

# Traitements non antibiotiques des entérocolites infectieuses

MODULE 1

Yoram BOUHNİK

Hépatogastroentérologie, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, 75475 Paris Cedex 10.

## TABLE DES MATIÈRES

### CARACTÉRISTIQUES DE LA FLORE BACTÉRIENNE COLIQUE

#### PROBIOTIQUES

- Composition
- Effets antibactériens et immunogéniques des probiotiques
- Mécanismes d'action
- Effets des probiotiques chez l'homme

### TRAITEMENTS NON ANTIBIOTIQUES DES RECHUTES DE LA DIARRHÉE ASSOCIÉE A *C. DIFFICILE*

#### TOLÉRANCE

#### CONCLUSION

## CONTENTS

### Non-antibiotic treatments for infectious enterocolitis

#### CHARACTERISTICS OF INTESTINAL FLORA

##### PROBIOTICS

- Composition
- Antibacterial and immunogenic effects
- Mechanisms of action
- Results in human
  - Prevention and treatment of infectious diarrhoea
  - Prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhoea

#### NON ANTIBIOTIC TREATMENT FOR RELAPSE OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTIONS

##### TOLERANCE

##### CONCLUSION

L'utilisation de moyens non antibiotiques, et principalement de laits fermentés, donc de micro-organismes ingérés vivants, pour traiter les maladies intestinales remonte à l'antiquité. En 1907, Metchnikoff proposait la première explication scientifique sur les effets bénéfiques des yaourts : l'acide lactique produit par les lactobacilles inhibait la croissance de certaines bactéries potentiellement pathogènes [1]. La mise au point et le développement des antibiotiques ont, pendant des décennies, conduit à reléguer au second plan ces « petits moyens », mais les effets délétères des antibiotiques, notamment le risque de sélection de mutants résistants, avec les dangers qu'ils représentent pour la société, ont donné un second souffle à ces traitements plus « écologiques » [2]. De nombreux médicaments probiotiques ont été développés dans les années 1950-1960 ; néanmoins, les difficultés initiales de fabrication d'un produit de qualité microbiologique stable, l'incertitude sur la capacité de tels micro-organismes à survivre à leur passage dans l'estomac et l'absence de données rigoureuses sur l'efficacité clinique de beaucoup de produits ont conduit à leur disparition progressive. L'essor récent du concept d'aliments fonctionnels a fortement relancé l'intérêt porté aux probiotiques [3]. De nombreux produits alimentaires contenant des probiotiques ont ainsi récemment été développés, pour beaucoup utilisant des souches bactériennes d'origine humaine [4]. Les larges possibilités de choix de micro-organismes en fonction de leurs propriétés intrinsèques et la possibilité de manipulations génétiques permettent même d'envisager un important développement futur [5].

#### ABRÉVIATIONS

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>C. difficile</i>	: <i>Clostridium difficile</i>
<i>L.</i>	: <i>Lactobacillus</i>
<i>S.</i>	: <i>Saccharomyces</i>

Dans cette mise au point, nous résumerons les connaissances sur ces micro-organismes, dénommés probiotiques ou agents biothérapeutiques, et reverrons les différentes possibilités thérapeutiques non antibiotiques de la situation la plus caractéristique des complications intestinales liées à l'antibiothérapie, à savoir l'entérocolite à *Clostridium difficile* (*C. difficile*).

## Caractéristiques de la flore bactérienne colique

La flore bactérienne colique de l'homme réalise un écosystème extrêmement complexe, susceptible d'interférer avec l'hôte dans un sens bénéfique ou néfaste. Le côlon de l'homme, initialement stérile, est colonisé en quelques heures après la naissance. La maturation de la flore est complètement acquise dès l'âge de 1 ou 2 ans, et la composition reste alors globalement stable pendant toute la vie de l'individu [6].

Dans cet écosystème dense et complexe, les communautés bactériennes cohabitent en équilibre avec une majorité généralement non pathogène, la flore dominante, exprimant des activités métaboliques décelables, et une minorité réprimée, contenant des espèces potentiellement pathogènes, la flore sous-dominante [7]. La flore intestinale humaine est composée dans une proportion de 99 % de bactéries anaérobies non sporulées, appartenant principalement aux genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, et *Propionibacterium*. Les mécanismes par lesquels la flore intestinale fournit une résistance à la colonisation par des micro-organismes pathogènes ne sont pas parfaitement connus. De nombreux arguments suggèrent que la flore intestinale normale peut protéger l'homme contre les

infections et que certaines modifications de la flore peuvent accroître le risque d'infections [8]. Le rôle des bactéries lumineales dans la modulation des réponses de l'hôte a été suspecté à partir de données historiques, mais peu d'expériences directes ont été effectuées. Dans une étude récente, il a été montré que lorsque des souris axéniques étaient colonisées par *Bacteroides thetaio-taomicron*, un organisme commensal de la souris et de l'homme, différents gènes intestinaux pouvaient être exprimés. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans différentes fonctions : absorption des nutriments, protection de la barrière muqueuse, métabolisme des xénobiotiques, angiogénèse et maturation cellulaire post-natale. Le but à long terme est de caractériser les régions du génome bactérien qui stimulent et régulent les gènes impliqués dans le fonctionnement de l'intestin [9].

Il a longtemps été considéré qu'il était impossible de modifier significativement cet écosystème, sauf peut-être de façon transitoire lors de l'administration d'antibiotiques, puis l'introduction récente des probiotiques et des prébiotiques est venue bouleverser ce dogme [10, 11].

