nous n'avons pas conclu à une différence d'effet des probiotiques. Nous pouvons espérer que si ce facteur n'intervient pas chez les rats, il n'interviendra pas non plus chez l'Homme. Cependant, nous n'avons pas tenu compte de la qualité des matières grasses de la ration. Une méta-analyse a montré qu'il existait une corrélation négative entre l'incidence des tumeurs et la quantité d'acides gras oméga-3, tandis que la corrélation entre l'incidence des tumeurs et la quantité d'acides gras poly-insaturés non-oméga-3 était positive quelle que soit la lignée des rats étudiée [94]. Cela pourrait également jouer sur l'efficacité de la protection conférée par la consommation de probiotiques.

De plus, l'alimentation humaine diffère de celle des rats non seulement par la quantité et la qualité des matières grasses qui y sont incorporées, mais également par la quantité et la qualité des glucides et des protéines. Nous n'avons pas étudié l'incidence de ces facteurs sur la variabilité de l'effet protecteur des probiotiques.

L'amidon est le substrat le plus favorable à la production de butyrate par les bactéries [9]. Si la synthèse de butyrate est un des mécanismes principaux qui expliquent l'effet protecteur des probiotiques, alors la qualité des glucides ingérés est un facteur déterminant dans l'expression de cet effet.

2.1.6. Conclusions sur l'extrapolation des résultats

Nous avons étudié l'incidence des probiotiques sur la Cancérogenèse colique chimio-induite chez des rongeurs normoxéniques. Ce modèle ne nous paraît pas le plus adapté pour étudier les probiotiques.

Nous ne considérons pas le modèle de Cancérogenèse colique chimio-induite chez des rongeurs normoxéniques comme le modèle idéal pour l'étude des probiotiques. La critique est aisée, mais que proposer à la place ?

Nous avons parlé du modèle de Cancérogenèse élaboré par Newmark et des animaux gnotoxéniques. Notre modèle idéal serait une combinaison des deux : des souris gnotoxéniques à flore humaine chez lesquelles la Cancérogenèse serait induite par une « mauvaise alimentation », proche de celle consommée par les populations à haut risque pour le cancer du côlon. Cela nécessiterait d'élever des animaux en chambre stérile pendant deux ans, en stérilisant l'eau et les aliments avant de les leur donner.

Modèle idéal...modèle utopique : bien que nous ne puissions pas chiffrer le coût d'une telle expérience, il est fort probable qu'il soit au minimum dix fois supérieur au coût d'une expérience utilisant des rats conventionnels avec Cancérogenèse chimio-induite et utilisation des ACF comme critères de jugement, sans compter l'investissement personnel des équipes de chercheurs pour soigner les animaux tous les jours pendant deux ans...

Le modèle de Newmark mené sur des souris conventionnelles nous paraît un compromis acceptable (au moins au niveau du coût et du matériel requis).

Le modèle de cancérogenèse étudié n'est certes pas idéal. Cependant, il ne nous paraît pas aberrant d'extrapoler les résultats obtenus à l'Homme, en prenant certaines précautions.

Globalement, aucune des méta-analyses réalisées (méta-analyses globales et méta-analyses en sous-groupes) n'a montré que les probiotiques exerçaient un effet promoteur sur la cancérogenèse. Dans le pire des cas, leur effet est non significatif. Dans le meilleur des cas, il est protecteur avec une taille d'effet très importante (par exemple pour le critère ACF chez les rats F344, nous obtenons un effet standardisé ES = -1,13 ; IC = [-1,68 ; -0,58]). Il serait dommage que l'efficacité des probiotiques, relativement nette chez les rongeurs, ne soit pas étudiée aussi chez l'Homme.

2.2. Comparaison des propriétés chimioprotectrices des probiotiques et synbiotiques à celles d'autres substances évaluées chez les rongeurs

Plusieurs autres substances chimioprotectrices testées sur des rongeurs ont fait l'objet de méta-analyses [92,95,96]. Nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus dans ces méta-analyses.

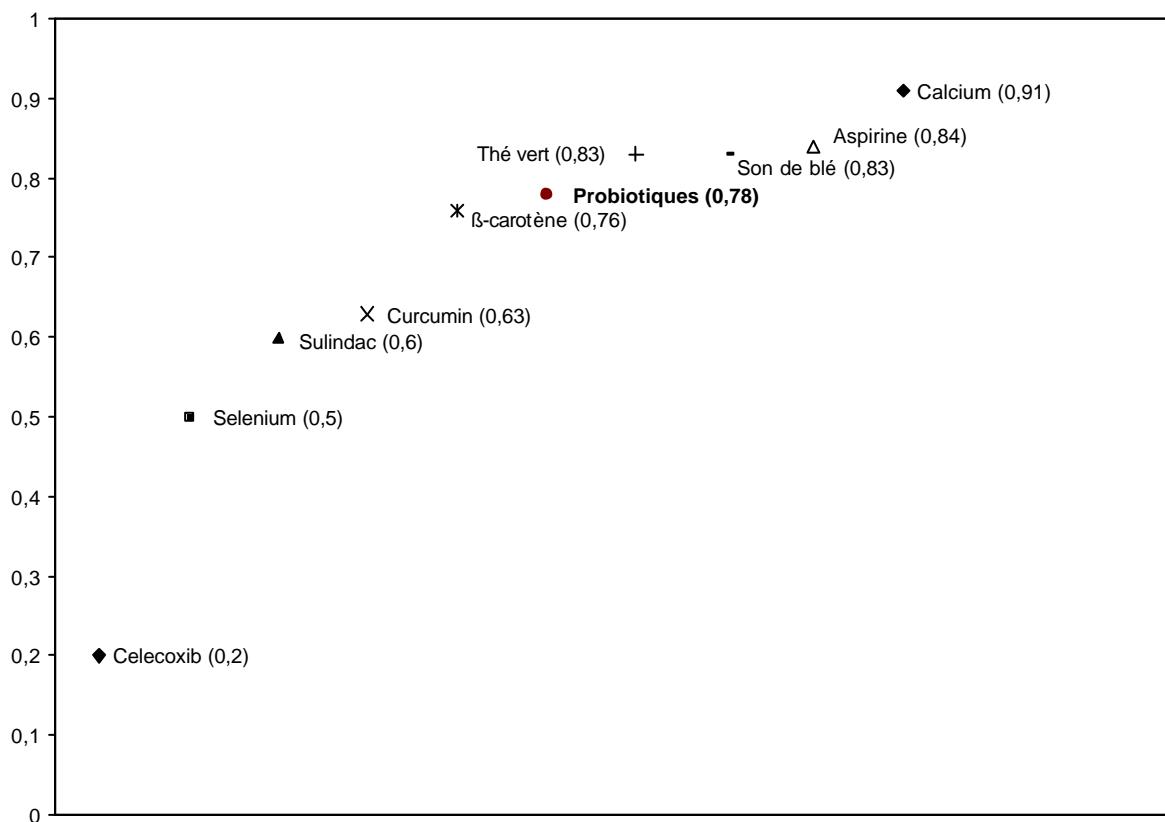


Figure 33 : Comparaison du risque relatif associé à différentes substances sur le risque relatif de cancer colorectal chimio-induit chez les rongeurs. Le nom de chaque substance est suivi du risque relatif associé. Les données proviennent des travaux de Clauzure [95] et Corpet [92].

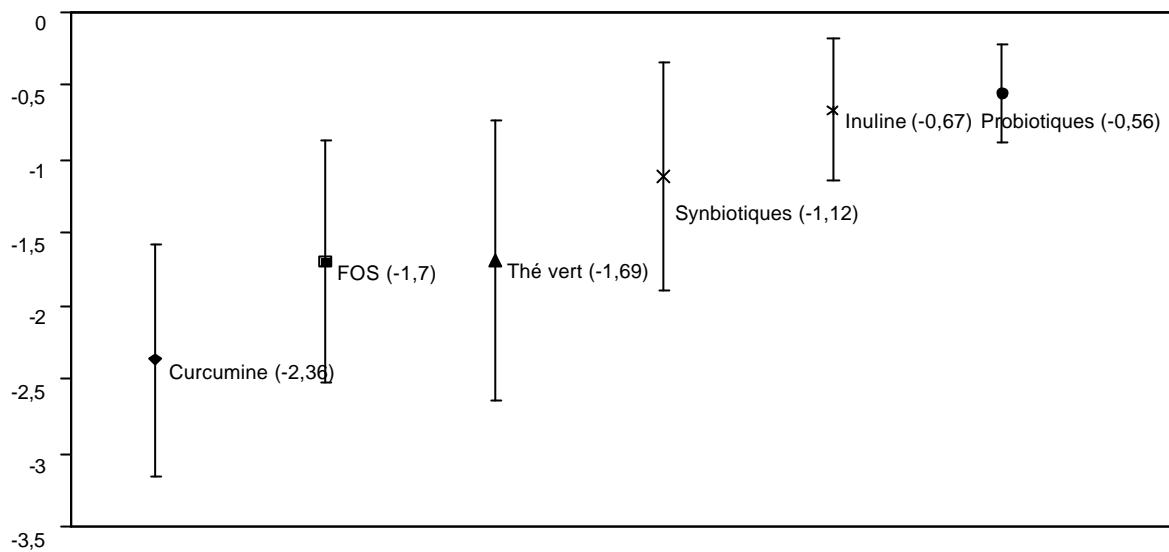


Figure 34 : Comparaison de l'effet standardisé de différentes substances sur le cancer colorectal chimio-induit chez les rongeurs (modèle aléatoire). Le nom de chaque substance est suivi de l'effet standardisé associé. Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance à 95% associé à cet effet. Les données sont issues des travaux de Clauzure [95] et Tournié [96].

Les résultats obtenus chez les rongeurs sont corrects par rapport à d'autres substances telles que le calcium ou le son de blé. Nous pouvons remarquer qu'en ce qui concerne les ACF, l'effet des probiotiques est supérieur à celui de l'inuline ou des probiotiques pris isolément. L'innocuité des bactéries lactiques étant communément admise, nous pensons que les probiotiques pourraient être utilisés dans des essais cliniques chez l'Homme.

2.3. Comment intégrer les probiotiques à l'alimentation humaine ?

2.3.1. *Stade d'administration*

On peut être certain d'avoir une tumeur colorectale, pas de ne pas en avoir, ou en tous cas, on ne peut pas être sûr de ne pas avoir de lésion préneoplasique. On pourrait donc penser que faire une méta-analyse en sous-groupes selon que le probiotique est administré avant, pendant, ou après le traitement carcinogène n'a aucun sens, puisqu'en pratique, chez l'Homme, on ne sait pas si on est à un stade d'induction, de promotion, ou même de progression du cancer. Cependant, on ne peut écarter la possibilité qu'une molécule inhibe le cancer à un stade donné, et le favorise à un autre. C'est justement parce qu'on ne sait pas à quel stade de tumorigénèse on se trouve qu'il fallait faire cette méta-analyse en sous-groupe : si les probiotiques inhibent l'induction, mais favorisent la progression, alors on ne peut pas les considérer comme un traitement sûr... Prenons pour exemple le β -carotène : les résultats positifs d'études de cohorte et d'études cas témoins ont conduits à faire une étude d'intervention avec du β -carotène chez les fumeurs. L'effet protecteur attendu n'a pas été démontré, au contraire ! L'incidence du cancer du poumon et de la mortalité a augmenté chez les patients qui recevaient le β -carotène [97,98].

A défaut d'études, nous n'avons pas pu étudier l'effet des probiotiques sur l'incidence des tumeurs lorsqu'ils sont uniquement distribués pendant la phase d'initiation.

Nous ne disposons que de trois études pour étudier l'effet des probiotiques sur les ACF lorsqu'ils sont distribués uniquement pendant la phase d'initiation. L'effet est non significatif. Cela ne signifie pas que les probiotiques n'ont aucun effet sur la cancérogenèse lorsqu'ils sont uniquement distribués pendant l'initiation. Ils peuvent avoir un effet protecteur que nous n'avons pas pu mettre en évidence. Ils peuvent également avoir un effet promoteur...

Des études d'intervention ont déjà été menées chez l'homme avec des probiotiques. La plupart s'intéressent à d'autres propriétés que leurs propriétés anti-cancérigènes (stimulation du transit intestinal [99], stimulation des défenses immunitaires).

La seule étude d'intervention visant à étudier les propriétés anti-cancérigènes des probiotiques a été menée sur des patients ayant déjà souffert de tumeurs colorectales [100]. On peut admettre que le *Lactobacillus casei* shirota a été administré après la phase d'initiation dans ce cas. L'étude n'a pas été menée en double aveugle. Après 4 ans, le nombre de nouvelles tumeurs chez les patients qui ont consommé quotidiennement le probiotique n'était pas significativement plus faible que chez les patients qui ne l'ont pas consommé. Les tumeurs du groupe « probiotiques » étaient mieux différenciées que celles du groupe « contrôle ».

2.3.2. *Modes de distribution/consommation potentiels des probiotiques*

Les bactéries lactiques sont présentes dans de nombreux aliments (Annexe 1). Cependant, les bactéries qui ont les effets préventifs les plus importants à l'égard du cancer du côlon ne sont pas nécessairement celles que l'on isole naturellement de ces aliments.

Il existe deux options pour proposer des probiotiques anti-cancérigènes au consommateur : développer des compléments alimentaires, ou intégrer ces probiotiques à des aliments.

► *Compléments alimentaires*

De nombreux compléments alimentaires à base de probiotiques sont déjà commercialisés, en pharmacie, sur internet, ou dans des boutiques d'alimentation biologique. Leurs présentations sont similaires à celles de médicaments : poudres, comprimés, gélules.

Ces préparations sont vendues essentiellement pour soulager des troubles digestifs. Un produit destiné à réduire la plaque dentaire a été récemment mis sur le marché (*Lactobacillus reuteri*, sous forme de pastilles à sucer ou de gommes à mâcher).

► *Aliments fonctionnels*

Les aliments fonctionnels regroupent les aliments traditionnels qui contiennent des bactéries qui ont un effet positif sur la santé, et des aliments dans lesquels ont été ajoutées une ou plusieurs espèces microbiennes.

Les consommateurs sont attirés par ce type de produits. Le groupe Danone considère que le segment des laits fermentés frais contenant des probiotiques est le segment des produits laitiers frais ayant connu la croissance la plus rapide [46].

Quatre-vingt pour cent des produits probiotiques sont lancés dans des industries laitières [46]. Les aliments contenant des probiotiques peuvent être [46] :

- des yaourts ou d'autres laits fermentés ;
- des fromages ;
- des aliments pour bébé (lait infantile) ;
- des desserts et crèmes glacées (la résistance des souches à la congélation est un souci supplémentaire dans l'élaboration de ces produits) ;
- des matières grasses (margarine ou beurre) ;
- des boissons. Les jus de fruits ne restent pas longtemps dans l'estomac (les probiotiques sont donc moins exposés aux conditions acides), mais ils n'offrent pas les conditions optimales pour la survie des bactéries avant leur consommation (pH acide et absence de matières grasses) ;
- des produits de boulangerie (biscuits). La survie des bactéries dans ce type de produits est fortement compromise (traitement thermique) ;
- des céréales pour le petit-déjeuner ;
- des produits charcutiers, de la mer, ou à base d'oeufs ;
- ...

2.4. Choix d'un probiotique pour la chimioprévention du cancer du côlon chez l'Homme

La méta-analyse en sous-groupes en fonction du genre bactérien n'a pas permis de mettre en évidence un genre bactérien plus protecteur qu'un autre.

Pour choisir un probiotique destiné à réduire le risque de cancer du côlon chez l'Homme, il faudra donc identifier un genre, une espèce et une souche qui procurent un niveau de protection satisfaisant. Ce critère protecteur n'est toutefois pas le seul à intervenir dans le choix d'une souche probiotique destinée à être utilisée dans un aliment. D'autres critères biologiques et technologiques doivent être pris en compte.

2.4.1. *Critères biologiques*

Nous avons regroupé sous l'appellation « critères biologiques » toutes les propriétés qui permettent de définir un probiotique. D'après Goosens [36], « *Les probiotiques doivent être génétiquement stables, et ne doivent pas présenter de danger pour leur hôte. Ils doivent être capables de résister au passage dans les portions antérieures du tube digestif, et d'adhérer à la muqueuse colique afin de mieux s'y développer.* »

2.4.2. *Critères technologiques [46]*

► *Survie des probiotiques dans le produit fini*

Par définition, les probiotiques sont des micro-organismes vivants. Pour revendiquer l'allégation «probiotique », un aliment à effet probiotique doit donc garantir la survie des micro-organismes en quantité suffisante jusqu'à la consommation.

Il est bien évidemment indispensable de s'assurer que le probiotique peut survivre au processus de fabrication du produit auquel il est intégré. Si cela est impossible (par exemple la

température de cuisson des biscuits paraît un facteur très péjoratif pour la survie de probiotiques), il est aberrant de tenter d'y ajouter un probiotique.

Pour que les bactéries aient les meilleures chances de survie dans le produit fini, il est possible de choisir les souches les plus adaptées aux conditions physico-chimiques de ce produit. Il est également possible d'essayer d'adapter les caractéristiques de l'aliment pour qu'elles conviennent le mieux possible au probiotique (emballage, prébiotiques,...).

► *Modification des caractéristiques des aliments*

Pour séduire le consommateur, les produits contenant des probiotiques doivent avoir des qualités organoleptiques similaires à celles des produits classiques. Les produits laitiers contenant des probiotiques (lait fermenté, glaces et fromages) sont généralement bien acceptés.

