



**HAL**  
open science

# La malabsorption du lactose : Etude des modulations du microbiote intestinal et de l'adaptation de l'hôte malabsorbeur. Evaluation d'un nouveau marqueur diagnostique

Virginie Alexandre

## ► To cite this version:

Virginie Alexandre. La malabsorption du lactose : Etude des modulations du microbiote intestinal et de l'adaptation de l'hôte malabsorbeur. Evaluation d'un nouveau marqueur diagnostique. Médecine humaine et pathologie. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0081 . tel-03612077

**HAL Id: tel-03612077**

**<https://pastel.hal.science/tel-03612077>**

Submitted on 17 Mar 2022

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

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

**Doctorat AgroParisTech**

**T H È S E**

**pour obtenir le grade de docteur délivré par  
L'Institut des Sciences et Industries  
du Vivant et de l'Environnement  
Spécialité : Physiologie de la Nutrition**

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Virginie ALEXANDRE**

le 12 Décembre 2012

**LA MALABSORPTION DU LACTOSE :**

**Etude des modulations du microbiote intestinal et de l'adaptation de l'hôte malabsorbeur  
Evaluation d'un nouveau marqueur diagnostique**

Directeur de thèse : **Daniel TOME**

Co-encadrement de la thèse : **Anne-Marie DAVILA**

**Jury**

**M Daniel TOME**, Pr, UMR 914/ AgroParisTech, Paris  
**Mme Nathalie KAPEL**, Pr, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris  
**Mme Sylvie RABOT**, Dr, INRA-MICALIS, Paris  
**Mme Claire BERTIN**, Dr, VIVATECH, Paris  
**M Philippe DUCROTTE**, Pr, CHU Charles Nicolle, Rouen  
**Mme Anne-Marie DAVILA**, Dr, UMR 914/ AgroParisTech, Paris

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur

**UMR 914/ AgroParisTech**

Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire  
16 rue Claude Bernard, 75005 PARIS

## Remerciements

---

*Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Unité Mixte de Recherche 914 / AgroParisTech de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, à Paris, sous la direction de Daniel Tomé et d'Anne-Marie Davila, dans le cadre d'une bourse Cifre en partenariat avec la société Vivatech.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Daniel Tomé et Robert Benamouzig pour m'avoir accueillie respectivement dans leur laboratoire et leur centre d'investigation clinique pour mes études animales et cliniques.*

*Je remercie vivement Nathalie Kapel, Sylvie Rabot, Claire Bertin et Philippe Ducrotté d'avoir accepté d'être les rapporteurs et examinateurs de ce travail. Merci également à Anne-Marie Davila, François Blachier, Christine Lamberto et Lionel Rigottier pour leurs nombreux conseils lors des comités de thèse.*

*J'adresse mes sincères remerciements à la société Vivatech pour sa participation active à la création de cette thèse, pour son financement et pour sa confiance. Je remercie en premier lieu Claire Bertin, pour son précieux soutien, le partage de ses expériences et son suivi durant ces trois années. Je remercie également Guillaume Olive, sans qui ce projet n'aurait eu lieu.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Anne-Marie Davila qui m'a accompagnée, conseillée et aidée durant ces trois années, tout en respectant mon autonomie. Je la remercie vivement pour son soutien, notamment durant cette dernière année où les craintes et incertitudes se sont faites fréquentes. Je remercie également Catherine Chaumontet, Christiane Larue et Patrick Even pour leur disponibilité lors des démonstrations de techniques spécifiques.*

*Merci à Corine, Sandra et Angélique pour leur aide lors des expériences animales, ainsi qu'à Marie-Claude et Philippe lors des études cliniques.*

*Je remercie également l'ensemble des personnes de l'Unité, son personnel, ses thésards, ses post-docs et ses stagiaires avec qui les discussions formelles comme informelles ont permis*

*d'adoucir le quotidien. Mes pensées vont tout spécialement à mes co-bureaux, Anne-Sophie, Caroline, Emilien, Marion, Olga, Rojo et Xin Xin pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire ou ailleurs.*

*Enfin, je termine en remerciant chaleureusement mes parents, Kemal et tous mes proches pour leur présence et leurs encouragements durant ces trois années.*

# Sommaire

---

|  |           |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS .....  | 1         |
| SOMMAIRE.....  | 3         |
| CONTRIBUTEURS ET FINANCEMENTS .....  | 5         |
| PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....  | 6         |
| LISTE DES FIGURES.....   | 8         |
| LISTE DES TABLEAUX.....  | 10        |
| LISTE DES ABBREVIATIONS .....  | 11        |
| RESUMES .....  | 13        |
| <br>   |           |
| INTRODUCTION GENERALE .....  | 15        |
| <br>   |           |
| REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....  | 17        |
| <b>I. Données générales sur l'intolérance au lactose .....</b>   | <b>17</b> |
| I. 1. LE LACTOSE ET LA LACTASE .....   | 17        |
| I. 2. ETIOLOGIE DE L'INTOLERANCE AU LACTOSE .....  | 20        |
| I. 3. SEMIOLOGIE.....  | 23        |
| I. 4. PREVALENCE .....   | 25        |
| I. 5. PATHOLOGIES RESULTANT DE LA MALABSORPTION DU LACTOSE.....  | 27        |
| I. 6. TRAITEMENTS.....   | 29        |
| <b>II. Métabolisme du lactose chez l'individu absorbeur et malabsorbeur, le rôle du microbiote intestinal.....</b>           | <b>32</b> |
| II. 1. METABOLISME DU LACTOSE CHEZ L'INDIVIDU ABSORBEUR.....   | 32        |
| II. 2. METABOLISME DU LACTOSE CHEZ L'INDIVIDU MALABSORBEUR .....   | 33        |
| <b>III. Conséquences de l'ingestion aigue et chronique de lactose chez les malabsorbeurs .....</b>                           | <b>43</b> |
| III. 1. CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES MALABSORBEURS.....  | 43        |
| III. 2. EFFETS D'UNE INGESTION AIGUE DE LACTOSE, CHEZ LE MALABSORBEUR .....  | 45        |
| III. 3. EFFETS D'UNE INGESTION CHRONIQUE DE LACTOSE ET MISE EN PLACE DES MECANISMES D'ADAPTATION, CHEZ LE MALABSORBEUR ..... | 48        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>IV. Méthodes de diagnostic de l'intolérance au lactose.....</b>   | <b>53</b>  |
| IV. 1. LES METHODES DETECTANT L'HYPOLACTASIE .....   | 53         |
| IV. 2. LES METHODES DETECTANT LA MALABSORPTION .....   | 54         |
| IV. 3. LES METHODES DETECTANT L'INTOLERANCE .....  | 57         |
| <b>V. Objectifs et stratégie expérimentale .....</b>   | <b>59</b>  |
| V. 1. OBJECTIFS .....  | 59         |
| V. 2. STRATEGIE EXPERIMENTALE .....  | 60         |
| <br>   |            |
| <b>TRAVAUX DE RECHERCHE .....</b>  | <b>63</b>  |
| <b>I. Publication 1: Lactose malabsorption and colonic fermentations alter host<br/>metabolism in rats.....</b>  | <b>63</b>  |
| <b>II. Publication 2: Agreement between indirect calorimetry and traditional tests of<br/>lactose malabsorption.....</b>                                 | <b>72</b>  |
| <b>III. Publication 3: Intestinal microbiota modulation and physiological consequences<br/>on the host, during a chronic lactose malabsorption .....</b> | <b>88</b>  |
| <b>IV. Publication 4: L'intolérance au lactose en 2011 (article de revue).....</b>   | <b>118</b> |
| <b>V. Discussion, conclusions et perspectives .....</b>  | <b>124</b> |
| V. 1. DISCUSSION GENERALE .....  | 124        |
| V. 2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....  | 128        |
| <br>   |            |
| <b>RÉFÉRENCES .....</b>  | <b>130</b> |

## Contributeurs et financements

---

### Les deux études animales ont été réalisées à :

L'UMR 914/AgroParisTech

16 rue Claude Bernard

75005 Paris, France

Sous la responsabilité du Pr Daniel Tomé et du Dr Anne-Marie Davila

### L'étude clinique a été réalisée à :

L'Hôpital Avicenne,

Centre de Recherche sur Volontaires – Département de Gastroentérologie

125 Bd de Stalingrad

93000 Bobigny, France

Sous la responsabilité du Pr Robert Benamouzig

### Financement :

Cette thèse a fait l'objet d'un contrat Cifre entre l'UMR914/ AgroParisTech et la société Vivatech. L'intégralité des recherches, animales comme cliniques, a été financée par Vivatech.

### Autres :

Dans le cadre des 25 % en entreprise requis par le contrat Cifre, une étude clinique a été également réalisée dans le Centre de Recherche sur Volontaires de l'Hôpital Avicenne, sous la responsabilité du Pr Robert Benamouzig. Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité et la tolérance d'un complément alimentaire à base de plantes, de levures et de bactéries lactiques sur la fréquence des selles, chez 100 sujets se plaignant de paresse intestinale.

## **Publications et communications**

---

### **REVUES SCIENTIFIQUES**

**Virginie Alexandre**, Patrick C. Even, Christiane Larue-Achagiotis, Jean-Marc Blouin, François Blachier, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. Lactose malabsorption and colonic fermentations alter host metabolism in rats. *British Journal of Nutrition*. In press.

**Virginie Alexandre**, Yolanda Sanz, Antoine Martin, Annaïg Lan, Robert Benamouzig, François Blachier, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. Intestinal microbiota modulation and physiological consequences on the host, during a chronic lactose malabsorption. En cours de revision par *Journal of Nutrition*.

**Virginie Alexandre**, Anne-Marie Davila, Michel Bouchoucha, Claire Bertin, Patrick Even, Christine Lamberto, Daniel Tomé, Robert Benamouzig. Agreement between indirect calorimetry and traditional tests of lactose malabsorption. En cours de revision par *Digestive and Liver Disease*.

### **REVUE PROFESSIONNELLE**

**Virginie Alexandre**, Anne-Marie Davila, Michel Bouchoucha, Guillaume Cadiot, Robert Benamouzig. L'intolérance au lactose en 2011. *Journal d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive*. Vol 18, Numéro 6, Novembre-Décembre 2011.

### **COMMUNICATIONS ORALES**

**Virginie Alexandre**, Sarah Bock, Patrick Even, Christiane Larue-Achagiotis, François Blachier, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. *Lactose malabsorption and metabolism in rats: Role of the short chain fatty acids?* 11<sup>e</sup> Conférences Européennes de Nutrition (FENS, Federation of European Nutrition Societies), 27-29 octobre 2011, Madrid, Espagne.

**Virginie Alexandre**, Anne-Marie Davila, Michel Bouchoucha, Patrick Even, Daniel Tomé, Robert Benamouzig. *Indirect calorimetry: a new tool to diagnose lactose malabsorption*. 33<sup>e</sup> congrès GFHGNP (Groupe Francophone d'Hépatologie, Gastroentérologie et Nutrition Pédiatrique), 29-31 mars 2012, Nantes, France.