## Probiotiques

### Composition

Les probiotiques sont des micro-organismes ingérés vivants capables d'exercer des effets bénéfiques sur l'hôte par action sur l'écosystème intestinal [10]. Il s'agit le plus souvent de bactéries ou de levures présentes soit dans des aliments, notamment les produits laitiers fermentés, soit dans des médicaments et volontiers alors sous forme lyophilisée. Les micro-organismes tués par la chaleur ne répondent pas à la définition des probiotiques, même si certains effets thérapeutiques leur ont été attribués [12]. Les genres bactériens les plus utilisés sont *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium* et *Saccharomyces*. Le nombre de micro-organismes vivants présents dans chaque produit est souvent très élevé. A titre d'exemple, un yaourt doit contenir par définition, en France, au moins  $10^7$  *L. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* vivants par gramme de produit à la date de péremption. Ces organismes restent vivants pendant leur conservation et survivent au passage à travers le tractus gastro-intestinal. Ils sont cependant rapidement éliminés de l'organisme après arrêt de leur administration, et ne sont donc susceptibles d'exercer un effet physiologique que pendant leur transit intestinal [13].

Les conditions requises pour un candidat probiotique sont les suivantes : a) être non pathogène, non toxique, en particulier chez les sujets immunodéprimés ou fragiles ; b) contenir un nombre important de cellules viables ; c) avoir un taux de survie élevé dans le tractus gastro-intestinal, c'est à dire résister à l'attaque par le suc gastrique et biliaire, les sécrétions intestinales et le système immunitaire intestinal ; d) exercer un effet bénéfique sur l'hôte ; e) rester viable pendant le stockage et l'utilisation ; f) avoir de bonnes propriétés gustatives [11].

Plus récemment a été introduit le concept des prébiotiques, qui sont des ingrédients alimentaires de nature oligosaccharidique, non digérés dans l'intestin grêle de l'homme et fermentés dans le côlon, exerçant un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de bactéries appartenant naturellement à la flore, principalement les bactéries lactiques, bifidobactéries et lactobacilles [11]. Cette propriété est observée avec de nombreux substrats, dont les plus étudiés sont le lactulose [14], les fructo-oligosaccharides [15] et les transgalacto-oligosaccharides [16]. La majorité de ces subs-

trats n'est pas fermentescible in vitro par des bactéries potentiellement pathogènes, telles *Escherichia coli* (*E. coli*) ou *Clostridium perfringens*. Leur utilisation est plus simple que celle des probiotiques, puisqu'ils ne posent ni les problèmes de survie dans le tractus gastro-intestinal, ni ceux liés au stockage et à la conservation d'un produit frais. En revanche, à la différence des probiotiques qui concernent généralement une ou quelques souche(s) bactérienne(s) bien caractérisée(s), les prébiotiques stimulent vraisemblablement la croissance globale d'un genre bactérien, comportant parfois plusieurs dizaines ou centaines d'espèces et de souches bactériennes, dont les propriétés peuvent sensiblement différer entre elles. Une possibilité optimale de modifier la flore est d'utiliser les synbiotiques : le probiotique est administré en association à un substrat qui lui est spécifique (le prébiotique) pour la croissance (par exemple fructo-oligosaccharide ou lactulose et *Bifidobacterium* spp.). Cette combinaison est supposée améliorer la survie du probiotique, puisque le substrat qui lui est spécifique est disponible pendant la traversée gastro-intestinale [11].

### Effets antibactériens et immunogéniques des probiotiques

L'étude des modèles animaux a apporté la preuve que certaines bactéries probiotiques pouvaient inhiber la croissance de bactéries pathogènes telles *Salmonella typhimurium*, *C. difficile*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* et *Shigella* sp. [17, 18]. Il a été récemment démontré que les bifidobactéries de la flore intestinale de l'enfant exerçaient une activité antimicrobienne, suggérant qu'elles participaient à l'effet barrière de la flore intestinale [8]. Une protection contre l'infection par *E. coli* pathogène a été démontrée chez les cochons par l'ingestion de souches non pathogènes d'*E. coli* qui agissent par compétition en occupant les sites d'adhésion [19]. De façon similaire, les hamsters traités par clindamycine peuvent être protégés de la survenue d'infections par des souches toxigéniques de *C. difficile* grâce à une colonisation préalable par des souches de *C. difficile* non toxigènes [20]. Chez le rat, la résistance à l'infection par *Salmonella enteritidis* est augmentée par l'administration orale de lactulose ou de phosphate de calcium [21]. L'ingestion de lactulose entraîne une augmentation des lactobacilles et des bifidobactéries ainsi que des modifications des activités enzymatiques, des acides gras à chaînes courtes et du pH fécaux dans un sens présumé « bénéfique » pour l'hôte [22, 23].

De nombreuses études réalisées chez l'animal ont montré que l'administration orale de divers probiotiques pouvait moduler certains composants de la barrière immunitaire au niveau muqueux et systémique [24]. Certains travaux ont montré que l'ingestion chez l'homme de fortes quantités de bactéries du yaourt augmentait la capacité des lymphocytes du sang circulant à sécréter diverses cytokines, notamment l'interféron gamma. Les conséquences cliniques de cet effet biologique sont cependant inconnues. Les tentatives de démonstration de diminution d'infections ou de l'augmentation de l'efficacité de vaccins oraux sous l'effet du yaourt ont jusqu'ici échoué [24]. Isolauri et al. [25] ont montré que l'administration de *L. rhamnosus* GG entraînait une augmentation de l'immunité non spécifique reflétée par une augmentation des cellules circulantes capables de sécréter des immunoglobulines. Au moment de la convalescence, 90 % des nourrissons du groupe recevant le probiotique contre seulement 46 % des enfants recevant le placebo avaient développé une réponse en anticorps spécifique IgA contre les rotavirus. Les mêmes auteurs ont rapporté que l'immunogénicité d'un vaccin oral antirotavirus pouvait être augmentée par l'administration simultanée de *L. rhamnosus* GG [26]. Dans une étude, des souriceaux nouveaux-nés étaient mieux protégés contre une infection à rotavirus si leur mère allaitante recevait une immunisation orale contre le rotavirus associée à un probiotique

(*Bifidobacterium breve* YIT 4064) que si la mère recevait le vaccin oral de manière isolée [27]. Une équipe a rapporté que l'administration orale chez l'homme de *Lactobacillus johnsonii* souche LA1 sous la forme d'un produit laitier fermenté était responsable d'une stimulation du pouvoir phagocytaire des granulocytes du sang circulant [28] et d'une augmentation discrète des IgA plasmatiques chez des sujets sains [28, 29]. L'efficacité médiocre de la vaccination orale étant largement attribuée à une dégradation des structures antigéniques dans l'intestin et à l'absence d'adjuvants appropriés, plusieurs équipes travaillent actuellement sur l'utilisation de probiotiques génétiquement modifiés, permettant de les utiliser comme vecteurs chargés d'antigènes, aux propriétés adjuvantes et aux propriétés intrinsèques immunogènes faibles [30].