2.4.3. *Une seule espèce ou plusieurs ?*

Les mécanismes envisagés pour expliquer l'effet des probiotiques sont multiples, et diffèrent certainement selon les bactéries utilisées. Il pourrait être tentant d'associer plusieurs souches probiotiques afin d'augmenter l'effet probiotique. Or, il n'est pas impossible qu'un antagonisme existe entre les diverses souches bactériennes probiotiques. Ceci explique peut être la faible activité protectrice du probiotique utilisé dans l'étude SYNCAN (association de Bifidobactéries et Lactobacilles [68]).

2.4.4. *Quelles espèces choisir ?*

Nous n'avons pas démontré qu'un genre bactérien était plus protecteur qu'un autre. Cependant, les probiotiques les plus étudiés pour leurs propriétés anti-cancérogènes sont essentiellement des souches issues des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Ce sont donc les principales qui ont été incluses dans la méta-analyse.

Parmi les études que nous n'avons pas utilisées pour la méta-analyse, Arimochi [66] a étudié *Clostridium perfringens*. Il a établi que cette bactérie était plus protectrice pour le critère ACF que les bactéries *Bifidobacterium adolescentis* et *Lactobacillus acidophilus* qu'il a également étudié dans la même expérience. Cette constatation quelque peu surprenante serait liée à la production importante de butyrate par *Clostridium perfringens*.

D'autres micro-organismes tels que les levures pourraient également s'avérer intéressants. A titre d'exemple, des résultats encourageants ont été obtenus avec de la levure de boulanger en chimioprévention *in vitro* sur des cellules de tumeurs mammaires [101].

En plus de la diversité de micro-organismes naturellement présents dans la nature, certains chercheurs ont envisagé la possibilité d'utiliser des micro-organismes génétiquement modifiés [102]. Cela permet de faire exprimer aux bactéries des facteurs anti-inflammatoires, ou des cytokines influant sur la croissance cellulaire et l'apoptose (transforming growth factor β). L'opinion générale est généralement assez opposée aux modifications génétiques, et l'utilisation de ces probiotiques génétiquement modifiés risque de se heurter à la désapprobation des consommateurs.



Conclusion générale

Nous avons démontré que les probiotiques exercent globalement un effet protecteur contre la cancérogenèse colorectale chimio-induite chez les rongeurs de laboratoire.

Cet effet est statistiquement significatif, et de taille moyenne. Pour l'incidence des tumeurs, le risque relatif est égal à 0,79 avec un intervalle de confiance à 95% égal à [0,70 ; 0,91]. Pour le critère de jugement ACF, nous avons observé un effet standardisé égal à -0,56 avec un intervalle de confiance à 95% égal à [-0,89 ; -0,22].

Nous nous sommes intéressé aux facteurs de variation de l'effet protecteur des probiotiques. Cet effet varie en particulier en fonction de la voie d'administration du carcinogène utilisé, et en fonction de la lignée des rats.

Nous pensons que le modèle animal utilisé n'est pas idéal pour évaluer l'efficacité des probiotiques pour la prévention du cancer colorectal. L'extrapolation des résultats obtenus à l'espèce humaine ne nous paraît pas complètement aberrante, mais elle sera certainement entachée d'imprécision.

Cependant, les bactéries lactiques sont utilisées depuis des centaines d'années pour la transformation et la conservation des aliments. Leur innocuité est communément admise. L'utilisation de souches bien connues dans des essais cliniques chez l'Homme est donc envisageable. L'utilisation de souches qui ne sont pas communément utilisées dans l'alimentation humaine devra se faire en accord avec la réglementation en vigueur sur la sécurité sanitaire des aliments.

Conclusion personnelle

Cette thèse peut sembler éloignée de l'univers du vétérinaire praticien. Cependant, les notions de statistique, de cancérologie, ou de bactériologie auxquelles il est fait allusion sont couramment utilisées en médecine canine ou rurale. De plus en plus de méta-analyses sont menées sur des sujets exclusivement vétérinaires.

Au-delà de l'approfondissement de ces quelques notions, le travail que j'ai effectué m'a permis de prendre conscience de plusieurs problèmes dans des domaines variés.

Tout d'abord, la richesse de la flore digestive et la complexité des relations entre cette flore et l'organisme « supérieur » qui l'héberge sont véritablement fascinants. Nous avons coutume de dire en médecine vétérinaire qu'il faut nourrir les microbes de la panse avant de nourrir la vache. Je ne pensais pas que le microbiote revêtait une importance similaire chez les animaux monogastriques, et encore moins chez l'Homme.

Cela nous amène à un deuxième problème : le choix d'un modèle en expérimentation. Il est éthiquement inconcevable de mener des expérimentations chez l'Homme lorsque l'on ignore les effets secondaires des produits testés. L'utilisation d'animaux est parfois discutable, mais dans un domaine comme la cancérologie cela me paraît justifié d'y avoir recours. Encore faut-il trouver un modèle qui permette l'extrapolation des résultats à l'espèce humaine. En plus des différences physiologiques entre un rat et un humain, le régime alimentaire, et par conséquent la flore digestive, de ces deux espèces diffèrent beaucoup. Il me semble par conséquent réellement difficile d'extrapoler les résultats obtenus chez des rats normoxéniques alimentés essentiellement avec des céréales à l'espèce humaine, qui plus est lorsque les cancers sont obtenus par l'injection de substances auxquelles les humains sont peu exposés. Je pense qu'il pourrait être profitable d'abandonner ce modèle en faveur de celui décrit par Newmark.

Bien que les résultats présentés dans cette thèse aient été obtenus chez des rats conventionnels, je crois que les propriétés chimioprotectrices des probiotiques méritent d'être évaluées chez l'Homme.

D'une part, les résultats obtenus chez le rat sont intéressants.

D'autre part, les bactéries lactiques, qui constituent l'essentiel des micro-organismes utilisés dans les expériences, sont communément reconnues inoffensives.

Enfin, les bactéries lactiques sont présentes naturellement dans de nombreux aliments. Certes, l'industrie agro-alimentaire essaiera certainement d'utiliser les propriétés anti-cancéreuses des probiotiques pour vendre un yaourt contenant une souche donnée de bactérie quatre fois plus cher qu'un yaourt ne contenant « que » *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Toutefois, compte tenu de la diversité des propriétés attribuées aux probiotiques, je trouve qu'il serait dommage d'essayer de trouver LA souche la plus protectrice vis à vis du cancer colorectal au risque de laisser de côté d'autres micro-organismes intéressants. Je pense que le kéfir, et en particulier le kéfir de lait qui associe les propriétés des probiotiques à celles du calcium contenu dans le lait, pourrait se révéler particulièrement intéressant pour la prévention du cancer du côlon, et pour la santé en général. Je me suis donc procuré des souches de kéfir de lait et de kéfir d'eau, et je consomme à présent régulièrement ces produits. C'est plutôt bon, amusant à cultiver, et même si je ne suis pas certaine des effets positifs sur ma santé, je n'en ai pas encore remarqué de négatifs...

Bibliographie

1. Bouchet, A. and Cuilleret, J. (2001) Le côlon. In *Anatomie topographique, descriptive et fonctionnelle*. Simep, Paris, vol. 4 L'abdomen, la région péritro-péritonéale, le petit bassin, le périnée, pp. 2025-2030.
2. Kamina, P. (2007) Gros intestin. In *Anatomie clinique*. Maloine, Paris, vol. 3, pp. 261-288.
3. Krstic, R.V. (1991) *Human microscopic anatomy. An atlas for students of medicine and biology*. Springer-Verlag, Berlin.
4. Goldin, B.R. (1986) In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Annu Rev Microbiol*, **40**, 367-393.
5. Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. and Relman, D.A. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635-1638.
6. O'Hara, A.M. and Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, **7**, 688-693.
7. De Roissart, H. and Luquet, F.M. (1994) *Bactéries lactiques*. Lorica, Uriage.
8. Ridlon, J.M., Kang, D.-J. and Hylemon, P.B. (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.*, **47**, 241-259.
9. Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isaulori, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M.B. and Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*, **80**, S147-S171.
10. Schiffrin, E.J. and Blum, S. (2002) Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr*, **56**, S60-S64.
11. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007) Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC : AICR.
12. Faivre, J. (2001) *Epidémiologie et prévention du cancer colorectal*. Springer-Verlag France.
13. Cunningham, J.G. and Klein, B.G. (2007) Cancer : a disease of cellular proliferation, life span and death. In *Textbook of veterinary physiology*. Saunders, Saint Louis, Missouri, pp. 34-57.
14. Raymond-Letron, I. (2005) Cancérologie générale. *Cours d'anatomie pathologie spéciale*, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
15. Riboli, E., Decloître, F. and Collet-Ribbing, C. (1996) *Alimentation et cancer. Evaluation des données scientifiques*. Lavoisier Tec & Doc.
16. Rougier, P., Mitry, E., Dominguez, S. and Taieb, J. (2006) *Les cancers digestifs*. Springer-Verlag France.
17. Corpet, D.E. Chemoprevention database. Site internet hébergé par l'INRA. Adresse URL : <http://www.inra.fr/reseau-nacre/sci-memb/corpet>. Accès le 12 décembre 2007.
18. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
19. Fearon, E.R. and Jones, P.A. (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J*, **6**, 2783-2790.
20. Remontet, L., Buemi, A. and Velten, M. (2003) Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000., vol. 2007.

21. Huycke, M.M. and Gaskins, H.R. (2004) Commensal bacteria, RedOx stress, and colorectal models : mechanisms and models. *Exp Biol Med*, **229**.
22. Reddy, B.S., Narisawa, T., Wright, P., Vukushi, D., Weisburger, J.H. and Wynder, E.L. (1975) Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res*, **35**, 287-290.
23. Pai, R., Tarnawski, A.S. and Tan, T. (2004) Deoxycholic acid activates b-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 2156-2163.
24. Qiao, D., Gaitonde, S.V., Qi, W. and Martiez, J.D. (2001) Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis*, **22**, 957-964.
25. Dorval, E. (2006) *Le dépistage du cancer colorectal. Etat des lieux et perspectives*. Springer-Verlag France.
26. Fenton, J.I. and Hord, N.G. (2006) Stage matters : choosing relevant model systems to address hypotheses in diet and cancer chemoprevention research. *Carcinogenesis*, **27**, 893-912.
27. Sugimura, T. and Terada, M. (1998) Experimental chemical carcinogenesis in the stomach and colon. *Jpn J Clin Oncol*, **28**, 163-167.
28. Corpet, D.E. and Pierre, F. (2003) Point : From animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 391-400.
29. Takahashi, M. and Wakabayashi, K. (2004) Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci*, **95**, 475-480.
30. Ishiguro, Y., Ochiai, M., Sugimura, T., Nagao, M. and Nakagama, H. (1999) Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine: no implication of Apc and Pla2g2a genetic polymorphisms in differential susceptibility. *Carcinogenesis*, **20**, 1063-1068.
31. Bird, R.P. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett*, **93**, 55-71.
32. Van Loo, J., Clune, Y., Bennett, M. and Collins, J.K. (2005) The SYNCAN project : goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. *Br J Nutr*, **93 Suppl 1**, S91-S98.
33. Roberfroid, M.B. (1998) Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br J Nutr*, **80**, S197-202.
34. Rafter, J. (2002) Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br J Nutr*, **88 Suppl 1**, S89-94.
35. Limdi, J.K., O'Neill, C. and McLaughlin, J. (2006) Do probiotics have a therapeutic role in gastroenterology? *World J Gastroenterol*, **12**, 5447-5457.
36. Goossens, D., Jonkers, D., Stobberingh, E., van den Bogaard, A., Russel, M. and Stockbrugger, R. (2003) Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 15-23.
37. Leveau, J.-Y. and Bouix, M. (1993) Les bactéries lactiques. In *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 170-375.
38. Leveau, J.-Y. and Bouix, M. (1993) Bifidobacterium. In *Microbiologie industrielle : Les micro-organismes d'intérêt industriel*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 376-389.
39. De Roissart, H. and Luquet, F.M. (1994) Transformation des produits animaux. In *Bactéries lactiques*. Lorica, Uriage, vol. 2, pp. 23-230.

40. Chermesh, I. and Eliakim, R. (2006) Probiotics and the gastrointestinal tract : Where are we in 2005 ? *World J Gastroenterol*, **12**, 853-857.
41. De Roissart, H. and Luquet, F.M. (1994) Rôle probiotique des bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques*. Lorica, Uriage, vol. 2, pp. 341-488.
42. Balansky, R., Gyosheva, B., Ganchev, G., Mircheva, Z., Minkova, Z. and Georgiev, G. (1999) Inhibitory effect of freeze-dried milk fermented by selected *Lactobacillus bulgaricus* strains on carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats and by diethylnitrosamine in hamsters. *Cancer Letters*, **147**, 125-137.
43. Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E. (1983) Antitumor activity of yoghurt components. *J. Food Protact.*, 8-11.
44. Kohwi, T., Imai, K., Tamura, A. and Hashimoto, Y. (1978) Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann*, **69**, 613-618.
45. Takagi, A., Matsuzaki, T., Sato, M., Nomoto, K., Morotomi, M. and Yokokura, T. (1999) Inhibitory effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on 3-methylcholanthrene-induced carcinogenesis in mice. *Med Microbiol Immunol*, **188**, 111-116.
46. Luquet, F.M. and Corrieu, G. (2005) *Bactéries lactiques et probiotiques*. Lavoisier Tec & Doc, Paris.
47. Perdigon, G., De Moreno de LeBlanc, A., Valdez, J. and Rachid, M. (2002) Role of yoghurt in the prevention of colon cancer. *Eur J Clin Nutr*, **56**, S65-S68.
48. Reddy, B.S. and Rivenson, A. (1993) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazol[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res*, **53**, 3914-3918.
49. Rowland, I.R., Rumney, C.J., Coutts, J.T. and Lievense, L.C. (1998) Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, **19**, 281-5.
50. Park, E., Jeon, G.I., Park, J.S. and Paik, H.D. (2007) A probiotic strain of *Bacillus polyfermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rats. *Biol Pharm Bull*, **30**, 569-574.
51. Rafter, J. (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **17**, 849-59.
52. Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. (1984) The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr*, **39**, 756-761.
53. Samelson, S.L., Nelson, R.L. and Nyhus, L.M. (1985) Protective role of faecal pH in experimental colon carcinogenesis. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **78**, 230-233.
54. Wollowski, I., Rechkemmer, G. and Pool-Zobel, B.L. (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*, **73**, 451S-455S.
55. Brady, L.J., Gallaher, D.D. and Busta, F.F. (2000) The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr*, **130**, 410S-414S.
56. Tavan, E., Cayuela, C., Antoine, J.M., Trugnan, G., Chaugier, C. and Cassand, P. (2002) Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **23**, 477-483.
57. Zsivkovits, M., Fekadu, K., Sontag, G., Nabinger, U., Huber, W.W., Kundt, M., Chakraborty, A., Foissy, H. and Knasmuller, S. (2003) Prevention of heterocyclic amine-induced DNA damage in colon and liver of rats by different *Lactobacillus* strains. *Carcinogenesis*, **24**, 1913-1918.
58. Knasmuller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A.M., Rabot, S., Nobis, E.C. and Kassie, F. (2001) Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the

- genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat Res*, **480-481**, 129-38.
59. Bolognani, F., Rumney, C.J. and Rowland, I.R. (1997) Influence of carcinogen-binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and *in vivo* mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and chemical toxicology*, **35**, 535-545.
60. De Moreno de LeBlanc, A. and Perdigon, G. (2004) Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit*, **10**, BR96-104.
61. Marotta, F., Naito, Y., Minelli, E., Tajiri, H., Bertuccelli, J., Wu, C.C., Min, C.H., Hotten, P. and Fesce, E. (2003) Chemopreventive effect of a probiotic preparation on the development of preneoplastic and neoplastic colonic lesions: an experimental study. *Hepatogastroenterology*, **50**, 1914-8.
62. Le Leu, R.K., Brown, I.L., Hu, Y., Bird, A.R., Jackson, M., Esterman, A. and Young, G.P. (2005) A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. *J Nutr*, **135**, 996-1001.
63. Challal, A., Rao, D.R., Chawan, C.B. and Shackelford, L. (1997) *Bifidobacterium longum* and *lactulose* suppress azoxymethane-induced colonic crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, **18**, 517-521.
64. Bax, L., Yu, L.-M., Ikeda, N. and Moons, K.G.M. (2007) A systematic comparison of software dedicated to meta-analysis of causal studies. *BMC Medical research methodology*, **7**.
65. Abdelali, H., Cassand, P., Soussotte, V., Daubeze, M., Bouley, C. and Narbonne, J.F. (1995) Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*, **24**, 121-32.
66. Arimochi, H., Kinouchi, T., Kataoka, K., Kuwahara, T. and Ohnishi, Y. (1997) Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 753-757.
67. Bolognani, F., Rumney, C.J., Pool-Zobel, B.L. and Rowland, I.R. (2001) Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats. *Eur J Nutr*, **40**, 293-300.
68. Femia, A.P., Luceri, C., Dolara, P., Giannini, A., Biggeri, A., Salvadori, M., Clune, Y., Collins, K.J., Paglierani, M. and Caderni, G. (2002) Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **23**, 1953-1960.
69. Fukui, M., Fujino, T., Tsutsui, K., Maruyama, T., Yoshimura, H., Shinohara, T., Fukui, M. and Nada, O. (2001) The tumor-preventing effect of a mixture of several lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Oncol Rep*, **8**, 1073-1078.
70. Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. (1980) Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *J Natl Cancer Inst*, **64**, 263-265.
71. Goldin, B.R., Gualtieri, L.J. and Moore, R.P. (1996) The effect of *Lactobacillus GG* on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer*, **25**, 197-204.
72. Li, W. and Li, C.B. (2003) Lack of inhibitory effects of lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *World J Gastroenterol*, **9**, 2469-2473.