## **COMMUNICATIONS AFFICHEES**

**Virginie Alexandre**, Claire Bertin, François Blachier, Daniel Tomé, Patrick Even, Anne-Marie Davila. *La malabsorption du lactose peut être mesurée par les échanges respiratoires. Quels mécanismes sous-jacents ?* Journées Francophones de Nutrition, 6-8 décembre 2010, Lille, France.

**Virginie Alexandre**, Patrick Even, François Blachier, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. *Lactose malabsorption can be detected by indirect calorimetry in rats.* Recent Advances and Controversies in the Measurement of Energy Metabolism (*RACMEM*), 2-4 novembre 2011, Maastricht, Hollande.

**Virginie Alexandre**, Zoé Julien, Annaïg Lan, François Blachier, Robert Benamouzig, Yolanda Sanz, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. *Exposition chronique au lactose : adaptation de l'hôte malabsorbeur et du microbiote intestinal.* Journées Francophones de Nutrition, Lyon, 12-14 décembre 2012, France.

**Virginie Alexandre**, Annaïg Lan, François Blachier, Robert Benamouzig, Yolanda Sanz, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. *Exposition chronique au lactose : modulation du microbiote intestinal, conséquences physiologiques et métaboliques sur l'hôte malabsorbeur.* Abstract soumis aux Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive, 21-24 mars 2013, Paris, France.

## Liste des figures

---

**Figure 1** : Structure du lactose

**Figure 2** : Hydrolyse du lactose par la lactase

**Figure 3** : Structure tridimensionnelle de la lactase

**Figure 4** : Localisation du gène LCT sur le chromosome 2

**Figure 5** : Localisation des ARNm de la LPH dans les entérocytes humains, selon l'axe crypte-villosité (A) et cellulaire (B)

**Figure 6** : Expression de la LPH corrélée à celle de GATA-4 dans le jéjunum et l'iléum mais pas dans le duodénum ni dans les cryptes

**Figure 7** : Baisses corrélées des taux d'activité spécifique (A), de synthèse protéique (B) et de transcription (C) de la lactase, chez des rats sevrés et des rats adultes

**Figure 8** : Environnement génétique du gène LCT

**Figure 9** : Ratios des activités lactase/sucrase (L/S ratio) en fonction du génotype

**Figure 10** : Fréquence de malabsorbeurs selon le nombre de symptômes ressentis (A), Scores des symptômes chez les sujets positifs et négatifs au test respiratoire à l'hydrogène (B)

**Figure 11** : Prévalence et dispersion présumée de l'hypolactasie en Europe

**Figure 12** : Quantité d'hydrogène expiré (A) et ballonnements ressentis (B) en fonction de la quantité de lactase ingérée simultanément à du lactose

**Figure 13** : Absorption du glucose et du galactose au niveau des entérocytes

**Figure 14** : Métabolisme du glucose et du galactose dans la cellule eucaryote

**Figure 15** : Arbre phylogénétique des bactéries du microbiote intestinal

**Figure 16** : Evolution de la composition du microbiote le long du tube digestif

**Figure 17** : Chaîne trophique de fermentation du microbiote intestinal

**Figure 18** : Conversion homoacétogène du glucose en acétate

**Figure 19** : Schéma de la méthanogénèse à partir de l'hydrogène et du dioxyde de carbone (A), de l'acétate (B) et du méthanol (C)

**Figure 20** : Evolution spatiale de l'environnement colique

**Figure 21** : Production *in vitro* d'acétate (A), de propionate (B), de butyrate (C), de D-lactate (D) et de L-lactate (E) par le microbiote fécal

**Figure 22** : Les différents mécanismes d'absorption colique des AGCC

**Figure 23** : Facteurs impliqués dans la malabsorption et l'intolérance au lactose

**Figure 24** : Temps de transit oro-caecaux (OCTT) chez des malabsorbeurs et des absorbeurs du lactose, après ingestion de lactose et de glucose

**Figure 25** : Suivi de l'intensité des symptômes (A) et de la motilité colique (B) après ingestion de lactulose ou ingestion de saccharose + infusion colique de lactulose

**Figure 26** : Quantités d'hydrogène expiré (A) sur 8 heures et activité beta-galactosidase fécale (B), après 10 jours consécutifs de régime contenant 0.7 g/ kg pc de D-glucose ou de lactose par des malabsorbeurs

**Figure 27** : Corrélations négatives entre le nombre de bactéries totales contenues dans les selles et le score des symptômes d'intolérance

**Figure 28** : Issue des différents tests de diagnostic de la malabsorption du lactose, dans le cas d'une absorption (A) et d'une malabsorption (B)

**Figure 29** : Schéma bilan

## Liste des tableaux

---

**Tableau 1** : Propriétés fonctionnelles du lactose

**Tableau 2** : Doses de lactose dans les principales denrées alimentaires

**Tableau 3** : Principaux symptômes gastro-intestinaux de l'intolérance au lactose

**Tableau 4** : Prévalence de l'hypolactasie primaire selon l'origine ethnique

**Tableau 5** : Critères de Rome III

**Tableau 6** : Teneur en lactose de différents laits animaux

**Tableau 7** : Principales bactéries fermentaires coliques et leurs métabolites (par ordre décroissant)

## Liste des abréviations

---

A : Adénine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGCC (SCFA) : Acides gras à chaînes courtes (Short chain fatty acids)

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BSR : Bactéries sulfato-réductrices

C : Cytosine

CH<sub>4</sub> : Méthane

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

CRP : Protéine réactive C (C reactive protein)

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

FISH : Fluorescence in situ hybridization

Gox (Cox) : Taux d'oxydation des glucides

G : Guanine

GLUT : Transporteurs du glucose (Glucose transporters)

H<sub>2</sub> : Dihydrogène

HBT : Test respiratoire à l'hydrogène (Hydrogen breath test)

HNF : Facteur nucléaire hépatocytaire (Hepatocyte nuclear factor)

IL : Interleukine

K<sub>m</sub> : Constante de Michaelis

LCT : gène LaCTase

Lox : Taux d'oxydation des lipides

LPH : Lactase phlorizin hydrolase

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MPO : Myeloperoxydase

P : Phosphate

QR (RQ) : Quotient respiratoire (Respiratory Quotient)

SII : Syndrome de l'intestin irritable

T : Thymine

TNF : Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)

UDP : Uridine diphosphate

## Résumés

---

### Résumé:

La prise en charge de l'intolérance au lactose est souvent jugée non satisfaisante par les professionnels de santé qui évoquent en particulier le manque de fiabilité des tests de diagnostic et le manque de connaissances précises sur les mécanismes de déclenchement des symptômes d'intolérance.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail était d'améliorer la prise en charge de l'intolérance au lactose par : i. la proposition d'un nouveau **marqueur détectant la malabsorption du lactose** suite à une ingestion aigue, et ii. l'étude *in-vivo* de la **modulation (en termes de composition et d'activité) du microbiote intestinal** et de la physiologie de l'hôte suite à une ingestion aigue ou chronique de lactose

Les études animales et cliniques réalisées dans ce travail ont montré l'utilité de la calorimétrie indirecte, notamment de la mesure du **Quotient Respiratoire (QR)**, comme technique non invasive détectant la malabsorption du lactose. Les études menées chez le rat ont permis de souligner la **modulation du microbiote intestinal** et l'**adaptation de l'hôte malabsorbeur**, après l'ingestion de lactose. Une ingestion aigue se traduit par une augmentation des **concentrations coliques en AGCC** et en lactate, ainsi que par leur **absorption**. Les AGCC sont ensuite utilisés comme substrat énergétique par l'hôte. L'ingestion chronique (6 jours) de lactose se traduit également par une augmentation des concentrations coliques en AGCC et en lactate. Toutefois, l'évolution de la composition du microbiote intestinal laisse supposer un meilleur recyclage des métabolites du lactose. Simultanément, une amélioration des critères d'inflammation de la muqueuse colique a été mise en évidence.

En conclusion, la calorimétrie indirecte semble utilisable comme outil diagnostique de la malabsorption du lactose, seule ou combinée aux tests indirects existants. Par ailleurs, la stimulation de réabsorption colique des AGCC et la modulation de la composition et de l'activité du microbiote intestinal sont des pistes intéressantes pour améliorer la tolérance au lactose sur le long terme.

Mots clé: diagnostic de la malabsorption du lactose, quotient respiratoire, concentrations coliques en AGCC et absorption, modulation du microbiote intestinal, adaptation de l'hôte.

## **Abstract:**

According to health care professionals, lactose intolerance is poorly managed because of a lack of reliability of the diagnostic tools and an insufficient knowledge of the mechanisms triggering the intolerance symptoms.

The general purpose of this work is to improve the care of lactose intolerance with: i. the evaluation of a **new diagnostic marker of lactose malabsorption** after an acute ingestion, ii. the *in vivo* study of **intestinal microbiota modulations** (in terms of composition and activity) and of the host's physiology after both acute and chronic ingestions of lactose.

The animal and clinical studies presented in this work revealed the purpose of indirect calorimetry, especially of the **Respiratory Quotient (RQ)**, as a non invasive technique to detect lactose malabsorption. The animal studies, performed on rats, underlined the modulation of the intestinal microbiota and the adaptation of the malabsorber host, after lactose ingestion. Acute lactose ingestion leads to a rise of the **colonic concentrations in SCFA** and lactate, and to their **absorption**. The SCFA are then used as energetic substrates by the host. Chronic lactose ingestion (6 days) also leads to a rise of the colonic concentrations in SCFA and lactate. However, the modification of the intestinal microbiota composition suggests an enhanced turn-over of the lactose metabolites. Concomitantly, a reduction of the inflammatory parameters of the colonic mucosa was underlined.

To conclude, indirect calorimetry is a useful technique to detect lactose malabsorption and could be combined with other techniques for an optimised diagnostic. Besides, the enhancement of the SCFA absorption and the modulation of the intestinal microbiota (both composition and activity) may be successful alternatives to optimise the tolerance.

Keywords: diagnostic of lactose malabsorption, respiratory quotient, SCFA colonic concentration and absorption, intestinal microbiota modulation, host adaptation.

## Introduction générale

---

Très étudiée dans les années 1970, l'intolérance au lactose se traduit par des troubles intestinaux dont la prévalence et les symptômes sont relativement bien décrits mais dont le diagnostic et la prise en charge restent peu codifiés. Les professionnels de santé s'accordent à dire que la malabsorption du lactose est très peu dépistée et que les outils diagnostiques disponibles présentent des limites de spécificité. Ces problèmes conduisent à une prise en charge peu adaptée et plutôt en lien avec le syndrome de l'intestin irritable. On considère aujourd'hui que 75 % de la population mondiale (30 % dans les pays européens) présente une hypolactasie et qu'environ la moitié de cette population hypolactasique présente des symptômes associée à la malabsorption du lactose, communément appelés « intolérance au lactose ». Par ailleurs, on observe une réelle demande de la part des consommateurs et une évolution de l'industrie agro-alimentaire avec la mise sur le marché de nouvelles gammes de produits « pauvre en lactose », voire « sans lactose », ainsi que de compléments alimentaires enrichis en lactase issue de micro-organismes. Les mentions « pauvre en lactose » et « sans lactose » sont règlementées depuis 2010 par une directive européenne fixant les seuils de lactose respectivement à 1 g de lactose/ 100 g et 10 mg de lactose/ 100 g de produit (Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia, EFSA, 2010).