*Saccharomyces (S.) cerevisiae* est une levure non-sporulée comportant de nombreuses sous-espèces dont plusieurs sont commercialisées en boulangerie pour la fabrication du pain. *S. boulardii* représente probablement une sous espèce de *S. cerevisiae* ; elle a été la mieux étudiée in vitro et in vivo. Quand *S. boulardii* est administrée à des volontaires sains, le taux de récupération fécale de ce micro-organisme est inférieur à 1 % [31, 32] et aucune modification quantitative des populations bactériennes fécales n'est observée [32]. L'administration de ce micro-organisme stimule les médiateurs de l'inflammation [33], qui reflètent probablement une réponse non spécifique aux antigènes. Cependant, le fait que ces médiateurs exercent un rôle dans la défense contre les autres agents pathogènes n'est pas prouvé. *S. boulardii* sécrète une protéase sérique de 120 kDa qui réduit la stimulation de l'AMP cyclique induite par la toxine cholérique sur les anses intestinales de souris [34] et une protéase sérique de 54 kDa qui interfère avec la toxine A de *C. difficile* [35]. Il est possible que les effets bénéfiques de ce micro-organisme soient médiés par ces protéines.

## Mécanismes d'action

L'équilibre de l'écosystème bactérien colique est principalement assuré par des interactions entre la flore et le système immunitaire intestinal muqueux, bien que d'autres facteurs tels le mucus, le péristaltisme, le renouvellement cellulaire épithélial, l'acidité du milieu et l'environnement enzymatique y participent également. La flore indigène affecte l'immunité intestinale muqueuse et systémique de l'hôte, mais les bactéries exogènes (probiotiques) ont aussi cette propriété [24]. Ainsi, *L. acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* réduisent l'infiltrat inflammatoire colique chez les sujets âgés sans affecter le nombre de lymphocytes B et T [36] ; *Lactobacillus GG* améliore cliniquement l'allergie chez les enfants et réduit l'excrétion fécale de l'alpha-1 antitrypsine et du TNF $\alpha$  [37] ; *Lactobacillus* spp et *Bifidobacterium* spp entraînent une augmentation de la production d'IFN $\gamma$  lymphocytaire [36]. Cependant, cet effet semble étroitement dépendre des souches bactériennes utilisées plus que de l'espèce ou du genre bactérien. Ainsi, s'il est considéré que les bifidobactéries induisent la formation de quantités importantes d'IgA, un travail in vitro a montré que sur 120 souches testées appartenant à différentes espèces (*Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*), seulement 4 souches induisaient réellement une synthèse significative d'IgA, ce qui était confirmé in vivo [38]. Cette meilleure connaissance des propriétés de certaines souches bactériennes probiotiques n'explique cependant pas les mécanismes d'action de ces agents, qui restent purement hypothétiques à l'heure actuelle (tableau I).

Les effets protecteurs des probiotiques contre les infections intestinales s'expliqueraient par des effets immunomodulateurs, mais aussi par l'inhibition de la croissance de bactéries pathogènes qui serait la conséquence de la modification des équilibres bactériens intra-coliques, de la synthèse de substances antibac-

**Tableau I.** – Mécanismes d'action hypothétiques des probiotiques et/ou des prébiotiques.

*Hypothetical action mechanisms of probiotics.*

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidification colique par stimulation de la croissance des bactéries lactiques</li> <li>• Antagonisme direct sur les agents pathogènes</li> <li>• Compétition pour le transport ou le récepteur des agents pathogènes</li> <li>• Stimulation du système immunitaire intestinal, muqueux et systémique</li> <li>• Compétition pour les nutriments et autres facteurs de croissance disponibles</li> </ul> |
|---|

tériennes et de l'acidification du contenu colique [39]. Un travail récent réalisé sur un modèle animal a démontré que l'administration de *Bifidobacterium infantis* permettait de diminuer significativement l'incidence de l'entérocolite nécrasante néonatale par rapport à un groupe témoin [40]. Après administration orale, *Bifidobacterium* était retrouvé au niveau de la muqueuse intestinale et des selles respectivement dès la 24<sup>e</sup> et la 48<sup>e</sup> heure. Une entérocolite nécrasante néonatale survenait dans 29 % des cas dans le groupe supplémenté en *Bifidobacterium* versus 70 % dans le groupe témoin ( $P < 0,01$ ). De même, un décès survenait dans 33 % des cas dans le groupe *Bifidobacterium* versus 74 % des cas dans le groupe témoin ( $P < 0,01$ ). L'endotoxine plasmatique et l'expression intestinale de la phospholipase A2 étaient plus faibles dans le groupe *Bifidobacterium* par rapport au groupe témoin ( $P < 0,05$ ), suggérant le rôle de la translocation bactérienne et de l'activation de la cascade inflammatoire dans la physiopathologie de l'entérocolite nécrasante néonatale. Cette approche pourrait donc être intéressante chez les enfants prématurés à risque de survenue d'une entérocolite nécrasante néonatale. Un autre travail utilisant un modèle de souris invalidée pour le gène de l'interleukine 10 (IL-10) a montré que l'inflammation intestinale était précédée d'un déséquilibre de la flore bactérienne, et que le reconditionnement de cette flore par l'administration directe de bactéries vivantes (*Lactobacillus* sp.) ou de facteurs sélectifs de croissance des bifidobactéries endogènes (lactulose) protégeait de l'apparition de la colite inflammatoire [41]. Plus précisément, la souris IL10- développe spontanément une colite, avec des lésions histologiques apparaissant à la 4<sup>e</sup> semaine et atteignant un plateau à la 8<sup>e</sup> semaine. En fait, les auteurs ont montré que dès la 2<sup>e</sup> semaine de vie, on observait, par rapport à un groupe témoin, une augmentation de la population de bactéries aérobies adhérentes et une diminution des concentrations de *Lactobacillus*. De plus, l'administration intrarectale de *Lactobacillus* sp. ou l'administration orale de lactulose (facteur de croissance des lactobacilles) permettait de prévenir la survenue de la colite expérimentale. Ceci était attesté par l'examen anatomo-pathologique des côlons prélevés qui montrait une réduction de l'inflammation de 60 % dans les deux groupes chez qui la flore des lactobacilles était restaurée. Le mécanisme exact expliquant l'effet protecteur n'est cependant pas connu.