73. McIntosh, G.H., Royle, P.J. and Playne, M.J. (1999) A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer*, **35**, 153-159.
74. Nakanishi, S., Kataoka, K., Kuwahara, T. and Ohnishi, Y. (2003) Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microflora and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiol Immunol*, **47**, 951-958.
75. Ohkawara, S., Furuya, H., Nagashima, K., Asanuma, N. and Hino, T. (2005) Oral administration of *Butyvibrio fibrosolvens*, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *J Nutr*, **135**, 2878-2883.
76. Park, J.-S., Kim, K.-T., Kim, H.-S., Paik, H.-D. and Park, E. (2006) Effect of a functional food containing *Bacillus polyfermenticus* on dimethylhydrazine-induced colon aberrant crypt formation and the antioxidant system in Fisher 344 male rats. *Food Sci. Biotechnol.*, **15**, 000.
77. Lee, N.K., Park, J.S., Park, E. and Paik, H.-D. (2007) Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine. *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 274-278.
78. Rao, C.V., Sanders, M.E., Indranie, C., Simi, B. and Reddy, B.S. (1999) Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM in F344 rats. *Int J Oncol*, **14**, 939-44.
79. Takano, T., Arai, K., Murota, I., Hayakawa, K., Mizutani, T. and Mitsuoka, T. (1985) Effects of feeding sour milk on longevity and tumorigenesis in mice and rats. *Bifido Microflora*, **4**, 31-37.
80. Yamazaki, K., Tsunoda, A., Sibusawa, M., Tsunoda, Y., Kusano, M., Fukuchi, K., Yamanaka, M., Kushima, M., Nomoto, K. and Morotomi, M. (2000) The effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain *shirota* on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. *Oncol Rep*, **7**, 977-982.
81. Gallaher, D.D., Stallings, W.H., Blessing, L.L., Busta, F.F. and Brady, L.J. (1996) Probiotics, cecal microflora and aberrant crypts in the rat colon. *J Nutr*, **126**, 1362-1371.
82. Gallaher, D.D. and Khil, J. (1999) The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J Nutr*, **129**, 1483S-1487S.
83. Horie, H., Kanazawa, K., Okada, M., Narushima, S., Itoh, K. and Terada, A. (1999) Effect of intestinal bacteria on colonic neoplasm : an experimental study. *Eur J Cancer Prev*, **8**, 237-245.
84. Koo, M. and Rao, A.V. (1991) Long-term effect of *Bifidobacteria* and Neosugar on precursor lesions of colonic cancer in CF₁ mice. *Nutr Cancer*, **16**, 249-257.
85. Ohno, K., Narushima, S., Takeuchi, S., Itoh, K., Mitsuoka, T., Nakayama, H., Itoh, T., Hioki, K. and Nomura, T. (2000) Inhibitory effect of apple pectin and culture condensate of *Bifidobacterium longum* on colorectal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in transgenic mice harboring human prototype c-Ha-ras genes. *Exp Anim*, **49**, 305-307.
86. O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee, G., O'Sullivan, G., Shanahan, F. and Collins, J.K. (2001) Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther*, **15**, 1219-1225.
87. Onoue, M., Kado, S., Sakitani, Y., Uchida, K. and Morotomi, M. (1997) Specific species of intestinal bacteria influence the induction of aberrant crypt foci by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett*, **113**, 179-186.

88. Shackelford, L.A., Rao, D.R., Chawan, C.B. and Pulusani, S.R. (1983) Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. *Nutr Cancer*, **5**, 159-164.
89. Caderni, G., Femia, A.P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M. and Dolara, P. (2003) Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res*, **63**, 2388-2392.
90. Alderson, P. and Green, S. (2002) Cochrane collaboration open learning material for reviewers.
91. Cucherat, M., Boissel, J.-P. and Leizorovicz, A. (1997) Manuel pratique de métanalyse des essais thérapeutiques.
92. Corpet, D.E. and Pierre, F. (2005) How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice, and men. *European Journal of Cancer*, **41**, 1911-1922.
93. Newmark, H.L., Yang, K., Lipkin, M., Kopelovich, L., Liu, Y., Fan, K. and Shinozaki, H. (2001) A western-style diet induces benign and malignant neoplasms in the colon of normal C57Bl/6 mice. *Carcinogenesis*, **22**, 1871-1875.
94. Zhao, L.P., Kushi, L.H., Klein, R.D. and Prentice, R.L. (1991) Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinoma. *Nutr Cancer*, **15**, 169-177.
95. Clauzure, C. (2007) Méta-analyses des effets chimioprotecteurs de la curcumine et du thé vert sur la Cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. *Thèse vétérinaire*. ENV, Toulouse.
96. Tournié, J. (2008) Méta-analyses des effets chimioprotecteurs des prébiotiques inuline et oligofructoses sur la Cancérogenèse colorectale chez les rongeurs. *Thèse vétérinaire*. ENV, Toulouse.
97. Albanes, D. and Heinonen, O.P. (1995) Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr*, **62**, 1427S-1430S.
98. Omenn, G.S. and Goodman, G.E. (1996) Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1550-1559.
99. Marteau, P. (2002) Bifidobacterium animalis, souche DN 174 010 shortens the colonic transit time in healthy women. A double blind randomised controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*, **16**.
100. Ishikawa, H., Akedo, I., Otani, T., Suzuki, T., Nakamura, T., Takeyama, T., Ishiguro, S., Miyaoka, E., Sobue, T. and Kakizoe, T. (2005) Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. *Int J Cancer*, **116**, 762-767.
101. Ghoneum, M.H. and Gollapudi, S. (2004) Induction of apoptosis in breast cancer cells by *Saccharomyces cerevisiae*, the baker's yeast, in vitro. *University of California Postprints*.
102. Geier, M.S., Butler, R.N. and Howarth, G.S. (2006) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. A role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biology and Therapy*, **5**, 1265-1269.

Annexes

Aliments fermentés par des bactéries lactiques

Principales bactéries lactiques

Notions statistiques et graphiques utilisés en méta-analyse

Caractéristiques des études incluses à la méta-analyse

Données brutes et effet moyen des études incluses dans la méta-analyse

Graphiques additionnels

Annexe 1

Aliments fermentés par des bactéries lactiques

Les laits fermentés

Les laits fermentés ont représenté pendant des millénaires, pour de nombreuses populations essentiellement situées au Moyen-Orient, une alimentation privilégiée car riche en protéines et très digeste. On retrouve des références sur les laits fermentés jusque dans la Bible. La transformation du lactose en acide lactique par les bactéries lactiques diminue fortement le pH et assure une « protection » contre le développement de nombreux germes pathogènes. C'était ainsi, pour les peuplades de bergers nomades, un moyen de conserver le lait plusieurs jours, dans des conditions de températures parfois élevées.

En France, le yaourt fait son apparition sous François I^r. Celui-ci se trouva guéri d'une infection intestinale après avoir consommé du yaourt apporté de Turquie par un médecin dépêché par le Grand Turc pour l'occasion. Au début de ce siècle, Metchnikoff émet ses théories sur l'influence positive des laits fermentés riches en lactobacilles, sur la longévité des Bulgares consommant ces produits.

Les laits fermentés peuvent se présenter sous différents aspects :

- liquides pour être consommés comme boisson
- brassés ou fermes pour une consommation à la cuillère

Il en existe une très grande variété dans le monde. Ils sont principalement obtenus à partir de lait de vache, mais aussi de lait de chèvre, de brebis, de jument, de bufflesse, d'ânesse, de chamelle.

On peut classer les laits fermentés en fonction des microorganismes utilisés :

- bactéries thermophiles,
- bactéries mésophiles,
- bactéries associées à d'autres microorganismes.

Bactéries thermophiles

► *Laits fermentés traditionnels, à flore essentiellement thermophile, dont la température de croissance optimale se situe entre 40 et 45°C :*

- le **Yaourt** obtenu par la croissance en symbiose de deux espèces de bactéries lactiques : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.
- le **Zabady**, en Egypte, qui contient *S.thermophilus*, *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L.casei*, *L.viridescens*, *L.helveticus*
- le **Calpis**, au Japon, est produit à partir de lactobacilles uniquement (*L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L.helveticus*, *L.helveticus* ssp. *jugurti*)
- le **Dahi** en Inde peut contenir, outre les bactéries du yaourt, *L.plantarum*.

► *Laits fermentés à flore d'origine entérique*

Ces produits sont obtenus à partir de bactéries isolées de l'intestin. Elles sont utilisées seules ou en mélange avec des bactéries lactiques thermophiles. *Lactobacillus acidophilus* est un hôte normal de l'intestin grêle, alors que *Bifidobacterium* est plutôt présent dans la flore colique.

Les principales bactéries utilisées sont :

- *L.acidophilus* (**Arla** en Suède)
- *L.casei* (**Yakult** au Japon)
- *B.bifidum*, *B.longum*, *B.animalis*, *B.breve*. Rarement utilisées seules, elles sont souvent associées à d'autres bactéries lactiques.

Les espèces du genre *Bifidobacterium* se cultivent plus difficilement dans le lait de vache. Leur développement est facilité par l'apport de facteurs bifidogènes. Par ailleurs elles sont très sensibles à l'oxygène et le nombre de bactéries vivantes décroît significativement pendant la conservation, si aucune précaution particulière n'est prise.

Nom commercial	Pays	Microflore
Kultura	Danemark	<i>B.bifidum</i> + <i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
Morinaga	Japon	<i>B.longum</i> + <i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> + <i>S.thermophilus</i>
Activia	France	<i>B.animalis</i> + <i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> + <i>S.thermophilus</i>
Ofilus	France	<i>B.bifidum</i> + <i>L.acidophilus</i> + <i>S.thermophilus</i>
Miru-Miru	Japon	<i>B.breve</i> + <i>L.acidophilus</i> + <i>L.casei</i>
Mil-Mil	Japon	<i>B.bifidum</i> + <i>B.breve</i> + <i>L.acidophilus</i>
Bifighurt	Allemagne	<i>B.bifidum</i> + <i>S.thermophilus</i>

Tableau 6 : Microflore de quelques laits fermentés commerciaux

Bactéries mésophiles

Les principales espèces utilisées dans les laits fermentés à bactéries lactiques mésophiles sont : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc.lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Ln.lactis*. On emploie également en Russie *Lc.lactis* ssp. *acetoinicus* pour sa production d'arôme très caractéristique.

On rencontre ces laits fermentés principalement :

- dans les pays Scandinaves où ils présentent souvent une texture filante : **Langfilid**, **Lattfil**
- dans les pays de l'Est : **Laktorol**
- au Moyen-Orient : **Laban** égyptien
- aux Etats-Unis : **Buttermilk** (lait fermenté dérivé du lait battu qui est un sous-produit de la fabrication du beurre acide)

Certains laits fermentés sont concentrés par ultrafiltration ou par égouttage ; c'est le cas de l'**Ymer** au Danemark et du **Skyr** en Islande.

Associations Bactéries-Levures-Moisissures

Les laits fermentés peuvent contenir outre les bactéries lactiques, d'autres microorganismes.

► *Le Kéfir*

Les kéfirs sont des associations de bactéries lactiques et de levures, qui produisent une fermentation principalement lactique et faiblement alcoolique du milieu dans lequel ils se développent. Les microorganismes impliqués et la matrice polysaccharidique dans laquelle ils se développent forment ce qu'on appelle le grain de kéfir.

Il existe deux types de kéfirs. Le kéfir lacté, le plus connu, est une boisson mousseuse et légèrement acidulée qui résulte de la fermentation du lait de jument, de chèvre ou de vache. Le kéfir sucré provient de la fermentation lactique et très légèrement alcoolique d'eau sucrée, traditionnellement additionné d'une rondelle de citron et d'une figue. Il donne une boisson très rafraîchissante, légèrement pétillante, peu sucrée et peu alcoolisée (moins de 1% d'alcool).

Le kéfir lacté est le plus étudié. Les principaux microorganismes isolés du grain de kéfir lacté sont :

- des coques mésophiles homofermentaires : *Lc.lactis* ssp. *lactis*, *Lc.lactis* ssp. *cremoris*
- des coques mésophiles hétérofermentaires : *Ln.mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Ln.mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Ln.mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Ln. lactis*
- des lactobacilles homofermentaires : *L.plantarum*, *L.acidophilus*, *L.delbrueckii*, *L.casei*, *L.paracasei*, *L.kefiranofoasciens*
- des lactobacilles hétérofermentaires : *L.brevis*, *L.kefir*, *L.buchneri*, *L.fermentum*
- des bactéries acétiques : *Acetobacter aceti*, *Acetobacter rancens*
- des levures des genres *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulaspora* dont la production de CO₂ est à l'origine du caractère « pétillant » du kéfir.

La composition varie selon les méthodes de production du kéfir, selon son origine géographique, et au cours de la fermentation. Le nombre de Lactobacilles dans la boisson varie entre 10⁷ et 10⁹ ufc/mL, celui des Lactocoques entre 10⁸ et 10⁹ ufc/mL, et celui des Levures de 10⁴ à 10⁷ ufc/mL.

Le kéfir est une véritable symbiose. Les microorganismes isolés du kéfir sont incapables de se développer ou perdent certaines activités métaboliques lorsqu'ils sont cultivés séparément dans le lait. Leur activité est restaurée s'ils sont de nouveau en mélange.

► *Le Koumiss*

Cette boisson était traditionnellement produite à partir de lait de jument en URSS. Elle fait aussi appel à une double fermentation lactique et alcoolique obtenue par une culture mixte de lactobacilles (*L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L.lorenburgii*, *L.acidophilus*) et de levures fermentant le lactose (*Torulaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*). Il ne doit pas être confondu avec le **Kumiss** de Colombie qui est un lait fermenté uniquement à partir de bactéries lactiques thermophiles et mésophiles.

► *Le Laban*

Ce lait fermenté libanais comprend cinq microorganismes : *S.thermophilus*, *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Kluyveromyces marxianus* spp. *marxianus*, *Ln.lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

► *Le Viili finlandais*

Lait acidifié par des lactocoques filants, comprenant également une moisissure (*Geotrichum candidum*) qui se développe en surface du produit fini.

► *Les laits fermentés tchèques*

L'un d'eux contient du *Propionibacterium shermanii* dont la présence accroît considérablement les teneurs en vitamine B12 et en acide folique ; l'autre, appelé **Biokys**, associe *B.bifidum*, *L.acidophilus* et *Pediococcus acidolactici*.

Conservation des légumes

Les fruits et les légumes font partie des denrées périssables, comme le lait, la viande ou le poisson. Comme pour ces produits, on sait favoriser la conservation des végétaux en réalisant de manière empirique des conditions favorables à l'initiation des voies fermentaires conduisant à la production d'acide lactique : salage, saumurage, mise en anaérobiose relative. Des produits comme la **choucroute** (Europe), les **pickles** (USA), le **kimchi** (Corée), le **miso** (Japon) ou le **gari** (Afrique), pour ne citer que les principaux, sont obtenus par fermentation lactique. Les premières études scientifiques visant à maîtriser la production de ces produits, afin de passer du stade artisanal au stade industriel, ont montré la complexité du déroulement de la fermentation mettant en œuvre de nombreux microorganismes de genres et d'espèces différents associés en cultures mixtes et séquentielles.

Flore microbienne endogène

Les végétaux hébergent à leur surface une flore microbienne endogène. La flore commensale du végétal, qui subsiste après le lavage, est composée de bactéries Gram négatif, Gram positif, et de quelques moisissures et levures. Les bactéries lactiques qui vont provoquer la fermentation sont en minorité (moins de 1% de la flore totale).

Evolution de la flore au cours de la fermentation

Pour diminuer la flore commensale, on lave le végétal à l'eau froide chloré (50 mg/L) ou on lui fait subir un blanchiment plus ou moins prononcé.

Afin d'amorcer le processus de fermentation, il faut optimiser les conditions de croissance des bactéries lactiques en répondant à leurs besoins nutritifs.

L'addition du sel à des végétaux fait apparaître une phase liquide par plasmolyse. Cette plasmolyse est accélérée si le végétal est découpé en morceaux suffisamment petits. La phase liquide obtenue joue deux rôles : elle permet d'immerger le végétal afin d'éliminer l'air qui favoriserait le développement des microorganismes aérobies, et constitue un milieu de culture dans lequel sont dissous les éléments libérés par la cellule végétale, indispensables à la croissance bactérienne. L'addition de sel a aussi l'avantage de prévenir la dégradation des pectines et le ramollissement du produit. Le mode d'addition du sel est important, il doit se faire de manière régulière sous peine de conduire à des concentrations locales importantes favorisant le développement de levures.

Dans ces fermentations végétales on retrouve systématiquement tous les genres de bactéries lactiques. Leur développement est différent suivant la matière première fermentée. La complexité de l'étude des cinétiques de croissance réside dans les interactions de type coopératif, commensalisme ou neutralisme spécifiques à chaque produit. Les flores se succèdent dans le temps ; les bactéries à croissance rapide sont les premières à se développer, mais dans le cas du salage à sec les lactocoques sont rapidement inhibés par la forte concentration en sel de la phase liquide. Les entérocoques sont à leur tour inhibé par l'acidification dès que le pH est trop acide (inférieur à 5). La concentration en sel diminuant

réguilièrement du fait de la dilution au cours de la plasmolyse, la flore dominante est formée successivement de pédiocoques, de leuconostocs et enfin de lactobacilles. C'est l'évolution du pH qui modifie la nature de la flore dominante. Les qualités organoleptiques varient beaucoup en fonction de la flore dominante finale. Il est possible d'intervenir à ce niveau en ensemencant avec une flore homofermentative (goût plus piquant) ou une flore hétérofermentative (dominante aromatique). En fin de fermentation on atteint des concentrations en bactéries lactiques pouvant atteindre 10^9 cellules/mL.