Malgré les nombreux travaux ayant porté sur l'intolérance au lactose depuis les années 1970 et malgré le développement de denrées alimentaires alternatives et de quelques complémentations enzymatiques, la prise en charge de ce trouble intestinal reste peu spécifique. L'hétérogénéité des terminologies utilisées (hypolactasie, malabsorption, maldigestion, intolérance), le manque de reconnaissance de la part de la communauté médicale, et les limites des méthodes diagnostiques disponibles (manque de praticité, de faisabilité et de fiabilité) en sont les principales causes.

L'enjeu de cette thèse est de proposer et d'explorer de nouvelles stratégies pour améliorer la prise en charge globale de l'intolérance au lactose, à la fois d'un point de vue diagnostic (plus de fiabilité) et d'un point de vue traitement (mieux adapté). Outre les travaux de recherche, une démarche de communication auprès des professionnels de santé semble indispensable afin de les sensibiliser à la prise en compte de ce trouble intestinal dans leur démarche diagnostique.

Pour répondre à ces objectifs, ces travaux de recherche ont été menés en deux phases distinctes. La première phase visait à proposer un nouveau marqueur, fiable et objectif, de la malabsorption du lactose évalué sur un modèle animal (rats) puis validé chez l'homme par un modèle clinique. L'utilisation d'un nouveau marqueur de la malabsorption est pertinente puisque le contexte actuel souligne le manque de sensibilité et de spécificité des tests diagnostiques disponibles. La deuxième phase, également réalisée sur le modèle rat, visait à étudier la modulation du microbiote intestinal et l'adaptation de l'hôte malabsorbeur afin de faire émerger des stratégies de traitement de l'intolérance qui ne soient pas basées sur l'éviction du lactose mais plutôt sur la manipulation du microbiote intestinal.

Ce mémoire de thèse se compose d'une revue bibliographique, d'une présentation des travaux de recherche, et d'une discussion générale concluant sur les perspectives des résultats obtenus.

La revue bibliographique débute par un état des lieux des connaissances sur la malabsorption et l'intolérance au lactose. Elle se poursuit par la présentation des différences de métabolisme du lactose entre les individus absorbateurs et malabsorbateurs, puis aborde les conséquences d'une ingestion aiguë et chronique de lactose, chez des individus malabsorbateurs. Elle se termine par la présentation des principes, avantages et limites des différents tests diagnostiques.

La démarche expérimentale, détaillée dans la partie relative aux travaux de recherche, est constituée de trois études. La première étude, menée sur le rat, a étudié les conséquences d'une ingestion aiguë de lactose sur l'activité du microbiote intestinal et sur les paramètres métaboliques (QR, Gox, Lox). La deuxième étude, menée sur l'Homme, a évalué l'intérêt du suivi du QR pour détecter la malabsorption du lactose. La troisième étude, menée sur le rat, a étudié les conséquences d'une ingestion prolongée de lactose sur le microbiote intestinal (composition et activité) et la physiologie de l'hôte.

# Revue bibliographique

---

## **I. Données générales sur l'intolérance au lactose**

### **I. 1. LE LACTOSE ET LA LACTASE**

L'intolérance au lactose est un trouble décrit depuis l'Antiquité : Hippocrate (460-370 avant JC) et Galien (129-200) avaient déjà observé que certaines personnes souffraient de troubles gastro-intestinaux après l'ingestion de lait (Harrington *et al.*, 2008). Dans les années 1960, l'exposition au lactose a augmenté du fait de son adjonction croissante dans les préparations alimentaires. Les avancées technologiques d'après-guerre ont en effet mis en évidence les nombreuses propriétés fonctionnelles du lactose comme son effet sur la fixation des arômes, la cristallisation, la gélification, l'émulsion et la coloration des produits.

#### **I. 1.1. Le lactose**

##### Structure

Le lactose est un disaccharide associant beta-D-galactose et beta-D-glucose, reliés entre eux par une liaison osidique en  $\beta$  1→4. Le carbone 1 du galactose étant porteur d'une fonction réductrice (hémi-acétylique), le lactose est considéré comme un sucre réducteur (**Figure 1**).

##### Propriétés

Le lactose (étymologiquement « sucre du lait ») est produit par les glandes mammaires des mammifères : sa teneur est d'environ 60 g/ L dans le lait humain, 50 g/ L dans le lait de vache et 40 g/ L dans les laits de chèvre, de brebis et de chamelle. Ces derniers laits, aux faibles teneurs en lactose, sont très plébiscités par les intolérants.

Le lactose présente un pouvoir sucrant de 0.16, c'est-à-dire que sa saveur sucrée est de 16 %, comparée à celle du glucose qui est de 30 % et à celle du saccharose qui est de 100 %.

Le lactosérum (petit lait), obtenu après séparation des matières grasses et précipitation de la caséine, contient 70 % à 75 % de lactose (poids sec).

##### Utilisation dans l'industrie

Le développement des moyens technologiques d'après-guerre a permis de préciser les propriétés fonctionnelles du lactose qui sont à l'origine de son incorporation dans de nombreux produits issus des industries agro-alimentaire et pharmaceutique (**Tableau 1**)

(Barbut *et al.*, 1989 : Cayot *et al.*, 2003). Les principales denrées alimentaires contenant du lactose sont les laits, les glaces, les crèmes desserts, et les charcuteries (**Tableau 2**).

### I. 1.2. La lactase

L'absorption intestinale du lactose requiert l'intervention préalable de l'enzyme lactase, également appelée Lactase Phlorizin Hydrolase (LPH) ou LCT lorsqu'elle est d'origine endogène ou beta-galactosidase lorsqu'elle est d'origine bactérienne.

La lactase endogène est une disaccharidase intestinale qui catalyse l'hydrolyse du lactose, notamment au niveau jéjunal, en alpha-D-glucopyranose (glucose) et en alpha-D-galactopyranose (galactose). Son activité est maximale au niveau de jéjunum moyen. Une partie de l'enzyme est en contact avec la lumière intestinale mais reste protégée par son extrémité C-terminale.

La lactase présente deux activités enzymatiques avec des sites de catalyse indépendants (Zecca *et al.*, 1998) :

- le site phlorizin hydrolase (glycosyl-N-acylsphingosine glucohydrolase, EC 3.2.1.62) qui hydrolyse en phlorétine et en glucose la phlorizine, un composé présent dans l'écorce de certains arbres fruitiers.
- le site lactase (beta-D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23) qui hydrolyse le lactose (**Figure 2**).

Son activité s'exprime en unité par gramme de muqueuse ou de protéines. Des valeurs inférieures à 50 U/ g de protéines représentent une activité enzymatique considérée comme faible (Dahlqvist *et al.*, 1984).

Des mesures d'activité enzymatique sur biopsies de sujets sains adultes (âgés de 20 à 58 ans) ont permis de déterminer que le Km de la lactase pour son substrat est égal à 33.9 mM avec un Vmax de 26.5 nmol/ min/ mg (matière sèche), pour des doses de lactose comprises entre 0.56 et 56 mM (Dawson *et al.*, 1986). Ces caractéristiques enzymatiques sont variables selon les espèces. Par exemple, le Km de l'activité lactase intestinale chez le rat sevré est approximativement de 26 mM (Kim *et al.*, 1978).

#### Structure

La lactase est une glycoprotéine composée de quatre sous-unités semblables deux à deux, chacune possédant un site actif (**Figure 3**). Elle est synthétisée à partir d'un seul précurseur polypeptidique, la pro-LPH de 220 kDa, qui subit des clivages protéolytiques et des

glycosylations dans l'appareil de Golgi. La conformation tridimensionnelle de la lactase (LPH mature) est assurée par de nombreux ponts disulfures et détermine son transport vers la surface des cellules (Naim *et al.*, 1987). Initialement identifiée chez *Escherichia coli* en 1970, la lactase mature est constituée d'environ 1000 acides aminés chez les espèces bactériennes et de 735 acides aminés chez l'Homme (Jacob *et al.*, 2002). Sa température optimale de catalyse est de 48 °C et son pH optimal de 6,5. Son poids moléculaire est de 160 kDa chez l'Homme et de 120-130 kDa chez le rat (Naim *et al.*, 1994).

### Synthèse

La synthèse de lactase est assurée par la transcription du gène LCT, situé sur le chromosome 2 chez l'Homme (**Figure 4**) (Kruse *et al.*, 1988). Deux principaux facteurs de transcription sont nécessaires pour activer la transcription de ce gène : GATA et HNF-1 $\alpha$  (Krasinski *et al.*, 2001). Une pro-région de très forte homologie, appelée LPH alpha, a été séquencée en amont du gène. Cette séquence ne correspondrait pas à une lactase fonctionnelle et ne contribuerait pas à l'expression de la LPH mature mais jouerait un rôle de chaperon (Naim *et al.*, 1995).

### Evolution d'activité au cours du développement

L'expression de la lactase est initiée au moment de la morphogénèse des cellules de l'épithélium intestinal, avant même que les cellules de la bordure en brosse ne soient complètement matures. Les premiers ARNm de lactase et leurs premières séquences protéiques sont identifiés respectivement à 18 jours et 20 jours de développement (Montgomery *et al.*, 1990 ; Rings *et al.*, 1992). A la naissance, les ARNm de lactase et leurs séquences protéiques sont abondamment présents tout le long de l'intestin grêle. Les quantités relatives d'ARNm restent très élevées pendant l'allaitement. Au moment du sevrage, ces quantités d'ARNm diminuent rapidement dans l'iléum (Freunds *et al.*, 1991). Après 28 jours, l'expression de lactase devient résiduelle dans l'iléum mais également le duodénum. A l'inverse de la lactase, la sucrase-isomaltase est détectée à partir de 16 jours, avec une expression hétérogène le long de l'intestin grêle puis uniforme et très abondante à partir de 21 jours et persistante au-delà du sevrage (Rings *et al.*, 1994).

### Expression différentielle le long des villosités et dans les entérocytes

La présence d'ARNm de lactase évolue au cours de la différenciation des cellules épithéliales et il existe un gradient de concentration de ces ARNm le long de l'axe crypto-villositaire (**Figure 5**). Les entérocytes non différenciés localisés à la base de la crypte sont dépourvus de lactase et de ses ARNm, alors que les cellules au niveau de la jonction crypte-villosité présentent un niveau élevé d'ARNm associé à de faibles quantités de lactase. Les entérocytes

différenciés situés dans la moitié supérieure des villosités présentent une activité lactase importante associée à de faibles quantités d'ARNm (Freund *et al.*, 1995). Un gradient de concentration est également mis en évidence le long de l'axe cellulaire, sur des entérocytes de rats et des entérocytes humains. En effet les ARNm de la lactase (de même que ceux de la sucrase-isomaltase) et leurs protéines correspondantes sont localisés dans la région apicale des cellules des villosités et co-habitent avec leurs séquences protéiques (Barth *et al.*, 1998 ; Rings *et al.*, 1992).