## Effets des probiotiques chez l'homme

### PRÉVENTION ET TRAITEMENT DES DIARRHÉES INFECTIEUSES

Onze essais contrôlés contre placebo ont évalué l'efficacité des probiotiques dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses (tableau II) [42-51]. Un bénéfice a été observé dans la prévention ou le traitement des diarrhées infectieuses dans 5 essais sur 11 (3 en situation préventive et 2 en situation curative), tous chez l'enfant et testant pour la plupart l'administration de *Lactobacillus GG*.

Cinq essais contrôlés contre placebo évaluant l'efficacité des probiotiques dans la prévention de la diarrhée des voyageurs sont décrits dans le tableau III [52-56]. Une seule étude a montré

**Tableau II.** – Essais contrôlés contre le placebo évaluant l'effet des probiotiques dans la prévention ou le traitement des diarrhées aiguës infectieuses.  
*Double-blind placebo-controlled studies evaluating probiotics in prevention or treatment of acute infectious diarrhoea.*

Auteurs, année [réf.]	Probiotique	Durée de l'étude	Effectif	Population étudiée	Résultats
Chicoine & Joncas 1973 [42]	<i>Streptococcus lactis</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	3 jours	54	Enfants Curatif	NS
Pearce & Hamilton 1974 [43]	<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Variable	94	Enfants Curatif	NS
Clements et al. 1981 [44]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5,5 jours	48	Volontaires adultes Préventif	NS
Wunderlich et al. 1989 [45]	<i>Enterococcus faecium</i>	7 jours	78	Adultes Curatif	NS
Mitra & Rabbani 1990 [46]	<i>Enterococcus faecium</i>	3 jours	183	Adultes Préventif	NS
Isolauri et al. 1991 [25]	<i>Lactobacillus GG</i>	5 jours	71	Enfants Curatif	1,5 versus 2,3 jours P < 0,001
Saavadra et al. 1994 [47]	<i>Bifobacterium bifidum</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i>	Variable	57	Enfants Préventif	P = 0,03
Oberhelman et al. 1999 [48]	<i>Lactobacillus GG</i>	15 mois	204	Infants Préventif	5,2 versus 6,0 épisodes/enfant/an P = 0,2
Guandalini et al. 2000 [49]	<i>Lactobacillus GG</i>	Variable	287	Enfants Curatif	72 ± 35 vs 58 ± 27 P = 0,02
Szajewska et al. 2001 [50]	<i>Lactobacillus GG</i>	Variable	81	Enfants Préventif	6,7 versus 33 % P < 0,05
Hatakka K et al. 2001 [51]	<i>Lactobacillus GG</i>	7 mois	571	Enfant	NS

un bénéfice, probablement favorisé par l'incidence très élevée de la diarrhée dans le groupe placebo [56].

### PRÉVENTION DE LA DIARRHÉE ASSOCIÉE AUX ANTIBIOTIQUES

La cause de la diarrhée associée aux antibiotiques n'est pas claire. Dans 5 à 20 % des cas, elle serait liée à une infection par *C. difficile*. Cette infection peut se traduire cliniquement par une diarrhée simple, une colite non spécifique ou une colite pseudo-membraneuse [57]. L'incidence de la maladie associée à *C. difficile* est évaluée de 5 à 21 % chez les malades hospitalisés [57-59]. Jusqu'à un tiers des diarrhées dues à *C. difficile* apparaissent après administration intermittente d'antibiotique. La majorité des récurrences de l'infection à *C. difficile* apparaît dans les 2 semaines qui suivent le début du traitement [60], mais d'autres peuvent apparaître jusqu'à 2 mois après son arrêt [61].

Neuf essais contrôlés contre placebo évaluant l'efficacité des probiotiques dans la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques sont groupés dans le tableau IV [45, 62-69]. Un effet significatif a été observé dans 5 études sur 9. La majorité de ces études peuvent être critiquées en raison d'une méthodologie imparfaite, de l'inclusion de malades consommant plus d'un antibiotique, de l'absence de recherche des causes infectieuses de la diarrhée ou de l'absence de suivi des malades après arrêt des traitements antibiotiques. Dans une étude, *S. boulardii* était administré pendant la durée du traitement antibiotique et jusqu'à 2 semaines après son arrêt [65]. Sur les 318 malades inclus, seulement 180 étaient évaluables. Une réduction de l'incidence de la diarrhée a été observée dans le groupe recevant *S. boulardii*, mais il n'était pas précisé si la diarrhée était apparue alors que les malades prenaient les antibiotiques ou pendant le

**Tableau III.** – Essais contrôlés contre le placebo évaluant l'effet des probiotiques dans la prévention ou le traitement de la diarrhée des voyageurs.  
*Double-blind placebo-controlled studies evaluating probiotics in prevention of traveler's diarrhoea.*