Espèces	Type fermentaire	pH final	Résistance au sel	Température de croissance	Cinétique de croissance
<i>Ec.faecalis</i>	Homofermentaire	5,0	6,5%	10-45°C	Rapide
<i>Lc.lactis</i>	Homofermentaire	4,5	4,0%	10-40°C	Rapide
<i>Ln.mesenteroides</i>	Hétérofermentaire	4,0	< 6,5%	10-35°C	Rapide
<i>Pc.damnosus</i>	Homofermentaire	4,0	3,0%	15-30°C	Lente
<i>Pc.acidilactici</i>	Homofermentaire	3,4	6,5%	15-50°C	Rapide
<i>Lb.brevis</i>	Hétérofermentaires	3,6	3,5%	15-40°C	Lente
<i>Lb.plantarum</i>	Hétérofermentaires	3,6	4,0%	10-40°C	Rapide

Tableau 7 : Principales caractéristiques des bactéries lactiques intervenant dans la fermentation des végétaux

Les produits carnés

Le saumurage et le séchage permettent depuis des millénaires de conserver la viande, notamment la viande de porc. Les technologies sont très variables selon les régions : la viande peut être broyée ou non, les agents de saumurage, sucres, épices, espèces microbiennes, la vitesse et la température de la maturation participent à la diversité des produits.

Quels que soient les produits, il se déroule une fermentation naturelle due au développement d'une flore microbienne qui est fonction de la contamination initiale et des conditions de préparation.

Les saucisses fermentées

Le degré de séchage et le pH sont des paramètres importants dans la définition des saucisses fermentées :

- Les saucisses fermentées semi-séchées se caractérisent par une fermentation souvent rapide, à des températures relativement élevées (21 à 46°C). Ainsi, le pH final est souvent inférieur à 5,3. La période de séchage est rapide ou inexistante, d'où une humidité importante dans le produit fini (40 à 60% d'eau). Ces produits ont un goût acide particulier. Ils sont fabriqués dans les pays d'Europe du Nord et les Etats-Unis (Thuringer, « summer sausage », cervelas,...)
- Les saucisses fermentées séchées subissent une fermentation lente de plusieurs jours à des températures relativement basses de 11 à 23°C (phase d'étuvage) avant d'être séchées pendant plusieurs semaines en chambre froide. L'activité hydrique (a_w), initialement de 0,96 peut descendre jusqu'à 0,86 en fin de séche. La période de séchage confère au produit ses caractéristiques. Ces saucisses sont essentiellement fabriquées dans le bassin méditerranéen, en Allemagne et en France (saucisson sec).

Produits saumurés secs

La fabrication du jambon sec passe par un saumurage et une longue période de séchage, nécessaire à l'obtention de la saveur, mais durant laquelle des altérations de couleur et de goût peuvent apparaître. Le saumurage des produits carnés s'effectue soit par immersion, soit par injection d'une saumure caractérisée par des quantités importantes de NaCl (entre 12 et 22%). Dans ces conditions, seuls des microorganismes halotolérants peuvent se multiplier ; ce sont surtout des microcoques, des lactobacilles, et certains Gram négatifs, en particulier des *Vibrio*.

Microorganismes	Produits carnés	Incidences sur le produit
Bactéries lactiques		
<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Saucisses semi-séchées : summer sausage, cervelas, Thuringer	Inhibition des flores d'altération
<i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	Saucisses séchées Jambon sec Viandes fraîches	Cohésion Couleur, flaveur
Bactéries catalase + Gram +		
<i>Micrococcus varians</i> <i>Micrococcus auriancatus</i>		Suppression du rancissement et du verdissement
<i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus warneri</i>	Saucisses séchées Jambon sec	Couleur, flaveur
Levures et moisissures		
<i>Penicillium</i> <i>Debariomyces</i> <i>Thamnidium elegans</i> <i>Candida lipolytica</i>	Saucisses, jambons	

Tableau 8 : Principales espèces microbiennes utilisées dans la fabrication et la transformation des produits carnés

Les produits halieutiques

Les produits de la pêche (ou produits halieutiques) fermentés sont nombreux et universels et existent depuis des millénaires. La plupart sont confectionnés en utilisant des recettes traditionnelles empiriques. Souvent, la fermentation lactique n'intervient pas seule, elle est associée à d'autres fermentations, à des hydrolyses enzymatiques, ou encore à des réactions purement chimiques.

La fermentation des produits halieutiques traditionnels constitue d'ores et déjà dans de nombreux pays asiatiques une voie de transformation et de valorisation majeure des produits de la pêche. Ils se rapprochent de nos produits de salaison et de nos fromages, tant dans leur concept que dans leur technologie et leur mode de consommation.

La compréhension, puis la maîtrise des phénomènes biochimiques complexes qu'ils mettent en œuvre, peuvent sans doute déboucher sur des applications industrielles intéressantes, y compris dans les pays développés.

Produits européens et méditerranéens

En Europe, la tradition du poisson fermenté remonte à l'Antiquité. Pline l'Ancien et Eschyle évoquent dans leurs écrits le **garum**, produit d'autolyse de sang et de viscères de poisson. La technique fut exportée jusqu'à Douarnenez, mais la tradition s'est perdue.

De nos jours, on ne trouve plus de poisson fermenté en Europe, si ce n'est dans les pays scandinaves, qui en produisent plusieurs variétés.

► *Gaffelbitar ou titbits*

Le poisson, généralement du hareng d'Islande, est mis en tonneaux avec 15 à 17% de sel, 6 à 7% de sucre, et des épices pour une maturation pouvant durer jusqu'à un an et demi. Au terme de cette période, le pH du milieu se situe entre 5,6 et 6,0, la chair du poisson s'est attendrie et le produit a acquis une saveur caractéristique. Le poisson est alors découpé en filets et conditionné en boîtes métalliques ou en pots de verre.

Le processus de maturation est peu connu : les enzymes endogènes du poisson contribuent indéniablement à l'attendrissement des tissus, mais le rôle des microorganismes présents est discuté. Il est vraisemblable qu'ils participent à l'élaboration de l'arôme de ce produit.

La flore microbienne présente pendant la maturation en tonneau diffère de celle du poisson fraîchement pêché. Il s'agit d'une flore de contamination relativement variable d'un atelier à l'autre et d'une région à l'autre. Les bactéries lactiques représentent 20 à 30% de la flore totale. *Pediococcus halophilus* est la plus représentée ; viennent ensuite *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* et *Leuconostoc mesenteroides*. Aucune des bactéries représentées ne fermente le saccharose, ce qui dément l'hypothèse d'une fermentation orientée par l'addition de sucre lors de la fabrication. A aucun moment, la population bactérienne n'excède 10^5 bactéries par gramme, niveau faible qui explique peut-être la durée du processus de maturation.

► *Surströming et räkefisk*

Le **surströming** suédois est fabriqué à partir de harengs de la Baltique, tandis que le **räkefisk** norvégien utilise des truites.

Après 24 à 48 h de salage en saumure, le poisson est éviscétré, à nouveau saumuré, et laissé en tonneaux durant deux semaines. La fermentation s'accompagne de dégagement de CO₂, de SH₂, et de méthylmercaptan. Le produit a une odeur forte mais un goût plaisant.

► *Gravlax*

Ces produits sont également d'origine suédoise. Il s'agit de filets de saumon crus, salés, sucrés et aromatisés avec du fenouil. Une fermentation lactique de surface situe à pH du produit entre 5,0 et 5,5 et en assure la conservation au réfrigérateur pendant plusieurs semaines.

► *Produits fumés et séchés*

Une flore lactique parfois abondante a été isolée de produits fumés et séchés. Ainsi, elle constitue jusqu'à 77% de la flore de la lingue bleue après 77 jours de séchage alors qu'elle représentait initialement moins de 3%. Son rôle dans la maturation de ces produits reste à étudier.

Produits exotiques

Sauces de poisson

Pour la seule Asie du Sud Est, la production de sauce de poisson se chiffre en centaines de millions de litres. Le **nuoc-mam** vietnamien, le **nam-pla** thaïlandais, le **patis** philippin, le **treuk-treï** cambodgien et le **budu** malais sont consommés à raison d'environ 40 grammes par jour par près de 300 millions d'habitants...

La sauce de poisson est fabriquée à partir d'une grande variété d'espèces d'eau douce ou de mer, généralement de petite taille. Le poisson entier (non éviscéré) est mélangé en cuve avec 25% de sel. Après 48h, sous l'effet de la pression osmotique, l'eau du poisson est en grande partie extraite et un moût repose au fond des cuves. Une partie de la saumure surnageante est soutirée tandis que le reste de la cuve est laissé à fermenter. Sous l'effet de la trypsine endogène, les protéines se solubilisent ; la quantité d'azote soluble atteint alors son maximum après trois à six mois de fermentation selon la taille des poissons. La saumure est alors totalement soutirée et filtrée. Elle titre alors 20 à 25 grammes d'azote par litre et doit être vieillie en cuves ou en jarres pendant plusieurs mois voire un à deux ans. Elle constitue alors la sauce de première qualité. Le moût restant est généralement recyclé dans une nouvelle fermentation après addition d'eau salée ou restitution de la fraction de saumure soutirée au début de la fabrication. Les industriels vont généralement jusqu'à quatre ou cinq recyclages ; la sauce commercialisée est alors un mélange de sauces de différentes générations.

Les études menées sur les différentes sauces de poisson sont contradictoires. Selon certains, le processus de fabrication est uniquement enzymatique ; d'autres ont isolé *Pediococcus*

halophilus ou un *Clostridium*. Des tentatives ont été réalisées pour accélérer le procédé de fabrication en faisant l'économie de la fermentation bactérienne : elles ont toutes conduit à un échec, les produits n'étant pas acceptés par les consommateurs.

Pâtes et produits divers

Produites généralement à partir de crevettes ou de poisson, les pâtes sont tout aussi répandues et populaires que les sauces. Elles sont cependant obtenues par des technologies plus diverses.

Lorsqu'il s'agit de poisson, le processus de fabrication commence invariablement par l'élimination des têtes et des viscères, suivie d'un lavage à grande eau. L'état pâteux du produit final correspond à un extrait sec élevé, la fabrication des pâtes comprenant généralement une étape de déshydratation partielle. Soit la matière première subit un séchage limité au soleil, soit, après salage, l'eau extraite par pression osmotique est éliminée. Selon les produits, la proportion de sel se situe entre 3 et 30%, la durée de fermentation varie de huit jours à trois ou quatre mois.

► *Pâtes du type bélacan*

Le **bélacan** est produit en Malaisie à partir de crevettes. La flore halophile se développe de façon importante au cours du premier mois de fermentation, puis le nombre de bactéries se réduit progressivement. Pédioocoques et lactobacilles figurent parmi les microorganismes dominants.

Le **bagoong na amalang** des Philippines, le **ngapi** en Birmanie, le **trassi** indonésien et le **kapi** ou **kapic** en Thaïlande ou au Cambodge sont des produits similaires au bélacan.

Le **prahok** cambodgien et le **bagoong na isda** philippin sont des pâtes de poisson obtenues par la même technologie.

► *Pâtes faisant intervenir l'addition d'un substrat carboné*

Certaines technologies nécessitent l'addition d'un substrat carboné à la matière première.

Riz cuit et soja fermenté par *Aspergillus orizae* sont mélangés au poisson pour la préparation des **funasushi** japonais. Après 41 jours de fermentation, la flore bactérienne est essentiellement composée de *Lactobacillus plantarum* (10^7 cellules par gramme).

Le **paak** ou **mam chao** au Cambodge, le **burong dalag** et le **burong hipon** aux Philippines sont produits d'une façon similaire : le poisson ou les crevettes salées sont mélangés à du riz glutineux cuit et déjà fermenté. Après une semaine de fermentation, le pH du milieu est proche de 4, et la flore lactique est passée à 6.10^9 cellules par grammes. Le produit mature conservé à température ambiante se conserve trois mois.

► *Autres produits*

Au Japon, les **i-sushis**, variantes des canapés de poisson cru sur du riz ou des légumes, font intervenir une fermentation lactique superficielle qui prolonge la durée de fermentation du produit sans en modifier notablement la saveur.

Produits modernes

En Europe et en Amérique du Nord, des essais prometteurs sont réalisés pour produire des semi-conserves de poisson d'humidité intermédiaire. La chair de poisson chauffée et hachée, est ensemencée avec des bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*,...), fermentée, puis extrudée. Les produits se conserveraient quelques mois à température ambiante.

Désacidification des vins par les bactéries lactiques

La désacidification biologique des vins repose sur la dégradation de l'acide L-malique, soit par des levures (*Saccharomyces pombe*), il s'agit alors de la fermentation « malo-alcoolique », soit par les bactéries lactiques, c'est la fermentation malolactique. Ce deuxième procédé est de loin le plus recherché et est assuré par la flore bactérienne naturellement présente dans les vins.

Intérêts de la fermentation malolactique

En règle générale, la fermentation malolactique est spontanée ; elle intervient normalement après la fermentation alcoolique, lorsque les levures terminent leur cycle cellulaire et disparaissent. Les bactéries lactiques se multiplient alors et, en fin de phase de croissance, la population atteint un taux suffisant pour déclencher le processus de désacidification.

Les bactéries lactiques transforment l'acide L-malique en acide L-lactique. Cette réaction se traduit aussi par la perte d'une fonction acide de CO_2 qui se dissout, puis est éliminée au contact de l'air. L'assouplissement du vin, qui en résulte, constitue le principal intérêt de cette étape de la vinification. De nombreuses observations montrent également que le bouquet du vin acquiert une complexité très appréciée, grâce à des transformations qui sont, pour la plupart, non identifiées.

D'un autre côté, ce processus contribue à la stabilisation biologique du vin. En conséquence, la fermentation malolactique est considérée comme indispensable à l'élaboration de la plupart des vins rouges de qualité et de certains vins blancs.

Bactéries lactiques du vin

Différentes espèces bactériennes sont présentes sur le raisin, dans le moût en fermentation, puis dans le vin.

Les bactéries lactiques les plus fréquentes en œnologie sont des lactobacilles : *Lb.plantarum* et *Lb.casei* pour les homofermentaires, *Lb.hilgardii* et *Lb.brevis* pour les hétérofermentaires. On rencontre également des coques : *Pc.damnosus* et *Pc.pentosaceus* pour les homofermentaires, *Ln.mesenteroides* et *Ln.oenos* pour les hétérofermentaires.

Au cours de la vinification, les différentes espèces se succèdent. Sur le raisin et dans le moût en début de fermentation, la flore bactérienne lactique est constituée de lactobacilles, de leuconostocs et de pédioques. Leur nombre et leurs proportions sont variables selon les conditions de la maturation qui déterminent en partie le pH et justifient le sulfitage de la vendange. Au fur et à mesure du changement de la constitution du milieu, par la fermentation alcoolique, la flore bactérienne est réduite à la fois en nombre et en variétés d'espèces. Une sélection s'opère en faveur des souches résistant le mieux à l'alcool et au pH.

La plupart du temps, seul *Ln.oenos* intervient dans les vins les plus alcoolisés et les plus acides.

Les laits végétaux

Le lait de soja et ses dérivés sont riches en protéines, en lipides, en sucres et en vitamines. Ils constituent des aliments de base pour les populations asiatiques.

Le lait de soja peut être fermenté par les mêmes bactéries lactiques que le lait de vache (*S.thermophilus*, *Lc.lactis*, *Lb.acidophilus acidophilus*, *Lb.delbrueckii*...). Cependant, la composition en glucides du lait de soja est différente de celle du lait de vache ; l'activité métabolique des microorganismes est donc différente dans le lait végétal.

La fermentation du lait de soja permet de masquer son goût particulier, ce qui le rend plus acceptable pour les populations occidentales.

Les préparations à base de soja pourraient supplanter le lait et la viande dans certains secteurs alimentaires (hôpitaux, restauration rapide, collectivités...) grâce à leurs qualités nutritionnelles et leur prix de revient relativement bas.

Annexe 2

Principales bactéries lactiques

Le genre *Bifidobacterium*

Ces bactéries étaient anciennement classées dans le genre *Lactobacillus* sous le nom *Lactobacillus bifidus*.

Les *Bifidobacterium* sont des bacilles à Gram positif, immobiles et non sporulés. Leur nom vient des formes à deux branches en V ou en Y qu'ils peuvent présenter sous certaines conditions de culture. La morphologie des *Bifidobacterium* est en effet très variable : coccoïde, incurvée, allongée avec des protubérances, des bifurcations, des extrémités spatulées. Les bactéries sont souvent rangées en chaînes étoilées, en V ou en palissade. Cette pléomorphie est observée lorsqu'une même souche est cultivée sur différents milieux, mais également au sein d'une même population.

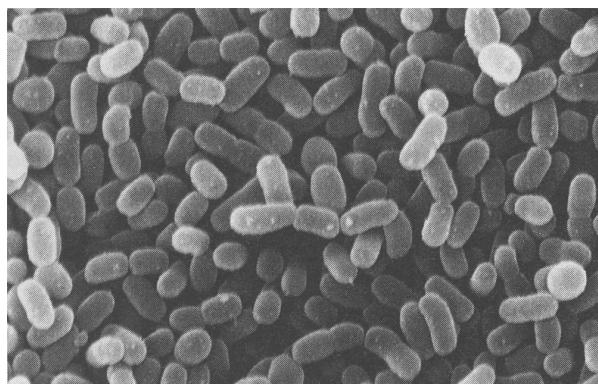


Photo 2 : *Bifidobacterium animalis* (x 6000)

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Bifidobacterium est une bactérie hétérofermentaire. Elle produit plus d'acide acétique que d'acide lactique (rapport 3:2), de faibles quantités d'acide formique, d'éthanol et d'acide succinique, et ne produit pas de CO₂ comme les autres bactéries hétérолactiques.