#### Facteurs régulateurs de l'expression

D'après les études *in vitro*, notamment menées sur des lignées cellulaires Caco-2, les facteurs GATA et HNF-1 $\alpha$  sont de puissants activateurs du promoteur de la lactase alors que les facteurs HNF-1 $\alpha$  et Cdx-2 activent notamment le promoteur de la sucrase-isomaltase. Ces études ont également souligné l'activation différentielle des promoteurs de la lactase par plusieurs facteurs de transcription, agissant seuls ou de façon combinée, ainsi que l'existence d'une synergie entre GATA et HNF-1 $\alpha$  pour cette transcription (Krasinki *et al.*, 2001). Des études *in vivo* ont permis de préciser la contribution relative de ces différents facteurs. Chez la souris, GATA-4 est le principal facteur de transcription de l'épithélium intestinal. Il se lie au promoteur de la LPH et son expression est très fortement corrélée à celle des ARNm de la lactase dans le jéjunum et l'iléum. GATA-4 coopère avec HNF-1 $\alpha$  pour activer de façon synergique le promoteur de la lactase. Cette synergie repose sur une association physique entre GATA-4 et HNF-1 $\alpha$  d'une part, et des liaisons entre HNF-1 $\alpha$  et le promoteur de la lactase d'autre part. GATA-4 active également le promoteur de la lactase grâce à une zone de fixation spécifique et indépendante de HNF-1 $\alpha$ , contrairement à GATA-5 qui ne peut assurer une activation du promoteur en l'absence de HNF-1 $\alpha$  (**Figure 6**) (van Wering *et al.*, 2004).

## **I. 2. ETIOLOGIE DE L'INTOLERANCE AU LACTOSE**

La littérature mentionne plusieurs termes pour définir le trouble intestinal lié à l'intolérance au lactose. L'hétérogénéité, initialement liée aux erreurs de traduction, tend à se dissiper et on constate une volonté d'harmonisation par les communautés scientifique et médicale depuis une dizaine d'années, en France et en Europe.

### I. 2.1. L'hypolactasie

L'hypolactasie correspond à une diminution de la biosynthèse de la lactase. On parle d'alactasie lorsque la perte d'activité est totale.

#### Déficience primaire

La déficience en lactase peut être d'origine primaire congénitale lorsqu'elle résulte de mutation(s) du gène codant pour la lactase et apparaît alors dès la naissance (Jarvela *et al.*, 2009 ; Jarvela *et al.*, 1998), ou d'origine primaire acquise lorsqu'elle se développe avec l'âge (Sahi *et al.*, 1994). La perte d'activité lactasique est irréversible dans les deux cas. Les symptômes provoqués sont d'intensité sévère dans le cas d'une déficience congénitale et d'intensité légère à modérée dans le cas d'une déficience acquise.

La déficience primaire congénitale est très rare (moins de 1 % de la population alactasique) et peut résulter de 7 mutations différentes (essentiellement délétions mais aussi quelques substitutions) qui ont notamment été décrites dans la population finnoise (Robayo-Torres *et al.*, 2007 ; Torniainen *et al.*, 2009).

La déficience primaire acquise concerne 70 % de la population hypolactasique et se développe avec l'âge (Seppo *et al.*, 2009). Elle concerne tous les mammifères dès lors qu'ils sont sevrés, et apparaît plus ou moins rapidement selon les espèces. Par exemple, la réduction brutale d'activité lactase s'effectue en une quinzaine de jours chez le lapin, en une trentaine de jours chez le rat et en une dizaine d'années chez l'Homme (Sebastioa *et al.*, 1989 ; Wang *et al.*, 1998). Ces modifications enzymatiques ont été très étudiées chez le rat en cours de sevrage (aux environs de 3 semaines) et ont montré une baisse d'activité intestinale de 20 % dès la première semaine de sevrage (Peuhkuri *et al.*, 1975). La dilution de la lactase, parmi les nombreuses protéines synthétisées durant la période de sevrage, a longtemps été envisagée comme responsable de la réduction soudaine d'activité enzymatique. Mais les dernières études ont rapporté de fortes corrélations entre les baisses d'activité spécifique de la lactase, son taux de transcription (ARNm) et son taux de synthèse protéique (respectivement de  $r = 0.99$  et de  $r = 0.97$ ) dans les muqueuses intestinales de rats sevrés et de rats ayant reçu une ingestion prolongée de lactose (**Figure 7**). Ces études montrent donc que le déclin résulte en fait d'un mécanisme transcriptionnel plutôt que d'une dilution parmi les autres protéines synthétisées ou d'une réduction d'ingestion de lactose (Motohashi *et al.*, 1997 ; Sakuma *et al.*, 1996).

Par ailleurs, deux variants ont été identifiés au sein d'une séquence codant pour une hélicase, nommée MCM6, et leurs occurrences semblent corrélées à l'hypolactasie (**Figure 8**). Le premier variant, le plus étudié, est le polymorphisme C/T 13910 situé à 14 kb en amont du gène LCT. Les 3 génotypes résultant de ce polymorphisme sont CC, CT et TT et sont respectivement associés aux phénotypes hypolactasiques, persistants hétérozygotes et persistants homozygotes. Ils semblent ainsi corrélés au niveau d'activité lactasique mesurée dans des biopsies intestinales, ainsi qu'au ratio lactase:sucrase (**Figure 9**) (Enattah *et al.*, 2002 ; Kuokkanen *al.*, 2003). Le second variant est le polymorphisme G/A 22018, situé à 22 kb en amont du gène LCT (Enattah *et al.*, 2002 ; Rasinperä *et al.*, 2004). Les 3 génotypes résultant de ce polymorphisme sont GG, GA et AA et sont respectivement associés aux phénotypes hypolactasiques, persistants hétérozygotes et persistants homozygotes.

Des recherches épigénétiques restent nécessaires afin de déterminer si ces polymorphismes ont un rôle central dans l'expression de la lactase ou s'ils sont simplement des marqueurs d'un élément régulateur jusqu'alors non identifié (Grand *et al.*, 2008), ainsi que de préciser le mécanisme moléculaire à l'origine de cette réduction transcriptionnelle (Enattah *et al.*, 2007 ; Enattah *et al.*, 2008 ; Ingram *et al.*, 2009).

### Déficiences secondaires

La déficience en lactase peut également être d'origine secondaire, principale forme chez les enfants. Généralement provoquée par une maladie gastro-intestinale (gastro-entérite, maladie céliaque, Crohn, parasitoses) ou par un traitement (antibiothérapie, laxatifs stimulants), elle est d'intensité modérée à sévère mais transitoire car l'activité lactasique reprend sa valeur initiale dès que l'épithélium retrouve une fonctionnalité normale (Vesa *et al.*, 2000).

## **I. 2.2. La malabsorption**

La malabsorption, ou maldigestion (terme souvent rencontré dans la littérature anglophone), correspond à la mauvaise dégradation jéjunale et à la mauvaise absorption iléale du lactose. Elle est généralement consécutive à l'hypolactasie mais peut, dans de rares cas, être liée à un passage trop rapide dans l'intestin (augmentation de la vitesse de transit avec un temps de contact insuffisant) ainsi qu'à une inhibition des transporteurs du glucose sodium-dépendants (sGLUT1) par des tri et tétra-saccharides présents dans certains aliments comme les carottes, les betteraves et le soja (Eadala *et al.*, 2011). Une fraction plus ou moins importante de lactose arrive alors intacte au niveau du côlon et est fermentée par les bactéries hydrolytiques

et glycolytiques du microbiote colique. Les métabolites produits (gaz, acides organiques et acides gras à chaînes courtes) semblent en partie responsables de l'apparition des symptômes gastro-intestinaux.

### **I. 2.3. L'intolérance**

L'intolérance correspond à l'expression des symptômes, notamment gastro-intestinaux, par le sujet malabsorbeur (Harrington *et al.*, 2008). L'intolérance résulte donc d'une hypolactasie, conduisant à une malabsorption et accompagnée de symptômes. Mais selon la composition du microbiote intestinal et la sensibilité viscérale du sujet, une malabsorption ne résultera pas toujours en une intolérance.

Pour résumer, l'hypolactasie est considérée comme le facteur principal à l'origine du trouble. La malabsorption en est la conséquence à l'échelle intestinale et l'intolérance en est la manifestation symptomatique à l'échelle de l'individu. Ces trois termes ne sont donc pas équivalents mais inclusifs dans le sens où un intolérant au lactose sera nécessairement hypolactasique et malabsorbeur, alors qu'un individu hypolactasique ne présentera pas nécessairement d'intolérance. En effet, l'apparition et l'intensité des symptômes peuvent être modulées par des mécanismes d'adaptation structurale ou fonctionnelle du microbiote intestinal de l'hôte, détaillés dans la partie III de cette introduction.

### **I. 3. SEMIOLOGIE**

Dans le cas classique où l'hypolactasie conduit à une malabsorption et à une intolérance, les symptômes ressentis ne sont pas spécifiques. Ils apparaissent trente minutes à deux heures après l'ingestion de lactose et sont notamment gastro-intestinaux (**Tableau 3**). Il est intéressant de noter que les douleurs abdominales, les distensions intestinales, les borborygmes et les flatulences sont présents dans 100 % des cas alors que les nausées et les vomissements sont présents dans 78 % des cas (Matthews *et al.*, 2005).

Une étude sur plus de 1000 sujets (Beyerlein *et al.*, 2008) a mis en relation la malabsorption mesurée par l'hydrogène expiré et l'intolérance mesurée par le score des symptômes, après ingestion de 50 g de lactose. A partir de 2 symptômes, la corrélation entre malabsorption et intolérance semble significative. En effet, près de 30 % des sujets malabsorbants ressentent 2

symptômes gastro-intestinaux, 15 % ressentent 3 symptômes, 23 % ressentent 4 symptômes et 9 % ressentent 5 symptômes. Par ailleurs, les ballonnements et les borborygmes sont les symptômes les plus spécifiques alors que la diarrhée est le symptôme le plus sensible. Les ballonnements apparaissent comme le symptôme le plus discriminant (**Figure 10**).

L'intensité de ces symptômes varie selon la quantité de lactose ingérée (Labayen *et al.*, 2001) et certains auteurs y associent des intolérances légères, modérées et sévères. La fourchette 10-15 g est décrite dans plusieurs études comme la quantité maximale pouvant être ingérée quotidiennement par des sujets intolérants au lactose sans provoquer de symptômes majeurs (Hertzler *et al.*, 1996 ; Jones *et al.*, 1976 ; Suarez *et al.*, 1995). On considère respectivement qu'à partir de 12 g et de 20 g de lactose, les douleurs abdominales et les flatulences augmentent significativement (Hertzler *et al.*, 1996).

A charge identique, le lactose sous forme solide semble induire moins de symptômes que le lactose sous forme liquide. Une explication avancée est le temps de vidange gastrique plus long pour un aliment solide, échelonnant ainsi l'arrivée du lactose dans le côlon (Vesa *et al.*, 1997). De façon similaire, la valeur énergétique du repas qui accompagne l'ingestion de lactose réduirait la sévérité des symptômes en augmentant le temps de transit colique (Priebe *et al.*, 2006 ; Vonk *et al.*, 2003). Le remplacement du lait demi-écrémé par du lait entier ou la modification de viscosité du lait n'ont, par contre, montré aucun bénéfice (Vesa *et al.*, 1997).