Auteurs, année [réf.]	Probiotiques utilisés	Durée de l'étude	Effectif	Population étudiée	Résultats
Pozo-Olano et al. 1978 [52]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	8 jours	50	Touristes	NS
Black et al. 1989 [53]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i> + <i>Bifidobacterium bifidum</i> + <i>Streptococcus Thermophilus</i>	14 jours	94	Touristes	(71 % vs 43 %) P = 0,02
Oksanen et al. 1990 [54]	<i>Lactobacillus GG</i>	7-14 jours	756	Touristes	NS
Kollaritsch et al. 1993 [55]	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Variable	3 000	Touristes	NS
Katellaris et al. 1995 [56]	<i>Lactobacillus fermentum</i> + <i>Lactobacillus acidophilus</i>	21 jours	282	Militaires	NS

**Tableau IV.** – Essais contrôlés contre le placebo évaluant l'effet des probiotiques dans la prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques.  
*Double-blind placebo-controlled studies evaluating probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea.*

Auteurs, année [réf.]	Probiotique	Durée de l'étude	Effectif	Population étudiée	Résultats
Adam et al. 1977 [62]	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Variable	388	Patients ambulatoires Divers antibiotiques	17,5 versus 4,5 % P < 0,001
Gotz et al. 1979 [63]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5 jours	79	Patients hospitalisés Ampicilline	NS
Colombel et al. 1987 [64]	<i>Bifidobacterium longum</i>	3 jours	10	Volontaires sains Erythromycine	P < 0,05
Wunderlich et al. 1989 [45]	<i>Enterococcus Faecium</i> strain SF68	7 jours	45	Divers antibiotiques	NS
Surawicz et al. 1989 [65]	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Variable	180	Patients hospitalisés Divers antibiotiques	9 % versus 22 % P = 0,03
Tankanow et al. 1990 [66]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10 jours	38	Enfants Amoxicilline	NS
McFarland et al. 1995 [67]	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Variable	193	Antibiotiques à large spectre	7,7 % versus 14,5 % P = 0,03
Lewis et al. 1998 [68]	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Variable	69	Antibiotiques à large spectre	NS
Vanderhoof et al. 1999 [69]	<i>Lactobacillus GG</i>	Variable	188	Enfants Divers antibiotiques	2 % versus 26 % P < 0,05

suivi. En utilisant des critères plus stricts, la même équipe a étudié des malades recevant des antibiotiques à large spectre de type  $\beta$ -lactames ou céphalosporines [67]. Les malades étaient suivis jusqu'à 7 semaines après l'arrêt des antibiotiques. Sur les 193 malades inclus, 129 ont terminé l'étude. Globalement, la prescription de *S. boulardii* entraînait une réduction significative de la diarrhée associée aux antibiotiques.

## Traitements non antibiotiques des rechutes de la diarrhée associée à *C. difficile*

*C. difficile* exprime 2 toxines A et B. L'expression de l'effet biologique de la toxine A nécessite la fixation de la toxine sur un récepteur membranaire. L'absence de ce récepteur chez les enfants peut expliquer leur résistance à la maladie à *C. difficile* [70]. Bien qu'une antibiothérapie par vancomycine ou métronidazole soit efficace dans près de 80 % des cas, une rechute est observée dans près de 20 % des cas [71-73]. Celle-ci apparaît surtout si le malade prend à nouveau un traitement antibiotique [57]. Deux mécanismes peuvent expliquer les rechutes des infections à *C. difficile* : a) la réinfection (exogène), qui peut apparaître après éradication initiale si le sujet est exposé à un environnement contaminé [74], les spores de *Clostridium* pouvant persister plusieurs mois dans l'environnement ; b) la récurrence (endogène), due à la persistance de spores de *C. difficile* dans le côlon malgré l'administration de traitements antibiotiques. Ceci est logique, car les spores résistent aux antibiotiques.

Les traitements proposés pour prévenir ou traiter les rechutes de diarrhée associée à *C. difficile* ne manquent pas d'originalité. La première approche consiste à administrer des bactéries probiotiques pour restaurer l'équilibre bactérien intracolique : a) administration de *Lactobacillus GG* [75-77] ; b) administration de *Saccharomyces boulardii* [78, 79] ; c) lavements de selles ou de mélanges bactériens [80-82], voire instillation in situ en coloscopie de suspension de selles [83].

Presque toutes les études évaluant l'administration de bactéries probiotiques sur le traitement et la prévention des rechutes de l'infection à *C. difficile* ont été des essais ouverts incluant un petit

nombre de malades. Après administration pendant plusieurs jours de *Lactobacillus GG*, Gorbach et al. n'ont pas observé de rechutes chez 4 malades sur 5, avec un suivi minimum de deux mois [76]. Après administration unique de *Lactobacillus GG*, Bennett et al. n'ont pas observé de rechutes chez 84 % des 32 malades atteints d'une forme récidivante d'infection à *C. difficile* avec un suivi de 1 à 4 ans [75]. Dans une étude prospective, randomisée contre placebo, en cours, les résultats préliminaires font état d'une diminution du taux de récurrence des infections à *C. difficile* à 3 semaines, et d'une diminution plus rapide des symptômes digestifs (douleurs abdominales, diarrhée) [77].

L'administration de *S. boulardii* en association à des antibiotiques standards, pendant 4 semaines, complétée d'un suivi de 4 semaines supplémentaires, a montré les faits suivants : a) lorsqu'il s'agissait du premier épisode de diarrhée associé à *C. difficile* (64 malades), *S. boulardii* n'apportait pas de bénéfice significatif ; b) lorsqu'il s'agissait d'une récurrence de diarrhée associée à *C. difficile* (60 malades), *S. boulardii* entraînait une diminution significative du risque de nouvelle récurrence (35 % versus 65 %, P = 0,04). *S. boulardii* ne réduisait pas le taux de colonisation par *C. difficile*, mais réduisait la détection de sa toxine B. Ceci est en accord avec le concept que les protéases libérées par *S. Boulardii* inhibent la toxine, mais n'éradiquent pas le germe [79].