Ce sont des bactéries anaérobies strictes : certaines espèces tolèrent l'oxygène mais seulement en présence de dioxyde de carbone. La température optimale pour la plupart des bifidobactéries d'origine humaine est 36 à 38°C. Celles d'origine animale supportent des températures allant jusqu'à 43-45°C.

Découvertes dans les selles d'enfants nouveaux-nés, on peut les isoler de l'intestin, de la bouche ou du vagin des adultes. On les retrouve aussi dans le tractus intestinal de nombreuses espèces animales. Elles sont utilisées depuis peu dans la confection de laits fermentés, mais elles n'en ont pas été isolées naturellement.



	Origine	Fermentation								
		D-Rib	L-Ara	Lac	Cel	Mlz	Raf	Stl	Amy	Glcn
1. <i>B. bifidum</i>	Homme, veau	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2. <i>B. longum</i>	Homme	+	+	+	-	+	+	-	-	-
3. <i>B. infantis</i>	Homme	+	-	+	-	-	+	-	-	-
4. <i>B. breve</i>	Homme	+		+	V	V	+	V	-	-
5. <i>B. adolescentis</i>	Homme, animaux	+	+	+	+	+	+	V	+	+
6. <i>B. angulatum</i>	Homme	+	+	+	-	-	+	V	+	+
7. <i>B. catenulatum</i>	Homme	+	+	+	+	-	+	+	-	V
8. <i>B. pseudocatenulatum</i>	Homme	+	+	+	V	-	+	V	+	V
9. <i>B. dentium</i>	Homme	+	+	+	+	+	+	-	+	-
10. <i>B. globosum</i>	Animaux	+	V	+	-	-	+	-	+	-
11. <i>B. pseudolongum</i>	Animaux	+	+	V	V	V	+	-	+	-
12. <i>B. cuniculi</i>	Lapin	-	+	-	-	-	-	-	+	-
13. <i>B. choerinum</i>	Porc	-	-	+	-	-	+	-	+	-
14. <i>B. animalis</i>	Animaux	+	+	+	V	V	+	-	+	-
15. <i>B. thermophilum</i>	Animaux	-	-	V	V	V	+	-	+	-
16. <i>B. boum</i>	Animaux	-	-	V	-	-	+	-	+	-
17. <i>B. magnum</i>	Lapin	+	+	+	-	-	+	-	-	-
18. <i>B. pullorum</i>	Poulet	+	+	-	-	-	+	-	-	-
19. <i>B. suis</i>	Porc	-	+	+	-	-	+	-	-	-
20. <i>B. minimum</i>	Egout	-	-	-	-	-	-	-	+	-
21. <i>B. subtile</i>	Egout	+	-	-	-	+	+	+	+	+
22. <i>B. coryneforme</i>	Abeille	+	+	-	+	-	+	+	-	+
23. <i>B. asteroides</i>	Abeille	+	+	-	+	-	+	-	-	V
24. <i>B. indicum</i>	Abeille	+	-	-	+	-	+	-	-	+

Tableau 9 : Caractéristiques distinctives des espèces de *Bifidobacterium*

+ : plus de 90% des souches ; v : entre 10 et 90% des souches ; Ara : arabinose ; Amy : amidon ; Cel : cellobiose ; Glcn : gluconate ; Lac : lactose ; Mlz : mélézitose ; Raf : raffinose ; Rib : ribose ; Stl : sorbitol.

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Le genre *Lactobacillus*

Les espèces de *Lactobacillus* sont caractérisées par des cellules en forme de bâtonnets souvent groupées en chaînes, une forte exigence en facteurs de croissance (*Lb.delbrueckii* exige de 11 à 15 acides aminés selon les souches), une acidification du lait plus lente qu'avec les streptocoques mais généralement plus intense grâce à une meilleure résistance aux pH acides (jusqu'à pH 3,5) et à une concentration plus élevée d'acide lactique (au maximum 27 g/L).

Les subdivisions du genre *Lactobacillus*

Les espèces du genre *Lactobacillus* sont caractérisées par l'hétérogénéité de leur ADN : le GC% varie de 32 à 53% !

Le genre a donc été subdivisé en trois groupes. De par leur variété, les lactobacilles sont présents dans des milieux très différents: lait et produits laitiers (lait fermentés, fromages), les végétaux fermentés, le pain, le vin, la bière, les viandes fraîches et fermentées, le tube digestif de différents animaux (Tableau 10)...

► *Groupe I : Lactobacilles homofermentaires obligatoires*

Ces lactobacilles sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Leurs cellules sont longues, droites, souvent en palissades.

Ce groupe contient deux complexes d'espèces centrés l'un sur *Lb.delbrueckii* et l'autre sur *Lb.acidophilus*. Le premier complexe est assez homogène, tandis que le second est au contraire très hétérogène et formé de 3 sous-groupes caractérisés chacun par les espèces suivantes : *Lb.acidophilus*, *Lb.gasseri*, et *Lb.helveticus*.

Lb.acidophilus est caractérisé par la plus forte production d'acide lactique parmi les lactobacilles : 27 g/L.

► *Groupe 2 : Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs*

La fermentation des hexoses est homofermentaire (mais peut être hétérofermentaire dans certains cas), celle des pentoses et du gluconate est hétérofermentaire avec une production d'acide lactique et d'acide acétique. Leurs cellules sont courtes, souvent arrangées en filaments.

Ce groupe hétérogène est formé par trois complexes d'espèces centrés respectivement sur *Lb.plantarum*, *Lb.casei*, et le groupe *Lb.sake-Lb.curvatus-Lb.bavaricus*. Ces espèces produisent généralement peu d'acide lactique : 3 à 13 g/L. Plusieurs sous-espèces de *Lb.casei* ont récemment été reconnues comme espèces à part entière : *Lb.rhamnosus*, *Lb.paracasei*.

► *Groupe 3 : Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires*

La fermentation des hexoses produit de l'acide lactique, de l'acide acétique (ou de l'éthanol), et du CO₂ dans le rapport 1:1:1. La fermentation des pentoses produit de l'acide lactique et de l'acide acétique. Les cellules sont courtes, droites et séparées.

Les espèces de ce groupe sont peu homogènes, mais elles ont toutes en commun une faible production d'acides (5 g/L).

Group	Species	Habitat
I	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	Végétaux
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Yaourt, fromage
	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	Fromage
	<i>Lb. acidophilus</i>	Bouche, vagin
	<i>Lb. gasseri</i>	Bouche, vagin
	<i>Lb. helveticus</i>	Fromage
II	<i>Lb. casei</i> ssp. <i>casei</i>	Rumen
	<i>Lb. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i>	Fromage, fourrage
	<i>Lb. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>	Bouche, vagin
	<i>Lb. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	Tractus intestinal
	<i>Lb. sake</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Végétaux
	<i>Lb. bavaricus</i>	Végétaux
III	<i>Lb. plantarum</i>	Végétaux, fromage
	<i>Lb. bifementans</i>	Fromage
	<i>Lb. brevis</i>	Végétaux, fromage
	<i>Lb. buchneri</i>	Végétaux, fromage
	<i>Lb. kefir</i>	Kéfir
	<i>Lb. reuteri</i>	Tractus intestinal
	<i>Lb. fermentum</i>	Végétaux, fromage
	<i>Lb. confusus</i>	Végétaux
	<i>Lb. viridescens</i>	Produits carnés
	<i>Lb. sanfrancisco</i>	Pain, panettone

Tableau 10 : Habitat de quelques espèces de Lactobacilles

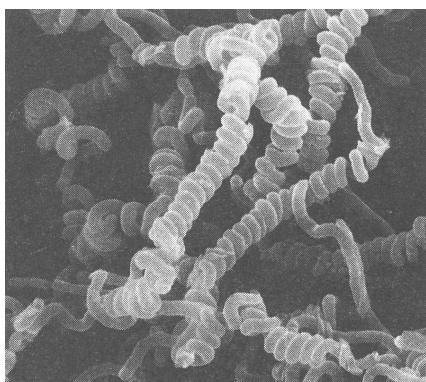


Photo 3 : *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (x 4000) Photo 4 : *Lactobacillus acidophilus* (x 6000)

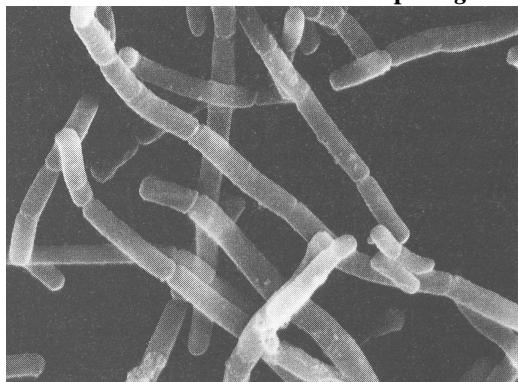
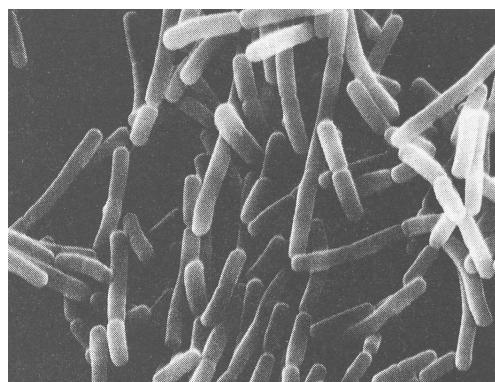


Photo 5 : *Lactobacillus helveticus* (x 6000)

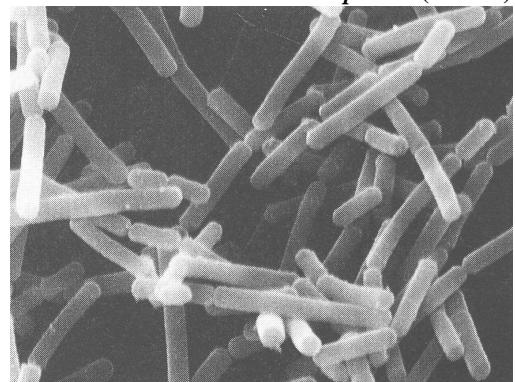


Photo 6 : *Lactobacillus casei* ssp. *casei* (x 6000)

Source tableau et photos : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Le genre *Leuconostoc*

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînes comme les Streptocoques, mais cette bactérie est hétérofermentaire. Elle produit de l'acide D(-)lactique, de l'éthanol et du CO₂. Ces bactéries sont mésophiles (température de croissance optimum 20-30°C) et caractérisées par la production, à partir du citrate du lait, de diacétyle, et parfois par la synthèse de dextranes et de lévanes extracellulaires en présence de saccharose.

La classification des espèces de *Leuconostoc* est difficile.

On les isole du lait, des produits laitiers, des fruits, des légumes, des végétaux en fermentation (choucroute), des produits de la panification et des solutions visqueuses dans les sucreries. *Ln. oenos* est absent du lait ; il est isolé du vin.

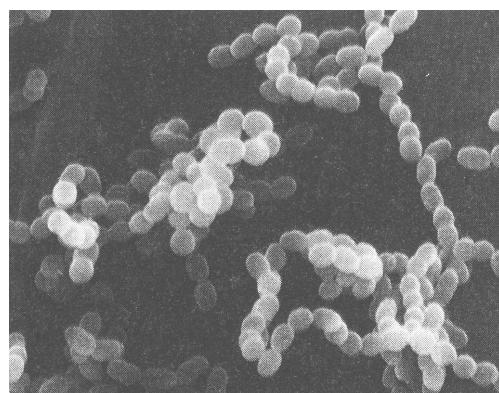


Photo 7 : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* (x 6000)

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

	Croissance		Fermentation						Hydrolyse de l'esculine	Utilisation du citrate	Synthèse de dextrane
	37°C	NaCl 3%	Ara	Cell	Fru	Lac	Sac	Tre			
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>	+-	+	+-	+-	+	+-	+	+	+-	+-	+
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	+	+-	+-	+-	+	+	+	+	+-	+-	+
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Ln. paramesenteroides</i>	+-	+-	+-	+-	+	+-	+	+	+-	+-	-
<i>Ln. lactis</i>	+	+-	-	-	+	+	+	-	-	+-	-
<i>Ln. oenos</i>	+-	ND	ND	+-	+	-	-	+	+	+-	-

Tableau 11 : Caractéristiques distinctives des espèces du genre *Leuconostoc*

+ : croissance positive ; - : croissance négative ; +- : croissance tardive ; ND : non déterminé ; Ara : arabinose ; Cell : cellobiose ; Fru : fructose ; Lac : lactose ; Sac : saccharose ; Tre : tréhalose.

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Le genre *Pediococcus*

Les *Pediococcus* sont formés de cellules groupées en paires ou en tétrades. Ils fermentent les sucres en produisant de l'acide lactique DL ou L(+). Leurs exigences nutritionnelles, leur faible activité protéolytique et chez la plupart des espèces leur incapacité à utiliser le lactose ne leur permettent pas d'acidifier et de coaguler le lait.

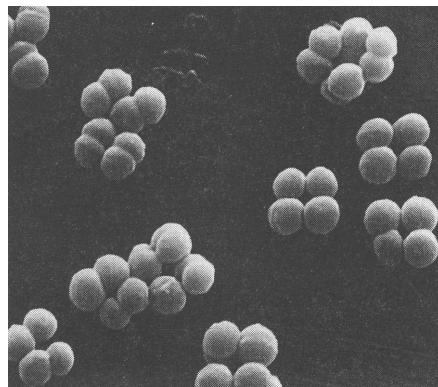


Photo 8 : *Pediococcus* sp. (x 7000)

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Les différentes espèces de *Pediococcus* sont présentes dans les végétaux en décomposition, parfois dans les boissons : bière, cidre, vin. On les rencontre également dans les saucissons. *Pc. halophilus* est facilement isolé de préparations d'anchois salé ou de sauce de soja.

	Croissance à pH 4,5	Taux maximal de NaCl toléré	Fermentation								Hydrolyse de l'arginine
			Lac	Mal	Mlz	Rib	Sac	Tre	Dex	Amy	
<i>Pc. damnosus</i>	+	<4%	-	+/-	+/-	-	+/-	+	-	-	-
<i>Pc. parvulus</i>	+	6,5%	-	+	-	-	6	+/-	-	-	-
<i>Pc. inopinatus</i>	ND	4 à 6,5%	+	+	-	-	+/-	+	+/-	-	-
<i>Pc. dextrinicus</i>	-	4%	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+	+	-
<i>Pc. pentosaceus</i>	+	6,5%	+/-	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>Pc. acidolactici</i>	ND	6,5%	+/-	-	-	+	-	+/-	-	-	+
<i>Pc. halophilus</i>	-	18%	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pc. urinaequi</i>	-	6,5%	+/-	+	-	ND	+	+	+	-	-

Tableau 12 : Caractéristiques distinctives de quelques espèces de *Pediococcus*

+ : croissance positive ; - : croissance négative ; +/- : croissance tardive ; ND : non déterminé ; Amy : amidon ; Dex : dextrine ; Lac : lactose ; Mal : maltose ; Mlz : mélézitose ; Rib : ribose ; Sac : saccharose ; Tre : tréhalose.

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Les Streptocoques lactiques et Lactocoques

Dans le genre *Streptococcus*, les streptocoques lactiques forment un groupe distinct des autres espèces qui sont soit pathogènes pour l'homme ou pour l'animal, soit saprophytes de la cavité buccale ou de l'intestin.

Ces espèces diffèrent entre elles par la présence d'un antigène de groupe dit antigène de Lancefield, et par leur capacité de croître à des températures extrêmes : 45°C pour les thermophiles, 10°C pour les mésophiles (voir le tableau page suivante).

Les streptocoques lactiques se composent en fait de deux groupes distincts : les streptocoques mésophiles possédant l'antigène de groupe N, et l'espèce thermophile *Streptococcus thermophilus* qui ne possède pas d'antigène de Lancefield.

Les streptocoques lactiques mésophiles : le genre *Lactococcus*

En 1985, Scheiffler *et al.* ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*. Outre les anciens streptocoques lactiques mésophiles, ce genre regroupe des espèces « mal classées » auparavant.

Nouvelle dénomination	Ancienne dénomination
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus xylosus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>hordniae</i>	<i>Lactobacillus hordniae</i>
<i>Lactococcus garviae</i>	<i>Streptococcus garviae</i>
<i>Lactococcus plantarum</i>	<i>Streptococcus plantarum</i>
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Streptococcus raffinolactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>

Tableau 13 : Anciennes et nouvelles dénominations des streptocoques lactiques

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Les Streptocoques lactiques ou Lactocoques peuvent être isolés du lait ou des végétaux qui sont probablement leur réservoir.