Deux études ont rapporté des douleurs gastro-intestinales et des nausées plus intenses chez les femmes que chez les hommes, après l'ingestion de lactose (Jussila *et al.*, 1969 ; Krasue *et al.*, 1996). Cependant, ces résultats ne sont pas objectivement validés dans la mesure où les tests respiratoires à l'hydrogène n'ont pas montré de différences significatives entre les deux genres.

Des symptômes systémiques ont également été rapportés chez un nombre non négligeable de malabsorbeurs. Ces troubles apparaîtraient plus tardivement que les troubles gastro-intestinaux, notamment le lendemain d'une charge de lactose. Les principaux symptômes évoqués sont des troubles cognitifs (maux de tête, fatigue, problèmes de concentration) observés chez 86 % des malabsorbeurs, des troubles musculaires et articulaires observés chez 70 % des malabsorbeurs et des allergies (rhinite, eczéma et asthme) observées chez 40 % des malabsorbeurs (Matthews *et al.*, 2000 ; Matthews *et al.*, 2005).

## I. 4. PREVALENCE

### I. 4.1. Dans la population générale

Alors que tout mammifère présente naturellement une forte activité lactasique à sa naissance, cette faculté se perd progressivement lors du sevrage. On parle de perte génétiquement programmée. La vitesse de ce déclin présente des variabilités inter et intra espèces.

#### Théories justifiant la persistance de lactase

On rencontre dans la littérature deux théories, relativement similaires reposant toutes deux sur une mutation génétique, pour expliquer la persistance de lactase à l'âge adulte. La première, et plus largement admise, est celle de la coévolution gène-culture. Une mutation génétique apparue au moment de l'Ere Néolithique dans les Balkans puis diffusée en Europe Centrale aurait offert un avantage sélectif aux populations pouvant consommer des produits laitiers à l'âge adulte (**Figure 11**) (McCracken *et al.*, 1971 ; Simoons *et al.*, 1970). La seconde est celle de l'assimilation du calcium. Elle suggère que les personnes vivant dans les latitudes les plus hautes auraient une lactase persistante par besoin. En effet, l'environnement de ces populations ne leur permettant pas de couvrir leurs besoins en vitamine D et en calcium, elles devraient nécessairement consommer des produits laitiers. Une activité lactase persistante leur permettrait donc de ne pas être déficientes en ces composés (Flatz *et al.*, 1973).

Selon une étude récente, il semblerait que la coévolution gène-culture soit la principale raison de la persistance de lactase en Afrique et dans la partie sud de l'Europe (Gerbault *et al.*, 2009). La persistance de lactase dans la partie nord de l'Europe serait imputable à la théorie de l'assimilation du calcium. Pour l'Asie où la répartition de la persistance de lactase est très hétérogène, il semble difficile de trancher entre ces deux théories.

#### Prévalence et origine ethnique

L'hypolactasie primaire acquise concerne environ 70 % de la population mondiale adulte, avec de grandes disparités selon l'origine ethnique des individus. Elle s'étend en effet de 2 à 20 % dans les populations Caucasiennes, de 30 à 50 % dans les populations Méditerranéennes, de 60 à 80 % dans les populations Africaines et de 95 à 100 % dans les populations Asiatiques (**Tableau 4**).

#### I. 4.2. Dans la population présentant des pathologies digestives

L'activité lactase peut également être réduite par des facteurs indépendants de la prédisposition génétique, comme par exemple une modification de l'intégrité de la muqueuse intestinale. Cette dernière peut être altérée dans certaines situations pathologiques non digestives (rhumatismes, cancer, SIDA...) ou digestives (maladie caeliaque, maladie de Crohn, pancréatite...), ainsi que dans des situations générées par des facteurs pharmaceutiques (antibiotiques), nutritionnels (allergies, intolérances) ou infectieux (altération du microbiote intestinal, Salmonella, Listeria...) (Pascual *et al.*, 2001).

Certaines altérations de l'intégrité de la muqueuse intestinale sont liées à des états inflammatoires plus ou moins chroniques pouvant survenir dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) et potentiellement dans le syndrome de l'intestin irritable (SII). Brièvement, les MICI sont des maladies d'étiologie inconnue impliquant des facteurs génétiques et environnementaux qui incluent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Elles se caractérisent toutes les deux par une inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif, associée à des douleurs abdominales et des diarrhées. Dans la maladie de Crohn, cette inflammation peut être localisée n'importe où dans le système digestif, de la bouche à l'anus, mais le plus souvent au niveau de l'intestin. Dans la rectocolite hémorragique, cette inflammation est localisée au niveau du rectum et du colon. Ces pathologies évoluent par poussées de durée et de fréquence extrêmement variables, alternant avec des phases de rémission. Elles touchent principalement les sujets jeunes (20-30 ans). Brièvement, le SII se définit selon les Critères de Rome, puisqu'il n'existe aucun marqueur biologique spécifique. Les Critères de Rome, initialement proposés en 1992 (Critères de Rome I) ont été précisés en 1999 (Critères de Rome II) puis finalisés en 2006 (Critères de Rome III). Cette dernière version sert désormais de référence internationale pour le diagnostic du SII (**Tableau 5**) (Longstreth *et al.*, 2006). Bien que présentant des symptômes variés, le SII est caractérisé par des douleurs abdominales associées à un inconfort et une altération de la motilité gastro-intestinale. Le SII est souvent divisé en sous-groupes, déterminés en partie par la consistance des selles : SII avec constipation prédominante (SII-C), SII avec diarrhée prédominante (SII-D), SII avec alternance constipation-diarrhée (SII-M), SII post-infectieux (SII-PI) et SII non spécifié.

Les inflammations (ou micro-inflammations) intestinales alors engendrées peuvent être évaluées au niveau des muqueuses par le dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO) et

l'analyse histologique, et au niveau systémique par les dosages de la protéine réactive C (CRP) et de cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) et les interleukines (notamment IL1). Les dosages de MPO, de CRP, de TNF $\alpha$  et d'IL1 sont préférentiellement utilisés dans les modèles expérimentaux alors qu'en pratique clinique, les colonoscopies éventuellement complétées par des analyses histologiques sur biopsies sont davantage utilisées.

Les relations entre SII, MICI et intolérance au lactose restent complexes. Pour le moment, aucun lien de cause à effet n'a été clairement établi et seules des observations de prévalence dans les différents sous-groupes ont été effectuées (Barret *et al.*, 2009 ; Vernia *et al.*, 2001). En cas de symptomatologie digestive liée à une pathologie (MICI, SII), la prévalence de l'hypolactasie reste proche des 10 à 30 % observés dans la population générale tant chez les adultes (Farup *et al.*, 2004) que chez les enfants (Pfefferkorn *et al.*, 2002). En effet, la répartition des génotypes CC, CT et TT serait d'environ 15 %, 38 % et 47 % dans ces populations (Eadala *et al.*, 2002 ; Vernia *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2010). Cependant, le ressenti des symptômes serait nettement supérieur dans la population malade du fait de leur sensibilité viscérale accentuée et pourrait même concerner certains hétérozygotes (Eadala *et al.*, 2011). La maladie caeliaque, d'origine auto-immune, reste classée à part car elle correspond à une réaction inappropriée du système immunitaire de la muqueuse intestinale à certaines protéines du gluten (gliadine). Caractérisée par une atteinte des villosités de l'intestin grêle, elle est fortement associée à des déficiences en disaccharidases notamment en lactase (Bodé *et al.*, 1988 ; Mones *et al.*, 2011 ; Ojetti *et al.*, 2005).

Les signes cliniques de ces différentes pathologies étant à la fois similaires et peu spécifiques, leur amalgame avec l'intolérance au lactose est fréquent. Un diagnostic différentiel est nécessaire et devrait commencer par le dépistage précoce d'une malabsorption du lactose, afin d'éviter des prises en charge lourdes et inadaptées (Leung *et al.*, 2010 ; Von Tirpitz *et al.*, 2002).

## **I. 5. PATHOLOGIES RESULTANT DE LA MALABSORPTION DU LACTOSE**

La littérature évoque plusieurs pathologies résultant, directement ou indirectement, de la malabsorption du lactose. Cependant, il est nécessaire de garder à l'esprit que les études mentionnées ne sont qu'observationnelles et qu'aucune corrélation significative n'a pu être dégagée.

### **I. 5.1. Pathologies associées à l'éviction des produits laitiers**

#### Réduction de densité de masse osseuse et ostéoporose

Les individus malabsorbant le lactose tendent spontanément à supprimer les produits laitiers de leur alimentation dès lors qu'ils ont identifié l'origine de leurs symptômes. Longtemps perçue comme le plus simple des traitements, l'exclusion des produits laitiers est pourtant peu recommandée. Elle est en effet associée à des carences en vitamines et minéraux (notamment vitamine D, calcium et phosphore) pouvant conduire à des problèmes de santé plus lourds comme l'ostéoporose. Des corrélations positives ont été rapportées entre le génotype hypolactasique CC-13910 et la perte osseuse chez les Finlandais (Laaksonen *et al.*, 2009), ainsi qu'entre ce génotype et les réductions du calcium sérique et de la densité minérale osseuse chez les femmes ménopausées (Bacsi *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été démontré qu'une restriction en produits laitiers commençant dès l'adolescence augmenterait considérablement le risque d'ostéoporose à l'âge adulte quelle que soit l'origine ethnique (Matlik *et al.*, 2007).

### **I. 5.2. Pathologies associées aux métabolites coliques du lactose**

#### Cancers digestifs et uro-génitaux

Une étude récente a montré que le génotype hypolactasique CC-13910 était associé à un risque élevé de cancer colorectal dans la population finnoise. Ces résultats doivent être manipulés avec prudence car cette corrélation n'a pas été retrouvée pour d'autres populations, notamment britanniques et espagnoles. Ces résultats sont d'autant plus étonnants que la Finlande présente la plus faible incidence de cancers colorectaux alors qu'elle est le pays européen qui consomme le plus de produits laitiers (Rasinperä *et al.*, 2005). Une autre étude a montré l'effet protecteur du génotype lactase persistant C/T-13910 contre les cancers ovariens dans les populations finnoise et suédoise. Cependant, aucune corrélation significative entre le génotype hypolactasique CC-13910 et l'incidence de cancer ovarien n'a pour le moment été démontré (Kuokkanen *et al.*, 2005).

#### Syndrome de l'Intestin Irritable

Bien que les causes du SII restent floues, il semblerait que les intolérances alimentaires associées à une sécrétion de prostaglandines E<sub>2</sub> au niveau du rectum soient plus fréquemment associées à un SII (Jones *et al.*, 1982 ; Rampton *et al.*, 1983) et qu'une fermentation colique

anormale, déclenchant une hypersensibilité abdominale, soit un facteur de risque pour le SII (Ducrotte *et al.*, 2010 ; King *et al.*, 1998).