Les tentatives de reconstitution de la flore colique des malades atteints d'infection récidivante à *C. difficile* par l'administration de lavements de selles [80, 81] ou d'infusions rectales de mélanges de bactéries anaérobies provenant de volontaires sains [82], ont donné des résultats intéressants. L'administration d'une solution comportant des concentrations élevées de plusieurs bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) a permis l'éradication de *C. difficile* chez 5 malades [82]. Soixante dix % des 20 malades traités par un mélange de bactéries fécales sous forme de lavements ou par sonde de nutrition entérale étaient améliorés après 1 à 12 jours de traitement. Cependant, aucun essai contrôlé contre placebo n'a été publié à ce jour et les malades sont généralement réticents à ces formes de traitement. Afin de traiter l'ensemble des lésions lorsqu'elles sont pancoliques et peut-être contourner ces réticen-

ces, il a été proposé d'administrer les lavements de selles directement par le coloscope [83].

La seconde approche originale pour le traitement des infections récidivantes à *C. difficile* est l'immunothérapie passive qui consiste à administrer des immunoglobulines par voie intraveineuse. Compte-tenu du fait que le spectre clinique des infections à *C. difficile* va du portage sain aux colites mortelles, l'une des hypothèses est que l'immunité à médiation humorale (générale et locale à IgA) en soit le principal déterminant. Des travaux expérimentaux chez l'animal ont montré qu'une immunisation passive (anticorps) et active (toxine A) était efficace [84]. Chez l'homme, on peut observer une augmentation des anticorps anti-*C. difficile* après une infection aiguë. En revanche, les taux d'anticorps sont bas au cours des infections récidivantes, aussi bien chez l'enfant [85] que chez l'adulte [86]. Plus récemment, une étude prospective a analysé les caractéristiques de l'infection à *C. difficile* chez les malades hospitalisés recevant des antibiotiques [87]. Sur une population de 271 malades, 37 (14 %) étaient colonisés par *C. difficile* au moment de l'admission, 18 étaient porteurs asymptomatiques. Parmi les 47 malades (17 %) contaminés durant l'hospitalisation, 19 étaient asymptomatiques. Après colonisation, les auteurs notaient une association entre l'augmentation des taux d'IgG dirigés contre la toxine A et le portage asymptomatique de *C. difficile*. La même équipe a également démontré que lors d'un épisode initial de diarrhée associée à *C. difficile*, la détection d'anticorps sériques dirigés contre la toxine A était associée à un moindre risque de récurrence [88]. Avant que ces résultats ne soient connus, des techniques d'immunisation passive avaient été proposées dans les formes sévères de colite associée à *C. difficile* [87]. Salcedo et al. ont traité deux malades atteints de forme réfractaire de colique pseudo-membraneuse à *C. difficile* ; ces derniers ont reçu des perfusions d'immunoglobuline humaine (200-300 mg/kg) et ont tous deux répondu rapidement avec une disparition de la diarrhée et des signes digestifs [89]. Etant donné qu'il s'agit de cas relativement anecdotiques, ces traitements ne doivent être envisagés qu'en ultime recours. L'immunothérapie passive, mais également active (par vaccination) pourrait ainsi être une piste prometteuse [90].

## Tolérance

Les lactobacilles peuvent entraîner des maladies chez l'homme, notamment caries dentaires, méningites, abcès pulmonaires, septicémie et endocardite [91]. Cependant, en dépit de leur présence ubiquitaire dans notre tractus intestinal et la large consommation de produits laitiers, les infections par lactobacilles sont rarissimes et ne sont observées que chez les sujets immunodéprimés [92].

La dissémination de *S. cerevisiae* du tractus gastro-intestinal à l'ensemble de l'organisme a également été rapportée principalement chez des sujets immunodéprimés [93-95], mais également exceptionnellement chez des sujets immunocompétents [96]. Aucune réaction d'intolérance n'a été rapportée avec les lavements de bactéries sélectionnées ou de selles.

## Conclusion

L'originalité et le caractère séduisant du concept des probiotiques ne font pas de doute et favorisent une communication excessive. Néanmoins, à l'empirisme complet qui a prévalu les premières années, est venue se substituer une méthodologie scientifique rigoureuse pour la réalisation d'essais cliniques et le choix plus rationnel des agents administrés. Les effets probiotiques démontrés chez l'homme sont principalement l'utilisation de

*S. boulardii* pour prévenir la diarrhée due aux antibiotiques, l'utilisation de *S. boulardii* pour prévenir la récurrence des infections sévères à *C. difficile* et l'utilisation de laits fermentés contenant *L. rhamnosus* souche GG ou *Bifidobacterium* pour raccourcir la durée de la diarrhée lors des gastroentérites aiguës à rotavirus chez le nourrisson.

Différentes perspectives commencent à émerger pour l'utilisation future des traitements non antibiotiques : a) la recherche d'effets non pas intestinaux ou digestifs, mais généraux. Ainsi, dans un essai contrôlé récent contre placebo portant sur 571 enfants âgés de 1 à 6 ans vivants en crèche et suivis 7 mois, l'administration d'un lait supplémenté en *Lactobacillus GG* entraînait une diminution de 17 % et 19 % respectivement de la fréquence des infections respiratoires et de la consommation d'antibiotiques par rapport à un lait traditionnel [51] ; b) l'utilisation de probiotiques génétiquement modifiés [97]. Ainsi, une équipe a récemment mis au point une souche mutante de *Lactobacillus lactis*, capable de produire de l'IL10 possédant toutes les activités biologiques spécifiques de l'IL10 native. Cette souche a démontré une efficacité remarquable dans le traitement curatif et préventif de colites expérimentales chez l'animal.