	Groupe sérologique	Croissance à						+ NaCl 2%	+ NaCl 4%	+ NaCl 6,5%	+ Bile 40%	Utilisation citrate	Hydrolyse L-arginine	
		10°C	39°C	40°C	45°C	pH 9,2	pH 9,6							
<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	N	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	N	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	N	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-?	-	-	-
<i>Streptococcus raffinolactis</i>	N	+	-	-	-	?	?	+	+	-	-	?	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Fermentation																
	Glu	Lac	Gal	Sac	Mal	Mtl	Xyl	Ara	Rib	Dex	Esc	Sal	Mlz	Tre	Raf	Mel	Gly
<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	+	+	+	v	+	v	v	v	+	v	+	v	-	v	v	-	-
<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	+	+	+	v	+	v	v	v	+	+	v	v	-	v	v	-	-
<i>Streptococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	-	-	-
<i>Streptococcus raffinolactis</i>	+	+	+	-	+	v	v	v	v	+	+	v	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 14 : Caractéristiques conventionnelles distinctives des espèces de Streptocoques lactiques

+ : plus de 90% des souches ; v : entre 10 et 90% des souches ; ?: inconnu ; Ara : arabinose ; Dex : dextrines ; Esc : esculine ; Gal : galactose ; Glu : glucose ; Gly : glycérol ; Lac : lactose ; Mal : maltose ; Mel : mélibiose ; Mtl : mannitol ; Mlz : mélézitose ; Raf : raffinose ; Rib : ribose ; Sac : saccharose ; Sal : saliciline ; Tre : tréhalose.

Source : Leveau, *Microbiologie industrielle*, 1993

Les cellules de Lactocoques sont normalement arrondies (Photo 8) mais elles peuvent quelquefois s'allonger chez certaines espèces (d'où la mauvaise classification de *Lactobacillus hordniae* qui est devenu *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* par exemple).

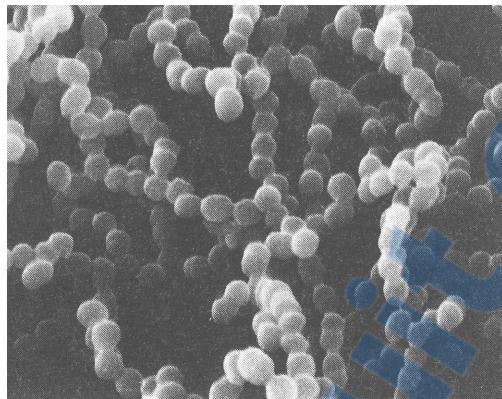


Photo 9 : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (x 6000)

Source : Leveau, Microbiologie industrielle, 1993

Streptococcus thermophilus

Cette espèce est restée dans le genre *Streptococcus*. Elle se distingue essentiellement des autres Streptocoques lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42-43°C, l'absence de tout antigène de groupe, sa thermorésistance à 60°C (parfois 65°C pendant 30 min, une activité fermentaire le plus souvent réduite à quelques sucres et une forte sensibilité au NaCl.

Streptococcus thermophilus peut être isolé du lait chauffé à 45-50°C ou du lait pasteurisé, des produits laitiers (yaourts), du matériel de laiterie, des levains artisanaux. Il n'aurait jamais été isolé d'autres habitats.

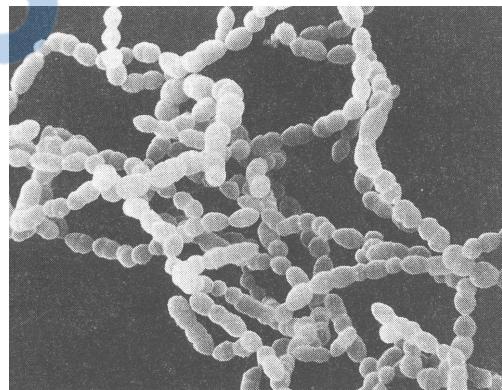


Photo 10 : *Streptococcus thermophilus* (x4000)

Source : Leveau, Microbiologie industrielle, 1993

Annexe 3

Notions statistiques et interprétation des graphiques utilisés en mét-a-analyse

Mesures d'effet

Mesures d'effet pour les évènements binaires

On parle de données binaires lorsque l'issue pour chaque participant est une possibilité au choix parmi deux (par exemple mort ou survie).

Les résultats d'une étude clinique utilisant des données binaires peuvent être transcrits dans un tableau comme celui-ci :

	Evènement	Pas d'évènement	Total
Traitement	a	b	a+b
Contrôle	c	d	c+d

Risques et odds

Un risque décrit la probabilité avec laquelle un évènement va se produire. Il est habituellement exprimé sous la forme d'un nombre décimal compris entre 0 et 1.

Ex : risque que l'évènement se produise dans le groupe recevant le traitement = a/(a+b)

Un odds est la probabilité qu'un évènement se produise divisé par la probabilité que cet évènement ne se produise pas. C'est un nombre décimal compris entre 0 et l'infini.

Ex : odds de l'évènement dans le groupe traitement = a/b.

Mesures d'effet relatif : Risque relatif et Odds ratio

► *Risque relatif (RR)*

Le risque relatif traduit la multiplication du risque lorsque l'on effectue l'intervention (ou le traitement).

$$r^E = r^C \times RR,$$

avec r^E : risque du groupe expérimental et r^C : risque du groupe contrôle

$$RR = r^E/r^C = (a/(a+b))/(c/(c+d))$$

Une valeur de 1 du risque relatif signifie que le risque est le même dans les deux groupes ; une valeur inférieure à 1 signifie que le risque est diminué dans le groupe traitement ; supérieure à 1, le risque est accru dans le groupe traitement.

► *Odds ratio (OR)*

L'odds ratio traduit la multiplication des odds qui se produit lorsque l'on effectue l'intervention (ou le traitement). Comme pour le risque relatif, une valeur de 1 signifie que les odds sont les mêmes dans les groupes avec et sans intervention.

$$OR = (a/b)/(c/d) = ad/bc$$

L'odds ratio est plus délicat à interpréter que le risque relatif.

Mesure d'effet absolu : Différence de risque (RD)

La différence de risque est la différence entre les risques observés pour les deux groupes. Elle peut toujours être calculée, même lorsqu'il ne se produit pas d'évènement dans les groupes.

$$\begin{aligned} r^E &= r^C + RD \\ RD &= r^E - r^C = (a/(a+b)) - (c/(c+d)) \end{aligned}$$

Elle est assez simple à interpréter, mais son importance clinique est variable en fonction du risque de l'évènement.

Par exemple avec une différence de risque de 2% :

Si le risque en l'absence de traitement est de 60%, avec le traitement, ce risque devient 58%, ce qui n'est pas vraiment moins important. Si le risque en absence de traitement est 3%, il devient 1% lorsque l'on traite ; la différence est proportionnellement plus grande, et potentiellement plus importante.

Mesures d'effet pour les évènements continus

On parle de données continues lorsque les résultats pour chaque participant peuvent prendre n'importe quelle valeur dans un intervalle donné.

Deux mesures d'effet sont couramment utilisées pour ce type de données.

Déférence de moyennes, Difference of means ou Weighted Means Difference

Cette grandeur mesure la différence entre les valeurs moyennes des deux groupes d'un essai. Elle peut être utilisée dans une méta-analyse lorsque tous les essais utilisent la même échelle pour mesurer le critère de jugement.

Effet standardisé, Standardised Mean Difference (SMD)

L'effet standardisé est utilisé lorsque les essais évaluent tous le même critère, mais le mesurent de façons différentes. Dans ces circonstances, il est nécessaire de standardiser les résultats des essais avec une échelle commune avant de les combiner. L'effet standardisé exprime la taille de l'effet du traitement de chaque essai par rapport à la variabilité observée dans cet essai.

► *Calcul de l'effet standardisé*

Le modèle statistique utilisé dans cette situation suppose que les valeurs du critère de jugement dans le groupe traité Y_1^E, \dots, Y_n^E sont distribuées suivant une loi normale de moyenne μ^E et de variance σ^2 . De façon similaire dans le groupe contrôle, les valeurs Y_1^C, \dots, Y_n^C suivent une loi normale de moyenne μ^C et de même variance σ^2 . Avec ces notations, l'effet standardisé ES se définit par :

$$ES = (\mu^E - \mu^C) / \sigma$$

$SMD = ES = \text{Différence de moyenne entre les groupes} / \text{Ecart-type parmi les participants}$

La transformation effectuée permet d'obtenir une nouvelle variable aléatoire dont l'écart type est égal à 1. Les variables initiales étant supposées distribuées selon une loi gaussienne, l'effet standardisé l'est aussi.

► *Signe de l'effet standardisé*

Le signe de l'effet standardisé dépend étroitement de l'orientation de la variable initiale. Si les valeurs de cette variable sont d'autant plus élevées que la sévérité de la maladie est importante (valeur de pression artérielle, score de douleur par exemple), une valeur négative de l'effet standardisé témoignera d'un effet bénéfique. En effet, l'effet standardisé δ a le signe de la différence $\mu^E - \mu^C$ (moyenne du groupe expérimental diminuée de celle du groupe contrôle). Si $\delta < 0$ alors $\mu^E - \mu^C < 0$, c'est à dire $\mu^E < \mu^C$, ce qui montre que la valeur obtenue avec le traitement étudié est inférieure à celle observée sans traitement. Cela correspond donc, pour cette variable, à une sévérité sous traitement inférieure à celle sans traitement, donc à un effet bénéfique. Si l'orientation de la variable est inversée, les plus faibles valeurs correspondant aux plus fortes sévérités de la maladie (par exemple avec un score de performance, périmètre de marche), un effet standardisé négatif témoigne d'un effet délétère (les performances sont réduites par le traitement).

Dans tous les cas, une valeur nulle correspond évidemment à l'absence d'effet.

► *Test d'association*

Un test d'association, qui cherche à rejeter l'hypothèse nulle $\delta = 0$, est fourni par la statistique de test :

$$Z = d_c / [\text{v}(\text{vâr}(d_c))]$$

où d_c est l'estimateur pondéré de l'effet standardisé commun, calculé à partir de l'effet standardisé des essais intégrés à la méta-analyse, et $\text{vâr}(d_c)$ est sa variance.

Z suit une loi normale centrée réduite $N(0,1)$. En situation bilatérale, lorsque $|Z| = 1,96$, le test est significatif au seuil de 5%.

► *Interprétation de l'effet standardisé*

L'effet standardisé peut être conçu comme étant la différence qui existe entre la distribution des valeurs du critère de jugement dans le groupe contrôle et celle des valeurs dans le groupe expérimental. Par hypothèse, ces deux distributions sont gaussiennes et de même écart type.

Graphiquement, l'effet standardisé est la distance qui sépare les deux modes de ces deux distributions (Figure 35 ci-dessous).

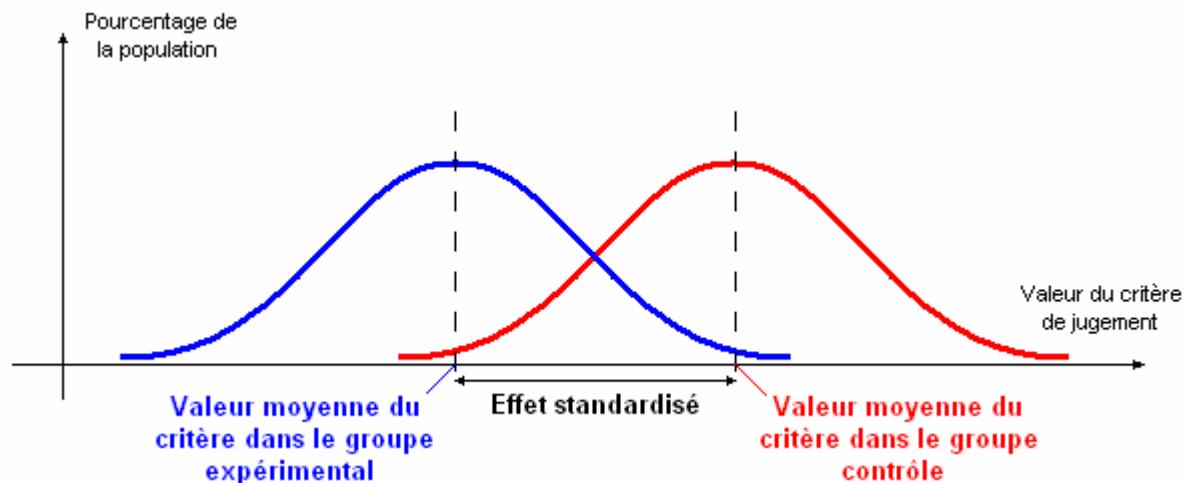


Figure 35 : Traduction graphique de l'effet standardisé

Pour une valeur donnée de l'effet standardisé, il est possible de calculer quelle est la proportion des individus (percentile) qui ont une valeur inférieure grâce à une table de loi gaussienne (

Tableau 15 ci-dessous).

Par exemple, un effet standardisé de 0,8 signifie que la valeur moyenne du groupe traité est la même que la valeur du 79^o percentile du groupe contrôle. Un effet standardisé de (-0,8) correspond au 21^o percentile du groupe contrôle ($100-79 = 21$).

Effet standardisé	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90
Percentile correspondant	0,5000	0,5389	0,5793	0,6179	0,6554	0,6915	0,7257	0,7580	0,7881	0,8159

Effet standardisé	1,00	1,10	1,20	1,30	1,40	1,50	1,60	1,70	1,80	1,90
Percentile correspondant	0,8414	0,8643	0,8849	0,9032	0,9193	0,9332	0,9452	0,9554	0,9641	0,9713

Tableau 15 : Table de loi gaussienne

On peut considérer que la taille de l'effet est petite si l'effet standardisé est égal à 0,20 ; moyenne lorsque l'effet standardisé est égal à 0,5 ; et grande lorsque l'effet standardisé est égal à 0,80.

Homogénéité, hétérogénéité

L'une des hypothèses les plus importantes que l'on doit faire pour pouvoir combiner des essais dans une méta-analyse est l'hypothèse d'homogénéité : on considère que les différents essais ont estimé le même effet standardisé ES.

Pour cela, il nous faut utiliser un test d'homogénéité, dont l'hypothèse nulle H_0 est :

$$H_0 : ES_1 = \dots = ES_k = ES$$

L'hypothèse alternative est qu'un essai au moins diffère des autres.

Aucun test exact de cette hypothèse n'est connu mais nous disposons d'un test asymptotiquement exact :

$$Q = \sum_{i=1}^k \frac{(d_i - d_c)^2}{\text{var}(d_i)}$$

où d_i est l'effet standardisé des essais i , et d_c est l'estimateur pondéré de l'effet standardisé.

Sous l'hypothèse nulle, cette statistique Q suit une loi du chi-deux à $k-1$ degrés de liberté.

Si l'on obtient une valeur de Q qui excède le $(100-\alpha)^{\text{ème}}$ percentile de la distribution de chi-deux à $k-1$ degrés de libertés (valeur critique), il est possible, avec un risque α , de rejeter l'hypothèse que les d_i sont tous égaux.

Si l'hypothèse d'homogénéité a été rejetée, il n'est pas raisonnable de combiner les essais entre eux puisqu'ils n'estiment pas le même paramètre. Le recours à un modèle aléatoire peut être envisagé, ou on peut chercher à expliquer l'hétérogénéité en effectuant des analyses en sous-groupes.

RevMan 4.2 intègre également un autre test d'homogénéité, qui utilise la formule suivante :

$$I^2 = [(Q - \text{ddl})/Q] \times 100\%$$

avec Q : statistique du chi-deux, et ddl = son degré de liberté

Cela décrit le pourcentage de la variabilité qui est due à l'hétérogénéité plutôt qu'au hasard. On peut considérer qu'une valeur supérieure à 50% traduit une hétérogénéité substantielle.

Modèle fixe, modèle aléatoire

La méta-analyse est un processus en deux étapes. Tout d'abord, on mesure individuellement l'effet du traitement observé dans chaque étude, grâce à une mesure d'effet adapté (voir l'annexe Mesures d'effet). Ensuite, on combine les études, et on calcule un effet commun grâce à une moyenne pondérée des effets de chaque étude.

$$\text{Effet commun} = \text{Moyenne pondérée} = \frac{\sum T_i W_i}{\sum W_i}$$

avec T_i = effet du traitement estimé pour l'étude i et W_i = poids attribué à l'étude i

Le poids attribué à chaque étude dépend du modèle que l'on choisit. En effet, pour réaliser une méta-analyse, comme pour n'importe quel modèle statistique, il nous faut faire plusieurs suppositions, ou hypothèses de départ. L'une d'entre ces hypothèses concerne la répétabilité de l'effet du traitement. Selon que l'on considère que l'effet du traitement est toujours le même, à l'exception d'un facteur « chance » ou « hasard », ou que l'on admet que l'effet varie suivant les études pour des raisons autres que le hasard, on choisira d'utiliser un modèle fixe ou un modèle aléatoire pour réaliser la méta-analyse.

Modèle fixe

On utilise un modèle fixe lorsque l'on considère que l'effet du traitement que l'on cherche à calculer est le même dans toutes les études.

La méthode la plus simple et la plus courante de calculer un effet global avec un modèle fixe est la méthode de la variance inverse. C'est cette méthode qui est utilisée dans RevMan 4.2.

La méthode de la variance inverse est ainsi nommée parce que le poids attribué à chaque étude est l'inverse de la variance de l'effet estimé.

Le poids attribué à chaque étude dans un modèle fixe est :

$$W_i = \frac{1}{S_i^2}$$

avec S_i = erreur standard associée à cet effet

L'effet moyen du traitement dans un modèle fixe est :

$$\text{Moyenne pondérée} = \frac{\sum \frac{T_i}{S_i^2}}{\sum \frac{1}{S_i^2}}$$

avec T_i = effet du traitement estimé pour l'étude i

Ainsi, les études les plus grosses, qui ont des erreurs standards plus réduites, ont plus de poids que les petites études, qui ont de plus grosses erreurs standards. Ce choix minimise l'imprécision de l'effet global.

Modèle aléatoire

Contrairement au modèle fixe, l'hypothèse initiale du modèle aléatoire est que l'effet du traitement n'est pas le même dans toutes les études, mais qu'il suit une distribution normale. Le modèle aléatoire utilise une variation de la méthode de la variance inverse. La version la plus simple est celle de Der Simonian et Laird. L'erreur standard de l'effet estimé pour chaque étude est ajustée à partir des effets estimés et des erreurs standards de l'ensemble des études incluses dans la méta-analyse.