## **I. 6. TRAITEMENTS**

### **I. 6.1 Le régime d'éviction**

La principale solution proposée en routine est l'exclusion des produits contenant du lactose et leur substitution par des denrées alimentaires naturellement pauvres en lactose (par exemple laits de chamelle, laits végétaux). Ce régime est cependant très difficile à suivre et pas nécessairement très efficace, notamment en raison des sources cachées de lactose. Par ailleurs, il conduit à éliminer les produits laitiers et peut provoquer, sur le long terme, des carences importantes en vitamines (B2, D) et minéraux (Ca, P).

### **I. 6.2 Les denrées alimentaires pauvres ou sans lactose**

#### Les denrées dé lactosées

Depuis les années 1990, le marché de l'intolérance au lactose se développe avec la commercialisation de nombreux produits alimentaires dé lactosés. Une directive européenne (Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia, EFSA, 2010) fixe d'ailleurs les seuils de lactose respectivement à 1 g de lactose/ 100 g pour l'usage des allégations « pauvre en lactose » et à 10 mg de lactose/ 100 g de produit « sans lactose ».

Les denrées peuvent être dé lactosées par des procédés biologiques ou physiques qui assurent une réduction de la teneur en lactose de 85 à 99 %. La pré-hydrolyse biologique consiste en l'incorporation, lors du processus de fabrication, de ferments lactiques ou de lactase purifiée à partir de bactéries, de levures ou de moisissures (Chen *et al.*, 2008; Garcia-Garibay *et al.*, 1996 ; Mateo *et al.*, 2004). Le procédé physique consiste en une ultrafiltration de la denrée liquide, à travers une membrane retenant les molécules comme le lactose (Lybeck *et al.*, 1983 ; Morr *et al.*, 2008 ). Ce procédé, développé et breveté par l'INRA en 1969, est aujourd'hui très utilisé par l'industrie laitière.

#### Les denrées alternatives

Les denrées alternatives disponibles peuvent être des laits animaux moins riches en lactose, comme les laits de brebis, de chèvre et de chamelle (Cardoso *et al.*, 2010), ou des laits

végétaux ne contenant pas de lactose comme les laits de soja, d'amande et de coco (**Tableau 6**). Cependant, ces laits ne peuvent se substituer intégralement aux laits animaux en raison de leurs teneurs moindres en vitamines et minéraux.

### **I. 6.3 Les produits fermentés**

Plusieurs travaux ont étudié l'intérêt des produits fermentés, notamment du yaourt, pour améliorer la tolérance au lactose de sujets malabsorbants.

Le yaourt, de par sa forte teneur en ferments lactiques, assure un apport en beta-galactosidase exogène et optimise la digestion du lactose contenu dans une denrée préalablement ou simultanément consommée (Labayen *et al.*, 2001 ; Lerebours *et al.*, 1989 ; Martini *et al.*, 1987). Il est en effet reconnu que tout probiotique, même non viable au moment de l'ingestion (par exemple suite à la pasteurisation du lait), procure des bénéfices cliniques mesurables grâce la libération de sa beta-galactosidase lors du passage dans le tractus digestif (Ballesta *et al.*, 2008 ; Rampengan *et al.*, 2010). Par ailleurs, ingérés quotidiennement, les ferments du yaourt peuvent rester viables dans le tube digestif et assurer la présence de micro-organismes à forte activité beta-galactosidase et modifier les activités métaboliques du microbiote (He *et al.*, 2004 ; He *et al.*, 2008 ; Zhong *et al.*, 2006 ).

Le kefir a également montré des bénéfices sur l'amélioration de la tolérance au lactose chez des malabsorbants, et ce de façon comparable au yaourt. En effet, son ingestion est associée à la réduction significative de différents symptômes cliniques comme la quantité d'hydrogène expiré, les maux de ventre, les flatulences et les diarrhées en comparaison à du simple lait (Hertzler *et al.*, 2003).

### **I. 6.4 L'enzymothérapie substitutionnelle**

L'usage de compléments alimentaires contenant de la lactase est aussi proposé. Cette enzymothérapie substitutive est très plébiscitée dans les pays anglo-saxons mais reste encore peu utilisée en France. Plusieurs études cliniques ont mis en évidence les bénéfices symptomatiques de cette enzymothérapie substitutive en lactase extraite de moisissures comme *Aspergillus oryzae* (Di Palma *et al.*, 1989 ; Portincasa *et al.*, 2008) ou de levures comme *Kluyveromyces lactis* (Lami *et al.*, 1988 ; Montalto *et al.*, 2005). La complémentation s'effectue généralement de 4500 FFC de lactase (4500 unités enzymatiques par gramme de

produit) permettant la digestion de 25 g de lactose, à 6750 FFC permettant la digestion de 38 g de lactose. Les principaux résultats obtenus sont une réduction très significative de l'hydrogène expiré ( $p < 0.001$ ) et des symptômes gastro-intestinaux ( $p < 0.001$ ), notamment des ballonnements et des flatulences, sur les heures suivant l'ingestion conjointe de lactose et de lactase (**Figure 12**).

Mais malgré plusieurs résultats concluants, la méthodologie de ces essais cliniques pourrait être améliorée notamment au niveau des critères d'inclusion et de la justification statistique de la taille de l'échantillon.

### EN RESUME

Le lactose est le sucre du lait, dont les teneurs varient selon les espèces animales. Son hydrolyse est assurée par la lactase intestinale, enzyme dont la synthèse décroît après le sevrage et de façon plus ou moins rapide selon les espèces.

Un déclin d'activité lactase est appelé hypolactasie et est généralement associé à une malabsorption (mauvaise digestion et fermentation colique du lactose) et à une intolérance (expression des symptômes gastro-intestinaux).

La prévalence de l'hypolactasie et de l'intolérance est relativement bien décrite dans les différentes populations mais le manque de spécificité de ses symptômes peut conduire à des confusions avec d'autres pathologies intestinales (SII et MICI).

Des études observationnelles ont montré que lorsque l'intolérance au lactose n'est pas ou mal prise en charge, elle pouvait être associée à d'autres pathologies liées à l'éviction des produits laitiers et aux métabolites microbiens du lactose accumulés dans le côlon.

Il apparaît donc nécessaire d'identifier les métabolites coliques du lactose et de préciser les techniques permettant de les mettre en évidence afin d'optimiser la fiabilité du diagnostic.

## **II. Métabolisme du lactose chez l'individu absorbeur et malabsorbeur, le rôle du microbiote intestinal**

### **II. 1. METABOLISME DU LACTOSE CHEZ L'INDIVIDU ABSORBEUR**

#### **II. 1.1. Hydrolyse et absorption du lactose**

Chez un sujet absorbeur, le lactose est hydrolysé par la lactase jéjunale en glucose et galactose, ensuite absorbés au niveau de l'iléon (**Figure 13**). Leur absorption intestinale, au niveau des membranes apicales des entérocytes, est effectuée par deux familles de transporteurs :

- Les SGLTs (serum glucose transporters) qui assurent un transport actif couplé à celui du sodium,
- Les GLUTs (glucose transporters) qui assurent une diffusion facilitée.

Le passage des monosaccharides de l'entérocyte à la veine porte est ensuite assuré exclusivement par les GLUTs, notamment GLUT 2 au niveau des membranes baso-latérales des entérocytes.

#### **II. 1.2. Utilisation des monosaccharides libérés**

Brièvement, le galactose et le glucose absorbés sont acheminés vers le foie par la circulation sanguine où ils sont notamment phosphorylés par des kinases hépatiques avant toute utilisation métabolique consécutive (**Figure 14**).

##### Utilisation du galactose

Le galactose peut simplement rester dans la circulation sanguine et être acheminé jusqu'aux reins où il est excrété dans les urines. Sous forme d'UDP-galactose, le galactose peut également participer à la synthèse de glycoprotéines, de glycolipides et de glycosaminoglycanes. Le galactose peut sinon être isomérisé en glucose avant d'entrer dans la voie glycolytique. Cette réaction est catalysée par une galactokinase qui phosphoryle le galactose en galactose-1P, puis pas une uridyl-transférase qui isomérisé le galactose-1P en glucose-1P et par une phospho-glucomutase qui convertit le glucose-1P en glucose-6P.

### Utilisation du glucose

Le glucose, sous forme de glucose-6-P, peut être utilisé directement par les muscles, le cerveau et les autres tissus via la glycolyse, mécanisme de production d'ATP ne nécessitant pas d'oxygène. Le pyruvate produit est soit transformé en acetyl-CoA qui entre alors dans le cycle de Krebs réalisé au niveau mitochondrial, soit fermenté en anaérobiose dans le cytoplasme de la cellule. Le glucose peut également être stocké dans le foie et dans les muscles sous forme de glycogène. La glycogénogénèse, stimulée par l'insuline et nécessitant plusieurs enzymes dont la synthétase, peut être résumée par la formule :



## **II. 2. METABOLISME DU LACTOSE CHEZ L'INDIVIDU MALABSORBEUR**

Chez un sujet malabsorbeur, le lactose non absorbé parvient jusqu'au côlon où il se comporte alors comme une fibre fermentescible. La fermentation colique, réalisée par la flore anaérobie hydrolytique et glycolytique, a notamment lieu dans le caecum et le côlon droit. Elle conduit à la production et à l'accumulation de produits intermédiaires (succinate, lactate, formate, éthanol) et terminaux (propionate, acétate, butyrate) osmotiquement actifs, et de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone, méthane).

### **II. 2.1. Le rôle du microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes vivant dans l'écosystème intestinal, en relation étroite avec l'hôte. Cette biomasse, représentant 50 % du poids fécal, est constituée d'environ 1000 espèces, dont une quarantaine majoritaires chez l'adulte sain (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2007).

Le rôle de la fraction microbienne du microbiote et ses interactions avec l'hôte ont été très étudiés durant ces dernières années. Les derniers travaux, dont le nombre a augmenté de façon exponentielle depuis les années 2000, permettent aujourd'hui d'affirmer que le microbiote intestinal est essentiel pour divers processus physiologiques de l'hôte. Il participe notamment à la digestion via la dégradation de composés d'origine alimentaire indigestibles comme la fermentation des fibres végétales, intervient dans la protection contre la prolifération de microorganismes potentiellement pathogènes, et joue également un rôle dans divers processus physiologiques de l'hôte (Guilloteau *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2010 ; Sekirov *et al.*, 2010).

### Composition du microbiote

Le microbiote intestinal se compose d'une flore résidente et d'une flore en transit. La flore résidente est constituée d'une flore dominante, composée de 25 à 40 espèces majoritairement anaérobies strictes, et d'une flore sous-dominante composée de bactéries anaérobies strictes ou facultatives. La fraction microbienne la plus nombreuse et la plus étudiée est composée de micro-organismes procaryotes (bactéries ou archées).