## RÉFÉRENCES

1. Metchnikoff E. The prolongation of life. New York : GP Putnam & Sons, 1907.
2. Wanke CA. Do probiotics prevent childhood illnesses ? BMJ 2001;322:1318-9.
3. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Gut 1998;42:2-7.
4. Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y, Rambaud JC. Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. World Rev Nutr Diet 1993;74:1-21.
5. Shanahan F. Immunology. Therapeutic manipulation of gut flora. Science 2000;289:1311-2.
6. Drasar BS, Hill MJ. Human intestinal flora. London : Academic Press, 1974.
7. Ducluzeau R. Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In : Bergogne-Bérézin E, ed. Microbial ecology and intestinal infections. Paris : Springer-Verlag, 1989:7-26.
8. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut 2000;47:646-52.
9. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science 2001;291:881-4.
10. Fuller R. Probiotics in human medicine. Gut 1991;32:439-42.
11. Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am J Clin Nutr 1999;69:S1052-7.
12. Bouloche J, Mouterde O, Mallet E. Traitement des diarrhées aiguës chez le nourrisson et le jeune enfant - Étude contrôlée de l'activité antidiarrhéique de *L. acidophilus* tués (souche LB) contre un placebo et un médicament de référence (lopéramide). Ann Pédiatr 1994;41:1-7.
13. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, Arlet G, Goderel I, Rambaud JC. Fecal recovery in man of viable Bifidobacterium sp ingested in a fermented milk. Gastroenterology 1992;102:875-8.
14. Bouhnik Y, Riottot M, Telotte A, Attar A, Dyard F, Flourié B. Lactulose ingestion increases fecal bifidobacterial counts. A randomized double blind study in healthy humans (abstract). Gut 1999;45:A288.
15. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P et al. Short chain fructo-oligosaccharides administration dose-dependantly increases fecal bifidobacteria in healthy humans. J Nutr 1999;129:113-6.

16. Bouhnik Y, Flourié B, d'Agay-Abensour L, Pochart P, Gramet G, Durand M et al. Administration of Transgalacto-oligosaccharides increases faecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutr* 1997;127:444-8.
17. Silva AM, Bambirra EA, Oliveira AL, Souza PP, Gomes DA, Vieira EC et al. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol* 1999;86:331-6.
18. Hudault S, Lievin V, Bernet-Camard MF, Servin AL. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:513-8.
19. Davidson JN, Hirsh DC. Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infect Immun* 1976;13:1773-4.
20. Borriello SP, Barclay FE. Protection of hamsters against *Clostridium difficile* ileocaecitis by prior colonisation with non-pathogenic strains. *J Med Microbiol* 1985;19:339-50.
21. Bovee-Oudenhoven IM, Termont DS, Heidt PJ, Van der Meer R. Increasing the intestinal resistance of rats to the invasive pathogen *Salmonella enteritidis* : additive effects of dietary lactulose and calcium. *Gut* 1997;40:497-504.
22. Ballongue J, Schumann C, Quignon P. Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;222:41-4.
23. Salminen S, Salminen E. Lactulose, lactic acid bacteria, intestinal microecology and mucosal protection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;222:45-8.
24. Mc Craken VJ, Gaskins RH. Probiotics and the immune system. In : Tannock GH, ed. *Probiotics : a critical review*. Wymondham, UK : Horizon Scientific Press, 1999:85-112.
25. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus GG*) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991;88:90-7.
26. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei GG*. *Vaccine* 1995;13:310-2.
27. Yasui H, Kiyoshima J, Ushijima H. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea of mouse pups born to and nursed by dams fed *Bifidobacterium breve* YIT 4064. *J Infect Dis* 1995;172:403-9.
28. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immune-modulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995;78:491-7.
29. Marteau P, Vaerman JP, Dehenin JP, Bord S, Brassart D, Pochart P et al. Effect of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus acidophilus* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroenterol Clin Biol* 1997;21:293-8.
30. Wells JM, Robinson K, Chamberlain LM, Schotfield KM, Le Page RWF. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996;70:317-30.
31. Blehaut H, Massot J, Elmer GW, Levy RH. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos* 1989;10:353-64.
32. Klein SM, Elmer GW, McFarland LV, Surawicz CM, Levy RH. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharm Res* 1993;10:1615-9.
33. Caetano JA, Parames MT, Babo MJ, Santos A, Ferreira AB, Freitas AA Coelho MR, Mateus Amet al. Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:245-59.
34. Czerucka D, Roux I, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* 1994;106:65-72.
35. Castagliuolo I, LaMont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 1996;64:5225-32.
36. De Simone C, Ciardi A, Grassi A, Lambert Gardini S, Tzantzoglu S, Trinchieri V et al. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992;14:331-40.
37. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics : a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:179-85.
38. Yasui H, Nagaoka N, Mike A, Hayakawa K, Ohwaki M. Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA. *Microb Ecol Health Dis* 1992;5:155-62.
39. MacFarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics : can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health ? *Brit Med J* 1999;78:999-1003.
40. Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 1999;117:577-83.
41. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107-14.
42. Chicoine L, Joncas JH. Use of lactic enzymes in non-bacterial gastroenteritis. *Union Med Can* 1973;102:1114-5.
43. Pearce JL, Hamilton JR. Controlled trial of orally administered lactobacilli in acute infantile diarrhea. *J Pediatr* 1974;84:261-2.
44. Clements ML, Levine MM, Black RE, Robins-Browne RM, Cisneros LA, Drusano GL et al. *Lactobacillus* prophylaxis for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;20:104-8.
45. Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, D'Apuzzo V, Heim F, Karly M et al. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus SF68* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J Int Med Res* 1989;17:333-8.
46. Mitra AK, Rabbani GH. A double-blind, controlled trial of bioflorin (*Streptococcus faecium* SF68) in adults with acute diarrhea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 1990;99:1149-52.
47. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-9.
48. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L et al. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999;134:15-20.
49. Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H et al. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea : a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:54-60.
50. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikolajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001;138:361-5.
51. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres : double blind, randomised trial. *BMJ* 2001;322:1327-30.
52. de Dios Pozo-Olano J, Warram JH Jr, Gomez RG, Cavazos MG. Effect of a lactobacilli preparation on traveler's diarrhea. A randomized, double blind clinical trial. *Gastroenterology* 1978;74:829-30.
53. Black FT, Anderson PL, Orskov J, Gaarslev K, Laulund S. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler's diarrhea. *Travel Med* 1989;7:333-5.
54. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hamalainen P, Ihanntola-Vormisto A, Muurasiemi-Isoviita L, et al. Prevention of travelers' diarrhoea by *Lactobacillus GG*. *Ann Med* 1990;22:53-6.
55. Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, Wiedermann G. Prevention of traveler's diarrhea with *Saccharomyces boulardii*. Results of a placebo controlled double-blind study. *Fortschr Med* 1993;111:152-6.