Le poids attribué à chaque étude dans un modèle aléatoire est :

$$W_i = \frac{1}{S_i^2 + \phi}$$

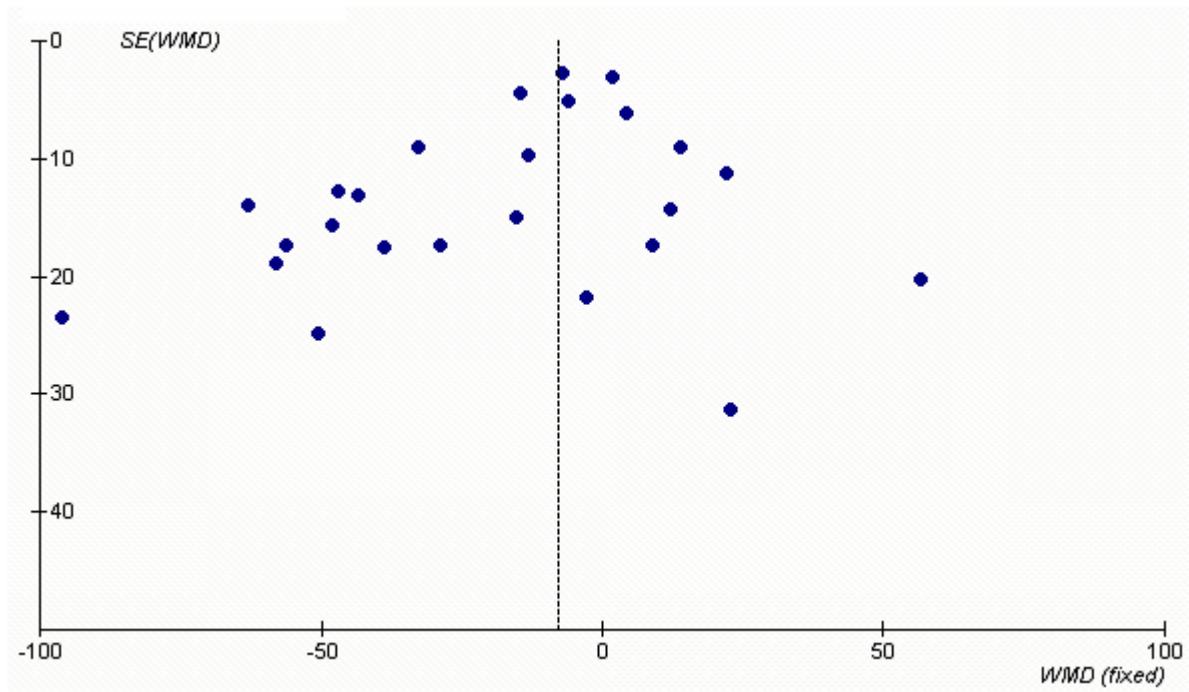
où ϕ est une constante calculée à partir de Q .

Le modèle fixe et le modèle aléatoire ne répondent pas à la même question. Le modèle fixe et son intervalle de confiance répondent à la question «Quelle est la meilleure estimation de l'effet du traitement ? ». Le modèle aléatoire quant à lui répond à la question «Quel est l'effet moyen du traitement ? ».

Les réponses à ces questions coïncident lorsqu'il n'y a pas d'hétérogénéité, ou quand la distribution de l'effet du traitement est à peu près symétrique. Si les réponses ne sont pas cohérentes, il est possible que l'estimation calculée avec le modèle aléatoire ne reflète l'effet réel d'aucune population.

L'intervalle de confiance obtenu avec un modèle aléatoire est plus large que celui obtenu avec un modèle fixe, et l'effet du traitement n'est parfois pas significatif avec un modèle aléatoire alors qu'il l'est avec un modèle fixe.

Interprétation d'un funnel plot



Le funnel plot est utilisé pour évaluer l'importance du biais de publication.

L'axe vertical est une mesure de la précision de l'estimation de l'effet du traitement. On peut évaluer cette précision grâce à l'erreur standard de l'effet moyen du traitement (WMD), comme dans l'exemple ci-dessus, l'erreur standard du logarithme du risque relatif, la taille de l'échantillon, ou le poids attribué à l'étude. Au plus l'erreur standard est faible, au plus on considère que l'étude est précise, et au plus on place l'étude vers le haut du graphe.

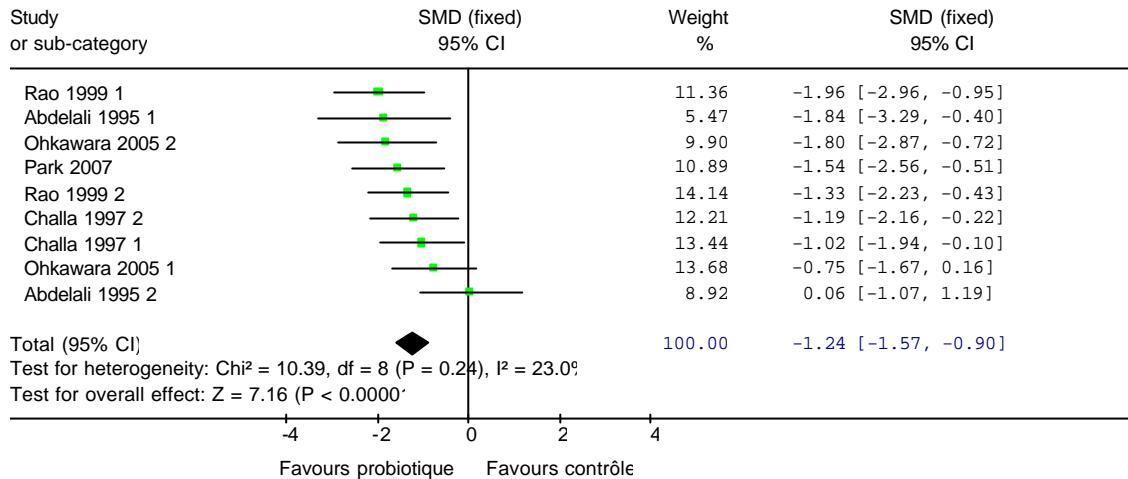
L'axe horizontal mesure l'effet du traitement. Ici il s'agit de l'effet moyen.

Le point correspondant à chaque étude est alors placé sur le graphique. La ligne verticale correspond à l'estimation de l'effet moyen pour la mété-analyse.

Logiquement, les études les moins précises (celles qui ont le moins de participants et d'événements) sont les plus soumises au hasard ; elles sont donc plus dispersées autour de l'estimation de l'effet moyen. On s'attend à ce que les plus grosses études soient plus proches de l'effet moyen estimé. Dans l'ensemble, cela nous donne une forme triangulaire, ou un entonnoir (funnel en anglais) à l'envers.

Lorsqu'il y a un biais de publication, le funnel plot n'est pas symétrique, il en « manque » une partie. Habituellement, ce sont les études qui démontrent un effet faible ou négatif du traitement qui ne sont pas publiées. Le graphique ci-dessus est à peu près symétrique ; si peu d'études ne montrant pas d'effet ou montrant un effet négatif avaient été publiées, il y aurait moins de points dans la partie droite.

Interprétation d'un forest plot



Ce type de graphique présente différentes informations.

Tout d'abord, pour chaque essai, l'estimation de l'effet moyen accompagné de son intervalle de confiance est représentée par un point et une barre horizontale. Le poids attribué à chaque essai est traduit par la taille du carré qui représente l'effet moyen de l'essai.

Ces représentations graphiques sont accompagnées des valeurs chiffrées correspondantes à droite du graphe.

On peut également choisir de présenter les données brutes à gauche du graphe, entre le nom de l'essai et sa représentation graphique (ce qui n'est pas le cas dans l'exemple ci-dessus).

Le « diamant » noir en bas du graphique représente l'estimation de l'effet du traitement, calculée à partir de tous les essais.

Les résultats du test d'hétérogénéité et du test d'association sont précisés sous l'estimation de l'effet global.

Lorsque l'on effectue une méta-analyse en sous-groupes, l'effet global, les résultats du test d'hétérogénéité et du test d'association, sont présentés pour chaque sous-groupe.

Annexe 4

Caractéristiques, données brutes, et effet moyen des études incluses dans la méta-analyse

Nom de l'étude	Animaux		Carcinogène						Aliment			Probiotique administré			Prébiotique	
			Molécule	Voie	Dose (mg/kg/ad)	Fréquence	Nb ad	Dose T (mg/kg)	MG	PB	Glucides	Espèce	Dose (b/al/j)	Quand		
Femia 2002 1	Rats	m	F344	AOM	SC	15	1/sem	2	30	23%		Pas d'amidon	<i>LGG</i> *	5E+08	A.P.Ap.	Non
Femia 2002 2	Rats	m	F344	AOM	SC	15	1/sem	2	30	23%		Pas d'amidon	<i>LGG</i> *	5E+08	A.P.Ap.	Inuline
Fukui 2001	Souris	m	ICR	DMH	IM	20	1/sem	10	200	5%			<i>L. acidophilus</i> *		Ap	Non
Goldin 1980 1	Rats	m	F344	DMH	SC	20	1/sem	20	400	20%			<i>L. acidophilus</i>	1E+10	A.P.Ap.	Non
Goldin 1980 2	Rats	m	F344	DMH	SC	20	1/sem	20	400	20%			<i>L. acidophilus</i>	1E+10	A.P.Ap.	Non
Goldin 1996 1	Rats	m	F344	DMH	SC	20	1/sem	16	320	20%	20%	15% amidon	<i>LGG</i>	2E+10	A.P.Ap.	Non
Goldin 1996 2	Rats	m	F344	DMH	SC	20	1/sem	16	320	20%	20%	15% amidon	<i>LGG</i>	2E+10	P.A.	Non
Goldin 1996 3	Rats	m	F344	DMH	SC	20	1/sem	16	320	5%	20%	15% amidon	<i>LGG</i>	2E+10	A.P.Ap.	Non
Goldin 1996 4	Rats	m	F344	DMH	SC	20	1/sem	16	320	5%	20%	15% amidon	<i>LGG</i>	2E+10	P.A.	Non
Li 2003	Rats	m	Wistar	DMH	SC	40	1/sem	10	400	5%			<i>Lc. lactis</i>	5E+09	P.A.	Non
Mc Intosh 1999 1	Rats	m	S-D	DMH	SC	20	1/sem	4	80	20%	20%	30% amidon	<i>L. acidophilus</i>	1E+08	A.P.Ap.	Non
Mc Intosh 1999 2	Rats	m	S-D	DMH	SC	20	1/sem	4	80	20%	20%	30% amidon	<i>L. rhamnosus</i>	1E+08	A.P.Ap.	Non
Reddy 1993 1	Rats	m	F344	IQ	PO	125 ppm	Ts jrs			24%	24%	33% amidon	<i>Bb. longum</i>	2E+09	P.	Non
Reddy 1993 2	Rats	f	F344	IQ	PO	125 ppm	Ts jrs			24%	24%	33% amidon	<i>Bb. longum</i>	2E+09	P.	Non
Takano 1985 1	Rats	m	F344	DMH	IP	20	1/sem	16	320	4%	25%	60% ENA	<i>L. helveticus jugurti</i> *	1E+09	P.Ap.	Non
Takano 1985 2	Rats	m	F344	DMH	IP	20	1/sem	16	320	4%	25%	60% ENA	<i>L. helveticus jugurti</i> *	1E+09	P.Ap.	Non
Yamazaki 2000	Rats	m	S-D	AOM	SC	7,4	1/sem	10	74	5%	24%	54% ENA	<i>L. casei</i>	1E+10	A.P.Ap.	Non

Tableau 16 : Caractéristiques des études utilisant le critère incidence des tumeurs incluses dans la méta-analyse

m : mâles ; f : femelles ; S-D : Sprague-Dawley ; IP : intra-péritonéale ; SC : sous-cutanée ; PO : *per os* ; IM : intra-musculaire ; ad : administration ; Nb : nombre ; Dose T : dose totale administrée ; MG : matières grasses ; PB : protéines brutes ; (b/al/j) : nombre de bactéries viables administrées par animal et par jour ; A. : avant le traitement carcinogène ; P. : pendant le traitement carcinogène ; Ap : après le traitement carcinogène

Nom de l'étude	Animaux			Carcinogène						Aliment			Probiotique administré			Prébiotique
				Molécule	Voie	Dose (mg/kg/ad)	Fréquence	Nb ad	Dose T (mg/kg)	MG	PB	Glucides	Espèce	Dose (b/al/j)	Quand	
Abdelali 1995 1	Rats	m	S-D	DMH	IP	25	3j entre	2	50	5%	18%	46% amidon	<i>Bb. animalis</i>	6E+09	A.P.	Non
Abdelali 1995 2	Rats	m	S-D	DMH	IP	25	3j entre	2	50	5%	18%	46% amidon	<i>Bb. animalis</i>	6E+09	A.P.	Non
Arimochi 1997 1	Rats	m	S-D	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%			<i>Bb. adolescentis</i>	3E+08	A.P.Ap.	Non
Arimochi 1997 2	Rats	m	S-D	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%			<i>L. acidophilus</i>	2E+08	A.P.Ap.	Non
Arimochi 1997 3	Rats	m	S-D	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%			<i>L. acidophilus</i>	2E+08	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 1a	Rats	m	S-D	DMH	PO	60		1	60	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	5E+09	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 1b	Rats	m	S-D	DMH	PO	60		1	60	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	3E+09	P.	Non
Bolognani 2001 1c	Rats	m	S-D	DMH	PO	60		1	60	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	5E+09	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 1d	Rats	m	S-D	DMH	PO	60		1	60	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	4E+07	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 1e	Rats	m	S-D	MNU	PO	150		1	150	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	5E+09	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 2a	Rats	m	S-D	DMH	PO	25	2j entre	2	50	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	6E+09	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 2b	Rats	m	S-D	DMH	PO	25	2j entre	2	50	5%	20%	70% amidon	<i>Bb. longum</i>	8E+07	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 2c	Rats	m	S-D	DMH	PO	12,5	1/j	4	50	5%	20%	70% amidon	<i>L. casei</i>	6E+09	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 2d	Rats	m	S-D	DMH	PO	12,5	1/j	4	50	5%	20%	70% amidon	<i>Bb. longum</i>	8E+07	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 3a	Rats	m	S-D	AOM	SC	12,5	1/sem	2	25	5%	20%	70% amidon	<i>L. acidophilus</i>	1E+08	A.P.Ap.	Non
Bolognani 2001 3b	Rats	m	S-D	AOM	SC	12,5	1/sem	2	25	25%	25%	45% amidon	<i>L. acidophilus</i>	8E+07	A.P.Ap.	Non
Challa 1997 1	Rats	m	F344	AOM	SC	16	1/sem	2	32	5%	20%	50% amidon	<i>Bb. longum</i>	1E+09	A.P.Ap.	Non
Challa 1997 2	Rats	m	F344	AOM	SC	16	1/sem	2	32	5%	20%	50% amidon	<i>Bb. longum</i>	1E+09	A.P.Ap.	Lactulose
Nakanishi 2003 1	Rats	m	F344	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%			<i>C. butyricum</i>	1E+09	P.A.	Non
Nakanishi 2003 2	Rats	m	F344	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%			<i>C. butyricum</i>	1E+09	P.A.	HAS
Ohkawara 2005 1	Souris	m	Jcl:ICR	DMH	PO	30	4 j entre	2	60	5%	25%	51% ENA	<i>Bv. fibrosolvens</i>	1E+09	A.P.Ap.	Non
Ohkawara 2005 2	Souris	m	Jcl:ICR	DMH	PO	30	4 j entre	2	60	5%	25%	51% ENA	<i>Bv. fibrosolvens</i>	1E+09	A.P.Ap.	Non
Park 2007	Rats	m	F344	DMH	SC	30	1/sem	6	180	22%	20%	51% amidon	<i>B. polyfermenticus</i>	3E+08	A.P.Ap.	Non
Rao 1999 1	Rats	m	F344	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%	20%	52% amidon	<i>L. acidophilus</i>	1E+09	A.P.Ap.	Non
Rao 1999 2	Rats	m	F344	AOM	SC	15	1/sem	2	30	5%	20%	52% amidon	<i>L. acidophilus</i>	2E+09	A.P.Ap.	Non
Rowland 1998 1	Rats	m	S-D	AOM	SC	12,5	1/sem	2	25	25%	25%	45% amidon	<i>Bb. longum</i>	6E+09	Ap	Non
Rowland 1998 2	Rats	m	S-D	AOM	SC	12,5	1/sem	2	25	25%	25%	45% amidon	<i>Bb. longum</i>	6E+09	Ap	Inuline

Tableau 17 : Caractéristiques des études utilisant le critère ACF incluses dans la métá-analyse

m : mâles ; f : femelles ; S-D : Sprague-Dawley ; IP : intra-péritonéale ; SC : sous-cutanée ; PO : *per os* ; IM : intra-musculaire ; ad : administration ; Nb : nombre ; Dose T : dose totale administrée ; MG : matières grasses ; PB : protéines brutes ; (b/al/j) : nombre de bactéries viables administrées par animal et par jour ; A. : avant le traitement carcinogène ; P. : pendant le traitement carcinogène ; Ap : après le traitement carcinogène