Les études basées sur l'inventaire du microbiote intestinal montrent que le noyau phylogénétique de la flore dominante est constitué de trois principaux phyla : les Bacteroidetes (eg *Bacteroides*), les Firmicutes (eg *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*) et les Actinobactéries (eg *Bifidobacterium*, *Atopobium*) (**Figure 15**) (Eckburg *et al.*, 2005 ; Suau *et al.*, 1999). L'importance relative de ces trois phyla est spécifique à chaque période de la vie et à l'état physiologique du sujet. En effet, le ratio Firmicutes/ Bacteroidetes évolue avec l'âge, passant de 0.4 chez l'enfant à 10.9 chez l'adulte et à 0.6 chez le sujet âgé (Mariat *et al.*, 2009). Par ailleurs, les premières recherches étudiant l'implication du microbiote dans l'obésité, bien que désormais discutées, avaient montré que ce même ratio était significativement plus élevé chez le sujet obèse ou en surpoids que chez le sujet mince.

Concernant les genres bactériens, un remaniement est observé au cours du vieillissement, malgré un nombre relativement stable de micro-organismes présents dans le microbiote intestinal. En effet, l'analyse de flore fécale a montré les résultats suivants : une prédominance (par ordre décroissant) de *Bacteroides*, bifidobactéries, entérobactéries et clostridies chez l'enfant, une prédominance de *Bacteroides*, bifidobactéries, lactobacilles et clostridies chez l'adulte, une prédominance de *Bacteroides*, bifidobactéries, clostridies et entérobactéries chez le sujet âgé (Hopkins *et al.*, 2002). Par ailleurs, une augmentation de l'hétérogénéité des genres bactériens et de la densité bactérienne est systématiquement observée le long de l'intestin avec une prédominance des lactobacilles dans l'estomac, de bacilles et de streptocoques dans l'intestin grêle, et de *Bacteroides* dans le côlon (**Figure 16**) (Sekirov *et al.*, 2010).

### Fonctionnalités du microbiote

Les micro-organismes composant le microbiote intestinal sont répartis en différents groupes fonctionnels dont les principaux sont les fermentaires et les hydrogénéotrophes (**Figure 17**).

Les bactéries fermentaires assurent la dégradation des polysaccharides (glucides à plus de 6 carbones) en acides gras à chaînes courtes (molécules de 2 à 5 carbones) et en gaz, qui contribuent aux valeurs de pH et d'osmolarité de l'environnement colique (Arola *et al.*, 1994).

L'activité de ces bactéries fermentaires est liée à des enzymes spécifiques appelées les CAZymes pour *Carbohydrates Active Enzymes*. Ces enzymes peuvent présenter des activités glycosidases, transglycosidases, phosphorylases ou lyases et ainsi assurer respectivement la création de deux unités osidiques, d'un nouveau glycoside, d'un sucre phosphorylé (1-P) ou d'un composé insaturé (CAZypedia, 2012 ; Tasse *et al.*, 2010). Anaérobies strictes ou facultatives, les bactéries fermentaires peuvent être lactiques (eg : bifidobactéries, lactobacilles, entérocoques) ou butyrogènes (eg : *Clostridia* clusters IV et XIVa, fusobactéries, eubactéries) et ainsi produire spécifiquement, ou majoritairement, du lactate ou du butyrate. D'autres peuvent produire essentiellement de l'acétate (eg : *Bacteroides*, entérobactéries, clostridies) ou du propionate (eg : propionobactéries, *Clostridium* cluster IX) (Macfarlane *et al.*, 2012) (**Tableau 7**).

Les organismes hydrogénotrophes utilisent l'hydrogène comme source d'électrons et sont généralement anaérobies stricts. Dans le tube digestif, ce groupe fonctionnel est majoritairement composé de bactéries sulfato-réductrices (BSR), de bactéries acétogènes et d'archées méthanogènes. Les BSR (eg : *Desulfuvibrio*) produisent du sulfure d'hydrogène à partir d'hydrogène, avec pour accepteurs finaux d'électrons des sulfates et dans certains cas des nitrates (Schink *et al.*, 2006). Relativement versatiles, les BSR peuvent également se développer dans un milieu à très faibles teneurs en sulfates et obtenir de l'énergie par la fermentation. Par exemple, *Desulfuvibrio* peut évoluer de façon syntrophique dans un milieu sans sulfates mais contenant du lactate et des méthanogènes. Un tel syntrophisme s'effectue généralement pour des raisons thermodynamiques et nécessite une proximité physique des cellules. Selon la richesse en sulfates ou en mucines du milieu, les BSR peuvent donc soit jouer un rôle de consommateurs d'hydrogène et dans ce cas être en compétition avec les autres micro-organismes hydrogénotrophes du côlon (Christl *et al.*, 1992 ; Gibson *et al.*, 1988) ; soit jouer un rôle de producteurs d'hydrogène et dans ce cas évoluer de façon syntrophique (même à de fortes concentrations) avec les autres micro-organismes hydrogénotrophes du milieu (Plugge *et al.*, 2011 ; Stewart *et al.*, 2006). Les bactéries acétogènes représentent une fraction importante des bactéries hydrogénotrophes du microbiote intestinal et sont définies comme des anaérobies qui utilisent la voie de l'acetyl-CoA. L'acétogénèse produit alors 3 molécules d'acétate à partir d'un sucre alors qu'une fermentation classique en produit 2 (**Figure 18**). Selon le pH et la température du milieu, seule la voie de l'acetyl-CoA peut être utilisée et dans ce cas la bactérie est qualifiée d'homoacétogène (l'acétate est la seule molécule produite) soit d'autres voies peuvent être

utilisées conduisant à la production de plusieurs molécules (acétate, butyrate, lactate, succinate, éthanol, aldéhydes) et dans ce cas la bactérie est qualifiée d'hétéroacétogène (Drake *et al.*, 2006). Les archées méthanogènes sont présentes dans le microbiote intestinal avec de très grandes variabilités selon le statut méthano-excréteur ou non de l'individu, les méthano-excréteurs représentant environ 30 % de la population (Chassard *et al.*, 2008 ; Schink *et al.*, 2006). Les archées méthanogènes sont réparties en trois classes, la plus abondante étant les méthanobactéries (eg : *Methanobrevibacter smithii*). Les archées méthanogènes produisent leur énergie à partir de la conversion d'un nombre restreint de substrats en méthane. La plupart d'entre elles réduisent le dioxyde de carbone en méthane avec pour donneurs d'électrons l'hydrogène, l'acétate ou le formate ; d'autres peuvent sinon utiliser des alcools comme sources d'électrons (**Figure 19**). La méthylcoenzyme M est un intermédiaire central dans chacune des voies de production du méthane. Dans l'ensemble, les archées méthanogènes disposent d'une gamme de substrats plus restreintes que les bactéries acétogènes, ce qui pourrait les rendre moins compétitives (Rey *et al.*, 2010). De plus, des proliférations différentes entre ces deux micro-organismes hydrogénotrophes ont été rapportées selon le statut méthano-excréteur ou non de l'individu (Chassard *et al.*, 2008). Mais cela reste discuté puisque plusieurs cas de syntrophismes ont été observés entre méthanogènes et bactéries oxydant l'éthanol, l'acétate, le propionate ou le butyrate (Schink *et al.*, 2006).

Pour résumer, les premiers métabolites coliques des polysaccharides, générés par les bactéries fermentaires, sont des sucres réducteurs, des acides organiques, des acides gras à chaînes courtes et des gaz. Certains de ces produits sont ensuite recyclés par les micro-organismes hydrogénotrophes, notamment en sulfure d'hydrogène, en acétate et en méthane. Les quantités de ces différents métabolites coliques dépendent de la quantité de glucides arrivant intacts dans le côlon, du temps de transit colique (Cook *et al.*, 1998), ainsi que de la composition et de l'activité du microbiote intestinal (Roberfroid *et al.*, 2007).

#### Modulation de la composition du microbiote

La composition en populations microbiennes dépend de nombreux facteurs dont leurs interactions avec l'environnement biotique et abiotique. La composition du microbiote intestinal repose donc en partie sur le mode de vie de l'hôte (Walker *et al.*, 2011). Par exemple le mode d'accouchement, par voie basse ou par césarienne, est le premier déterminant de la composition du microbiote (Dominguez-Bello *et al.*, 2010 ; Marques *et al.*, 2010), puis la diversification alimentaire vient remodeler sa composition et son activité

(Marques *et al.*, 2010 ; Turnbaugh *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs recherches ont évalué l'impact de l'alimentation, notamment des pré et probiotiques, sur la composition du microbiote intestinal et la santé de l'hôte. Les travaux ayant étudié l'effet des prébiotiques se sont intéressés à différentes fibres, comme l'inuline et l'arabinoxylane, ou à des aliments en contenant. Par exemple, une étude a montré que l'ingestion d'inuline et de choux de Bruxelles pendant quatre semaines favorisait la prolifération des lactobacilles, les productions d'acétate et de propionate, ainsi que l'activité beta-glucuronidase du contenu fécal (Humblot *et al.*, 2005). Une autre étude a montré que l'ingestion d'arabinoxylane pendant six semaines favorisait les proliférations de bifidobactéries dans le mucus et le contenu caecal et de certains groupes butyrogènes (*Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale*, *Anaerostipes caccae*), ainsi que les productions de propionate, de butyrate et de mucines (Van den Abbeele *et al.*, 2011). Plusieurs études soulignant le rôle des probiotiques sur le microbiote intestinal sont également disponibles. La consommation prolongée de probiotiques (*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*), apportés soit dans des laits fermentés soit en compléments alimentaires, conduit à une prolifération des bifidobactéries et des lactobacilles fécaux, à la réduction des pathogènes fécaux (entérobactéries, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*), et semble moduler certains paramètres immunitaires (Islam *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Yang *et al.*, 2012).

#### Dysbiose du microbiote et santé de l'hôte

Les modifications de composition et d'activité du microbiote peuvent être à l'origine de certaines variations dans la physiologie de l'hôte.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont le principal cas de dysbiose associé à une condition pathologique. Une revue récente a suggéré que l'hygiène de vie actuelle dans les pays industrialisés pouvait modifier le schéma de colonisation microbienne du tube digestif et ainsi provoquer des altérations d'interaction avec le système immunitaire. Chez les sujets présentant une sensibilité génétique aux MICI, une colonisation microbienne anormale du tube digestif pourrait donc être à l'origine d'une telle condition (Manichanh *et al.*, 2012). D'autres études ont évalué le rôle du microbiote dans le syndrome de l'intestin irritable et ont montré la spécificité entre dysbiose et condition du sujet. En effet les dysbioses intestinales associées à une condition diarrhéique (SII-D) se caractériseraient notamment par des concentrations fécales élevées en entérobactéries et en genre *Faecalibacterium* (Carroll *et al.*, 2012) alors que les dysbioses associées à une constipation (SII-C) se caractériseraient notamment par de faibles concentrations fécales en bactéries lactiques et hydrogénéotrophes

(bactéries sulfato-réductrices, bactéries acétogènes et archées méthanogènes) (Chassard *et al.*, 2012).