56. Katelaris PH, Salam I, Farthing MJ. Lactobacilli to prevent traveler's diarrhea ? *N Engl J Med* 1995;333:1360-1.
57. Fekety R, Shah AB. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA* 1993;269:71-5.
58. Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients : evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis* 1992;166:561-7.
59. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989;320:204-10.
60. Fekety R, McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Mulligan ME. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhea : characteristics of and risk factors for patients enrolled in a prospective, randomized, double-blinded trial. *Clin Infect Dis* 1997;24:324-33.
61. Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT Jr, Gerding DN. Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15:371-81.
62. Adam J, Barret A, Barret-Bellet C. Essais cliniques contrôlés en double insu de l'ultralevure lyophilisée. *Gaz Med Fr* 1977;84:2072-8.
63. Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. *Am J Hosp Pharm* 1979;36:754-7.
64. Colombel JF, Cortot A, Neut C, Romond C. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet* 1987;2:43.
65. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, van Belle G. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* : a prospective study. *Gastroenterology* 1989;96:981-8.
66. Tankanow RM, Ross MB, Ertel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF. A double-blind, placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP* 1990;24:382-4.
67. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA et al. Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995;90:439-48.
68. Lewis SJ, Potts LF, Barry RE. The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-related diarrhoea in elderly patients. *J Infect* 1998;36:171-4.
69. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 1999;135:564-8.
70. Stark PL, Lee A, Parsonage BD. Colonization of the large bowel by *Clostridium difficile* in healthy infants : quantitative study. *Infect Immun* 1982;35:895-9.
71. Fekety R, Silva J, Kauffman C, Buggy B, Deery HG. Treatment of antibiotic-associated *Clostridium difficile* colitis with oral vancomycin : comparison of two dosage regimens. *Am J Med* 1989;86:15-9.
72. Bartlett JG, Tedesco FJ, Shull S, Lowe B, Chang T. Symptomatic relapse after oral vancomycin therapy of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1980;78:431-4.
73. Walters BA, Roberts R, Stafford R, Seneviratne E. Relapse of antibiotic associated colitis : endogenous persistence of *Clostridium difficile* during vancomycin therapy. *Gut* 1983;24:206-12.
74. Johnson S, Adelman A, Clabots CR, Peterson LR, Gerding DN. Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. *J Infect Dis* 1989;159:340-3.
75. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with Lactobacillus GG. *Lancet* 1987;2:1519.
76. Bennett RG, Gorbach SL ?, Goldin BR. Treatment of relapsing *Clostridium difficile* diarrhea with Lactobacillus GG. *Nutrition Today* 1996;31(suppl) : 35S-8S.
77. Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000;95 : S11-3.
78. Surawicz CM, McFarland LV, Elmer G, Chinn J. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. *Am J Gastroenterol* 1989;84:1285-7.
79. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA et al. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 1994;271:1913-8.
80. Bowden TA Jr, Mansberger AR Jr, Lykins LE. Pseudomembranous enterocolitis : mechanism for restoring floral homeostasis. *Am Surg* 1981;47:178-83.
81. Schwan A, Sjolín S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand J Infect Dis* 1984;16:211-5.
82. Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet* 1989;1:1156-60.
83. Persky SE, Brandt LJ. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3283-5.
84. Kelly CP. Immune response to *Clostridium difficile* infection. *Eur J Gastroenterol* 1996;8:1048-53.
85. Leung DY, Kelly CP, Boguniewicz M, Pothoulakis C, LaMont JT, Flores A. Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr* 1991;118:633-7.
86. Warny M, Fatimi A, Bostwick EF, Laine DC, Lebel F, LaMont JT et al. Bovine immunoglobulin concentrate-*Clostridium difficile* retains C difficile toxin neutralising activity after passage through the human stomach and small intestine. *Gut* 1999;44:212-7.
87. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 2000;342:390-7.
88. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357:189-93.
89. Salcedo J, Keates S, Pothoulakis C, Warny M, Castagliuolo I, LaMont JT et al. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut* 1997;41:366-70.
90. Kyne L, Kelly C. Prospects for a vaccine for *Clostridium difficile*. *BioDrugs* 1998;10:173-81.
91. Harty DW, Oakey HJ, Patrikakis M, Hume EB, Knox KW. Pathogenic potential of lactobacilli. *Int J Food Microbiol* 1994;24:179-89.
92. Eschete ML, West BC. *Saccharomyces cerevisiae* septicemia. *Arch Intern Med* 1980;140:1539.
93. Aucott JN, Fayen J, Grossnicklas H, Morrissey A, Lederman MM, Salata RA. Invasive infection with *Saccharomyces cerevisiae* : report of three cases and review. *Rev Infect Dis* 1990;12:406-11.
94. Cesaro S, Chinello P, Rossi L, Zanesco L. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. *Support Care Cancer* 2000;8:504-5.
95. Bassetti S, Frei R, Zimmerli W. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. *Am J Med* 1998;105:71-2.
96. Rijnders BJ, Van Wijngaerden E, Verwaest C, Peetermans WE. *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. *Intensive Care Med* 2000;26:825.
97. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynek S, Obermeier F, Falk W et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-5.