Study or sub-category	Probiotiques n/N	Contrôle n/N	Weight %	RR (random) 95% CI
Femia 2002 1	22/27	18/28	7.99	1.27 [0.91, 1.76]
Femia 2002 2	14/27	16/28	4.72	0.91 [0.56, 1.47]
Fukui 2001	23/30	23/23	12.47	0.77 [0.63, 0.95]
Goldin 1980 1	8/11	10/12	5.43	0.87 [0.56, 1.36]
Goldin 1980 2	8/20	17/22	3.53	0.52 [0.29, 0.93]
Goldin 1996 1	15/21	20/20	9.62	0.72 [0.55, 0.95]
Goldin 1996 2	19/21	20/21	14.24	0.95 [0.80, 1.12]
Goldin 1996 3	13/21	20/21	7.45	0.65 [0.46, 0.92]
Goldin 1996 4	13/20	16/21	6.22	0.85 [0.57, 1.27]
Li 2003	9/10	10/10	10.01	0.90 [0.69, 1.18]
Mc Intosh 1999 1	3/20	8/20	1.01	0.38 [0.12, 1.21]
McIntosh 1999 2	4/20	8/20	1.29	0.50 [0.18, 1.40]
Takano 1985 1	7/9	9/9	6.57	0.79 [0.54, 1.16]
Takano 1985 2	6/9	9/9	4.85	0.68 [0.42, 1.10]
Yamazaki 2000	8/15	14/15	4.61	0.57 [0.35, 0.93]
Total (95% CI)	281	279	100.00	0.80 [0.71, 0.91]
Total events: 172 (Probiotiques), 218 (Contrôle)				
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 22.93$, $df = 14$ ($P = 0.06$), $I^2 = 38.9\%$				
Test for overall effect: $Z = 3.53$ ($P = 0.000$)				

Figure 36 : Données brutes et risque relatif des études incluses dans la méta-analyse pour le critère incidence des tumeurs (Risque relatif commun calculé en modèle aléatoire)

Study or sub-category	N	Probiotique Mean (SD)	N	Contrôle Mean (SD)	Weight %	SMD (random) 95% CI
Abdelali 1995 1	8	47.50(38.53)	8	79.37(51.75)	3.67	-0.66 [-1.68, 0.35]
Abdelali 1995 2	6	70.50(39.60)	7	68.86(38.07)	3.49	0.04 [-1.05, 1.13]
Arimochi 1997 1	6	237.00(71.00)	6	214.00(29.00)	3.35	0.39 [-0.76, 1.54]
Arimochi 1997 2	6	158.00(31.00)	6	214.00(29.00)	2.78	-1.72 [-3.13, -0.31]
Arimochi 1997 3	6	198.00(37.00)	5	201.00(35.00)	3.26	-0.08 [-1.26, 1.11]
Bolognani 2001 1 a	10	31.40(25.30)	10	17.50(12.60)	3.95	0.67 [-0.24, 1.57]
Bolognani 2001 1 b	10	21.70(14.50)	10	17.50(12.60)	4.01	0.30 [-0.59, 1.18]
Bolognani 2001 1 c	10	86.90(26.20)	10	74.60(36.70)	4.00	0.37 [-0.52, 1.26]
Bolognani 2001 1 d	10	131.10(52.20)	10	74.60(36.70)	3.79	1.20 [0.23, 2.17]
Bolognani 2001 1 e	10	23.90(16.40)	10	37.00(26.20)	3.97	-0.57 [-1.47, 0.32]
Bolognani 2001 2 a	8	35.55(6.60)	8	68.33(24.40)	3.23	-1.73 [-2.93, -0.53]
Bolognani 2001 2 b	8	90.55(20.00)	8	68.33(24.40)	3.59	0.94 [-0.11, 1.99]
Bolognani 2001 2 c	8	28.33(6.66)	8	26.67(5.55)	3.75	0.26 [-0.73, 1.24]
Bolognani 2001 2 d	8	19.44(5.00)	8	26.67(5.55)	3.44	-1.29 [-2.40, -0.19]
Bolognani 2001 3 a	8	90.59(33.26)	8	129.41(36.60)	3.55	-1.05 [-2.12, 0.02]
Bolognani 2001 3 b	8	83.53(36.60)	8	134.12(60.19)	3.58	-0.96 [-2.01, 0.09]
Challa 1997 1	10	143.10(29.72)	11	186.60(30.18)	3.77	-1.39 [-2.37, -0.42]
Challa 1997 2	10	97.20(34.78)	10	145.30(35.42)	3.74	-1.31 [-2.30, -0.33]
Nakanishi 2003 1	8	103.00(34.00)	8	94.00(35.10)	3.75	0.25 [-0.74, 1.23]
Nakanishi 2003 2	8	53.90(28.20)	8	69.10(31.30)	3.71	-0.48 [-1.48, 0.52]
Ohkawara 2005 1	10	17.90(9.49)	10	24.00(13.28)	3.98	-0.51 [-1.40, 0.39]
Ohkawara 2005 2	10	9.40(4.11)	10	24.00(13.28)	3.70	-1.42 [-2.43, -0.42]
Park 2007	10	69.00(13.00)	10	165.00(73.00)	3.55	-1.75 [-2.82, -0.69]
Rao 1999 1	12	114.00(15.59)	12	161.00(41.57)	3.92	-1.45 [-2.36, -0.53]
Rao 1999 2	12	98.00(24.59)	12	161.00(41.57)	3.78	-1.78 [-2.75, -0.81]
Rowland 1998 1	15	101.38(37.37)	15	130.34(56.08)	4.40	-0.59 [-1.32, 0.14]
Rowland 1998 2	15	33.79(46.75)	15	91.72(56.08)	4.29	-1.09 [-1.87, -0.32]
Total (95% CI)	250		251		100.00	-0.56 [-0.89, -0.22]
Test for heterogeneity: Chi ² = 78.55, df = 26 (P < 0.00001), I ² = 66.9%						
Test for overall effect: Z = 3.29 (P = 0.001)						

Figure 37 : Données brutes et effet standardisé des études incluses dans la méta-analyse pour le critère ACF (Effet standardisé commun calculé en modèle aléatoire)

Study or sub-category	N	Probiotique Mean (SD)	N	Contrôle Mean (SD)	Weight %	SMD (random) 95% CI
Abdelali 1995 1	8	108.50(102.42)	8	159.75(108.57)	10.90	-0.46 [-1.46, 0.54]
Abdelali 1995 2	6	135.67(77.06)	7	146.00(99.23)	9.48	-0.11 [-1.20, 0.98]
Challa 1997 1	10	291.15(66.41)	11	393.40(116.41)	12.22	-1.02 [-1.94, -0.10]
Challa 1997 2	10	202.00(79.06)	10	315.00(101.82)	11.39	-1.19 [-2.16, -0.22]
Ohkawara 2005 1	10	21.90(8.85)	10	30.90(13.60)	12.38	-0.75 [-1.67, 0.16]
Ohkawara 2005 2	10	11.50(5.37)	10	30.90(13.60)	9.72	-1.80 [-2.87, -0.72]
Park 2007	10	139.00(22.00)	10	284.00(126.00)	10.45	-1.54 [-2.56, -0.51]
Rao 1999 1	12	331.00(79.67)	12	476.00(62.35)	10.79	-1.96 [-2.96, -0.95]
Rao 1999 2	12	278.00(194.00)	12	476.00(62.35)	12.67	-1.33 [-2.23, -0.43]
Total (95% CI)	88		90		100.00	-1.13 [-1.51, -0.75]

Test for heterogeneity: $\text{Chi}^2 = 10.71$, $\text{df} = 8$ ($P = 0.22$), $I^2 = 25.3\%$
 Test for overall effect: $Z = 5.82$ ($P < 0.00001$)

Figure 38 : Données brutes et effet standardisé des études incluses dans la méta-analyse pour le critère ACF (Effet standardisé commun calculé en modèle aléatoire)

Annexe 5

Graphiques additionnels

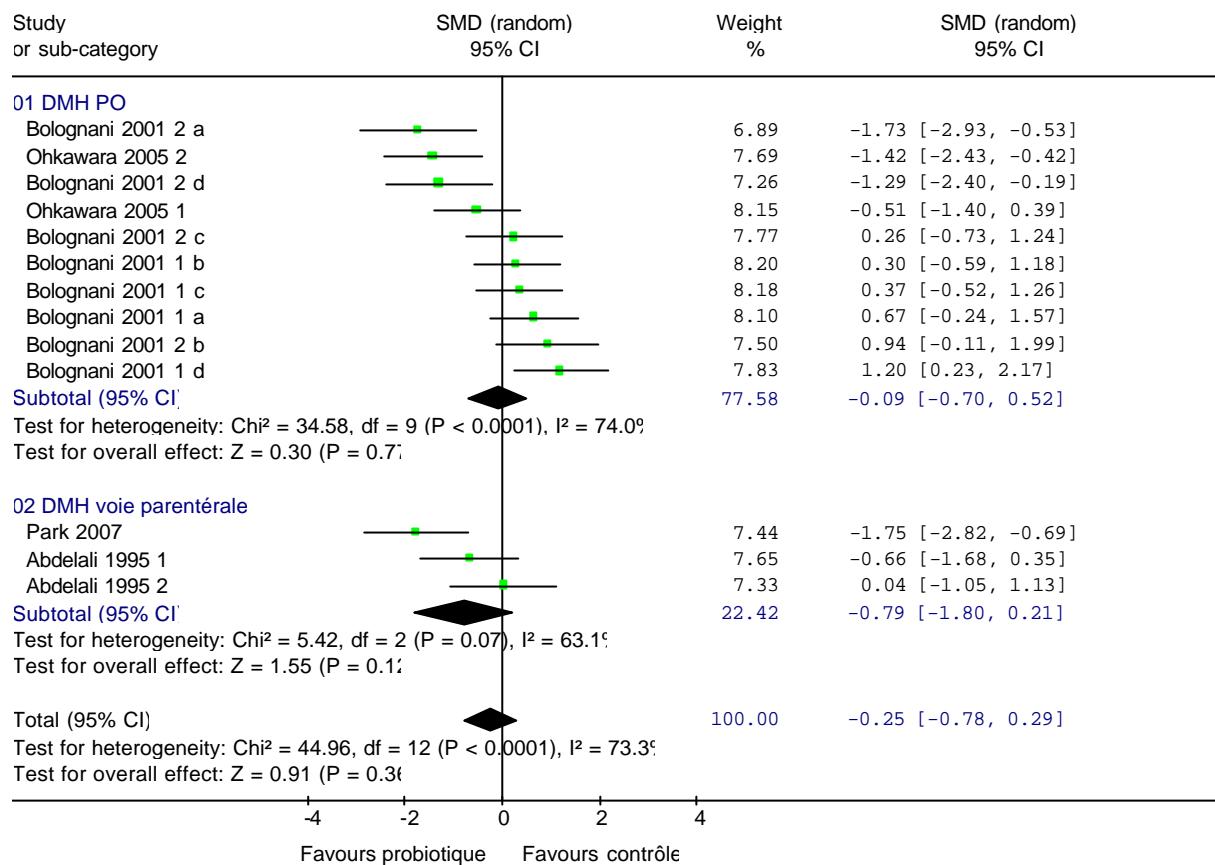


Figure 39 : Méta-analyse pour le critère ACF, modèle aléatoire, DMH en fonction de la voie d'administration

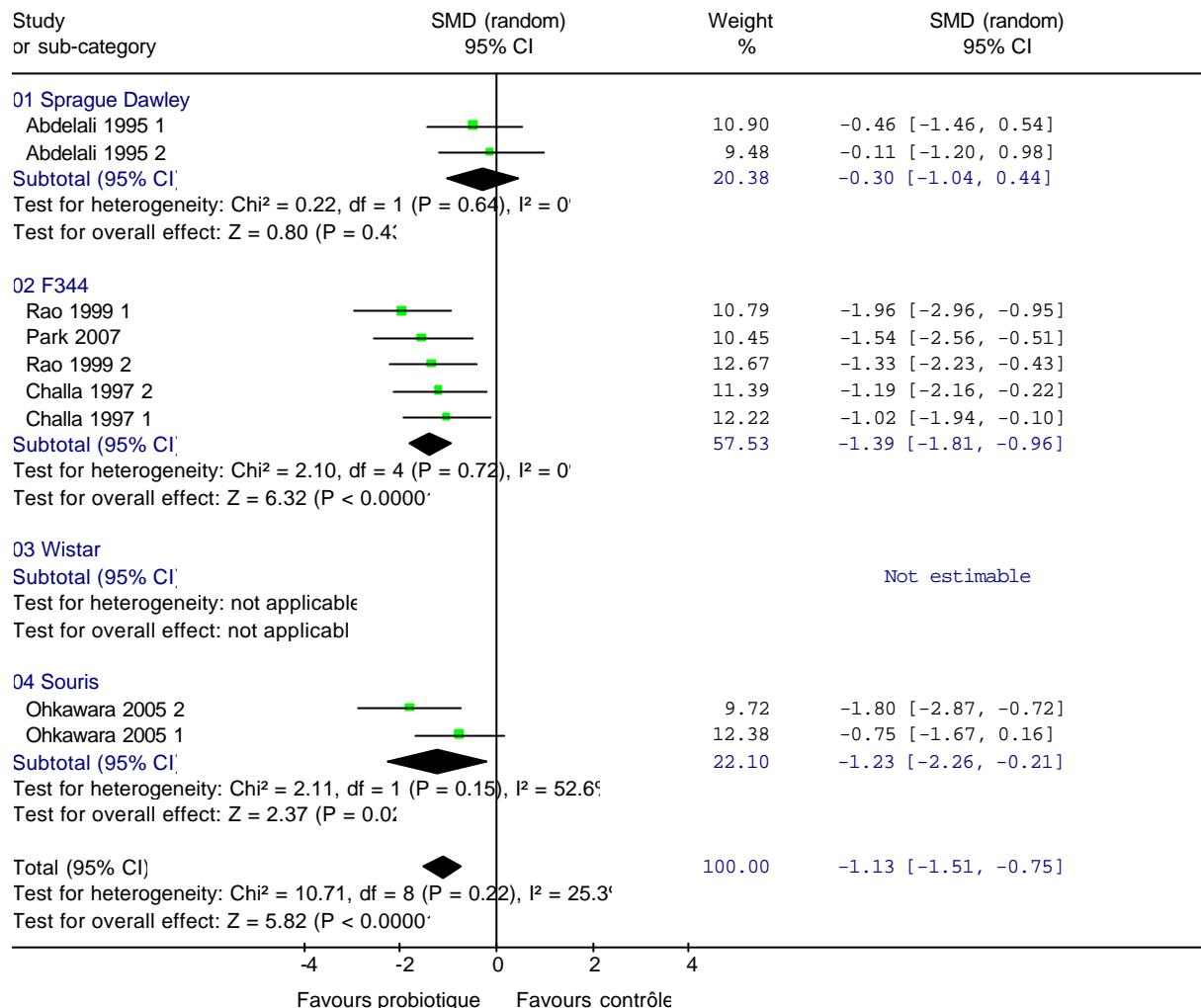


Figure 40 : Forest plot pour le critère AC, modèle aléatoire, en fonction de l'espèce et de la lignée utilisée

Toulouse, 2008

NOM : TREDEZ

Prénom : Marion

TITRE :

Méta-analyse des effets protecteurs des probiotiques sur la cancérogenèse colorectale chez les rongeurs.

RESUME :

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants ajoutés aux aliments et favorables à la santé de l'hôte : ils seraient protecteurs contre le cancer colorectal. Associés à des glucides non digestibles, on les appelle synbiotiques. Cependant, les résultats des études *in vivo* chez les rongeurs sont parfois discordants. Après des rappels bibliographiques sur le côlon sain, le cancer colorectal, et les probiotiques, nous avons réalisé plusieurs méta-analyses. Résultats : les probiotiques protègent significativement les rongeurs contre la cancérogenèse colorectale chimio-induite. Pour l'incidence des tumeurs, le risque relatif est égal à 0,79 avec un intervalle de confiance à 95% (IC) de [0,70 ; 0,91]. Pour les foyers de cryptes aberrantes (ACF), l'effet standardisé (ES) est égal à -0,56 ; IC = [-0,89 ; -0,22]. Cet effet varie en fonction de la voie d'administration du carcinogène, et de la lignée des rats. Les synbiotiques sont plus protecteurs encore : ES = -1,12 et IC = [-1,89 ; -0,35]. L'effet protecteur des probiotiques, dont l'innocuité est reconnue, nous semble justifier leur utilisation dans des essais cliniques chez l'Homme.

MOTS-CLES :

Prévention, cancer, probiotiques, bactéries lactiques, synbiotiques, méta-analyse

ENGLISH TITLE :

Meta-analysis of the protective effects of probiotics on colorectal carcinogenesis in rodents.

ABSTRACT :

Probiotics are live microorganisms which exert health benefits beyond those of inherent basic nutrition. When associated with non-digestible carbohydrates, they are called synbiotics. Amongst other benefits, they are thought to protect against colorectal cancer. However, there are discrepancies between results of *in vivo* rodent studies. After a brief review of healthy colon physiology, colorectal cancer, and probiotics, we present the results of a number of meta-analyses. Results: Probiotics are significantly protective against chemically-induced colorectal cancer in rodents. The relative risk for tumour incidence is 0.79, with a 95% confidence interval (95CI) of [0.70; 0.91]. For the endpoint aberrant crypt focus (ACF), the standardized means difference (SMD) is -0.56 (95CI [-0.89; -0.22]). This effect depends on the route of administration of the carcinogen, and on the rodent strain. Synbiotics are even more protective: SMD is -1.12 (95CI [-1.89; -0.35]). The protective effect of probiotics and their Generally Recognized as Safe status support their testing in human clinical trials.

KEYWORDS :

Chemoprevention, cancer, probiotics, lactic acid bacteria, synbiotics, meta-analysis.