D'autres travaux ont étudié la composition du microbiote intestinal lors des processus allergiques (dermatite/ eczéma atopique) mais leurs résultats restent controversés. En effet certaines études révèlent des taux de colonisation en genres aérobies (staphylocoques, entérocoques, entérobactéries) et anaérobies (*Bacteroides*, *Clostridium*, bifidobactéries) légèrement plus élevés chez les enfants allergiques que chez les enfants sains, mais sans différence significative (Waligora-Dupriet *et al.*, 2011). Alors que d'autres études soulignent la diversité significativement moindre chez les enfants allergiques que chez les autres enfants (Abrahamsson *et al.*, 2012).

Le dialogue métabolique microbiote-hôte reste donc complexe et non élucidé. Les pistes évoquées à ce jour concernent l'implication de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du stockage et/ou de l'oxydation des nutriments, des processus inflammatoires et dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale (Cani *et al.*, 2007 ; Cani *et al.*, 2009). Des travaux récents, basés sur des techniques métagénomiques, ont permis d'affiner la description du microbiote intestinal et de ses interactions avec l'hôte (Lakhdari *et al.*, 2010 ; Lepage *et al.*, 2012 ; Manichanh *et al.*, 2006).

## **II. 2.2. Les métabolites coliques bactériens du lactose**

Accumulés dans le colon, ces métabolites sont notamment responsables de l'apparition des symptômes via une augmentation de la charge osmotique, un afflux d'eau et une distension intestinale (Hertzler *et al.*, 1996). Dans le cas d'une malabsorption, ces métabolites coliques seraient produits plus rapidement et en plus grandes quantités chez les malabsorbeurs, notamment chez ceux présentant des symptômes (He *et al.*, 2006).

### Les acides gras à chaînes courtes

Lors de l'ingestion d'un régime traditionnel, les AGCC sont produits par fermentation colique de la fraction indigestible de l'alimentation, notamment dans le caecum et le côlon droit (**Figure 20**). Les bénéfices des AGCC sur la santé gastro-intestinale ont été très étudiés lors des dix dernières années. Ils agissent notamment sur la motricité, le trophisme et la protection du système gastro-intestinal (Hamer *et al.*, 2008 ; Papillon *et al.*, 1999) mais les mécanismes restent à clarifier. Les AGCC représentent environ les deux tiers des anions des contenus coliques : entre 100 et 150 mmol/L, soit 300 à 400 mmol/ jour. Les proportions produites

varient en fonction du temps de transit intestinal, du microbiote colique et des substrats disponibles même si l'acétate représente systématiquement l'AGCC majoritaire (Englyst *et al.*, 1987). Dans les conditions normales de pH, les principaux AGCC présents dans le côlon humain sont l'acétate, le propionate et le butyrate au ratio de 1:0.31:0.15 (Cummings *et al.*, 1987 ; Soergel *et al.*, 1994). Ces ratios molaires évoluent légèrement le long du côlon, avec par exemple un ratio acétate:propionate:butyrate de 1:0.38:0.36 (M:M:M) au niveau du côlon droit et de 1:0.36:0.35 (M:M:M) au niveau du côlon gauche (Cook *et al.*, 1998). Ce ratio est ensuite de 1:0.30:0.11 (M:M:M) dans le sang porte, soulignant l'utilisation principale du butyrate par les colonocytes (Cummings *et al.*, 1987).

Plusieurs études ont rapporté une accumulation caecale d'acides organiques et d'AGCC, par des modèles de fermentation *in vitro* ou chez des rats soumis à des régimes contenant des oligosaccharides ou des fructo-oligosaccharides (Berggren *et al.*, 1995 ; Campbell *et al.*, 1997 ; Henningson *et al.*, 2001). Les conséquences sont similaires lors d'une malabsorption chez l'Homme : la fermentation colique du lactose conduit à une augmentation des concentrations en AGCC entraînant une modification du ratio acétate:propionate:butyrate qui est de 1:0.25:0.25 (M:M:M), 5 heures après ingestion (He *et al.*, 2006). Une étude *ex vivo* a comparé l'évolution des concentrations d'acides organiques et d'AGCC présents dans des échantillons fécaux d'individus tolérants et intolérants, durant cinq heures d'incubation en anaérobiose et au contact de lactose (He *et al.*, 2005). Les résultats montrent que les concentrations d'acétate, de propionate, de butyrate et de DL-lactate sont significativement plus importantes et plus rapidement produites chez les malabsorbeurs intolérants (**Figure 21**). Par contre, ni le degré d'hydrolyse du lactose ni la production de glucose et de galactose ne présente de différence significative entre les deux groupes. Cela suggère que la survenue des symptômes dépend d'avantage de la vitesse de production des métabolites microbiens que de la vitesse et du taux d'hydrolyse du lactose (He *et al.*, 2008). Cependant cette étude ne tient compte que de la flore fécale, constituée de flore mucosale et de flore non adhérente, et n'est donc pas strictement identique au microbiote intestinal. De plus cette étude *ex vivo* ne considère pas la capacité d'absorption colique par l'hôte, et le suivi sur seulement cinq heures ne peut pas mettre en évidence l'adaptation du microbiote colique et les conséquences sur la physiologie de l'hôte. Enfin, certains sujets malabsorbeurs ne ressentant aucun symptôme, il aurait été intéressant d'ajouter un troisième groupe composé de malabsorbeurs asymptomatiques.

Ainsi, les études *in vitro* soulignent une accumulation d'acides organiques et d'AGCC dans la lumière colique en raison d'une conversion microbienne insuffisante pour contrecarrer leur production mais ne peuvent évaluer la capacité de réabsorption par l'hôte. Aucune étude *in vivo*, tant chez l'Homme que chez l'animal, n'a pour le moment précisé ces données.

#### Les gaz

Le dioxyde de carbone et l'hydrogène sont les gaz directement issus de la fermentation colique des polysaccharides. Leur production a notamment lieu dans le côlon droit et gauche (Flourié *et al.*, 1991). Chez les méthano-excréteurs, le méthane est produit par réduction du dioxyde de carbone par l'hydrogène. La production de ces différents gaz crée alors une distension abdominale, contribuant à l'apparition des symptômes comme les maux de ventre et les ballonnements. Il est cependant intéressant de préciser que les flatulences sont seulement constituées de 16 % de dioxyde de carbone, d'hydrogène et de méthane, le reste étant de l'air ingéré (Levitt *et al.*, 1998).

### **II. 2.3. Recyclage et utilisation par l'hôte des métabolites bactériens**

#### Réabsorption des gaz

Le dioxyde de carbone, l'hydrogène et le méthane peuvent être réabsorbés par l'hôte. Ils passent alors de la paroi colique à la veine porte par diffusion simple. Après le foie, ils entrent dans la circulation systémique puis sont transportés jusqu'aux poumons où ils sont expirés (proportions relatives : 4%, < 0.01%, < 0.01%).

#### Réabsorption des AGCC

La réabsorption des AGCC au niveau caecal et colique est très intense et seulement 5 à 10 % sont excrétés dans les fèces (Roediger *et al.*, 1987 ; Ruppin *et al.*, 1980). Les AGCC représentent donc une source significative de récupération d'énergie mais dont la quantification précise est délicate (Jeppesen *et al.*, 1999 ; Mortensen *et al.*, 1996).

Les mécanismes de réabsorption dépendent des conditions au sein de la lumière et notamment du pH (**Figure 22**). Dans le caecum et le côlon proximal où le pH est acide, les AGCC diffusent selon un gradient de concentration sous forme protonée (non ionisée) qui est liposoluble. Cette diffusion ne nécessite pas d'énergie. Elle est facilitée par deux transporteurs principaux : le MCT1 (Monocarboxylate Transporter 1) et le sMCT1 (sodium Monocarboxylate Transporter 1). Le fonctionnement de ce dernier est couplé à l'absorption du sodium (échange  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ ) mais son affinité pour le butyrate est moindre que celle de

MCT1. Ces transporteurs sont peu spécifiques, dans la mesure où ils transportent des AGCC mais aussi d'autres acides monocarboxyliques comme le lactate, le pyruvate et des acides gras branchés (Ganapathy *et al.*, 2008 ; Mark *et al.*, 2002). Dans le côlon médian et distal où le pH est proche de la neutralité, la réabsorption des AGCC implique un système de transport facilité. Les AGCC sous forme ionisée, non liposoluble, sont absorbés parallèlement à la sécrétion d'ions bicarbonates au niveau de la membrane apicale et basale des colonocytes (Reynolds *et al.*, 1993). Ce dernier système d'échange est le principal car les AGCC sont des acides faibles ( $pK_a \approx 4.8$ ), présente une grande spécificité des acides gras de 2 à 5 atomes de carbones, est présent au niveau de la bordure en brosse des cellules des villosités et est absent au niveau des cellules cryptiques (Manokas *et al.*, 1998).

#### Utilisation métabolique par l'hôte

Une fois réabsorbés, les AGCC sont métabolisés en trois sites : les colonocytes, le foie et les tissus périphériques. Les colonocytes de l'épithélium utilisent le butyrate comme principal substrat énergétique, en partie car sa constante de Michaelis ( $K_m$ ) est la plus basse de tous les AGCC (acétate : 0.49 mmol/L, propionate : 0.34 mmol/L, butyrate : 0.18 mmol/L) (Clausen *et al.*, 1994). Au niveau du côlon proximal, jusqu'à 90 % du butyrate peut être oxydé en corps cétoniques et  $\beta$ -hydroxybutyrate, avec consommation d'oxygène et production de gaz carbonique. Ces métabolites servent ensuite de précurseurs à la synthèse de lipides dans la muqueuse. La fraction d'AGCC non oxydée *in situ* atteint le système veineux portal puis le foie, qui métabolise essentiellement le propionate, le butyrate résiduel et une partie de l'acétate pour la néoglucogénèse (Cummings *et al.*, 1987). L'acétate restant est utilisé par les autres tissus (les reins, le cœur et les muscles) pour la synthèse d'acides gras à longue chaîne et de  $\beta$ -hydroxybutyrate.

La réabsorption et l'utilisation énergétique retardée des AGCC a déjà été mise en évidence par des mesures d'échanges respiratoires (calorimétrie indirecte), chez l'animal et chez l'Homme, après consommation de fibres alimentaires. L'intensité et la cinétique de cette récupération énergétique dépendent du type de fibre ingéré (cellulose, arabinoxylane, amidon, pectine) (Aust *et al.*, 2001). On peut donc supposer que l'utilisation métabolique retardée est également visible dans le cas de la malabsorption du lactose, celui-ci se comportant alors comme une fibre fermentescible.

## **EN RESUME**

La chaîne d'utilisation des polysaccharides non digérés participe à la diversité taxonomique, fonctionnelle et métabolique du microbiote intestinal. Le microbiote joue également un rôle essentiel dans la dégradation du lactose malabsorbé dont la fermentation colique conduit à la production de gaz et d'AGCC. L'accumulation de ces métabolites bactériens serait en partie responsable du déclenchement de l'intolérance. Cependant, l'utilisation ultérieure de ces composés est rendue possible par l'activité de micro-organismes spécifiques. Leur recyclage par l'hôte et/ ou le microbiote permettrait ainsi de réduire les symptômes d'intolérance et assure également une récupération partielle d'énergie.

### **III. Conséquences de l'ingestion aiguë et chronique de lactose chez les malabsorbeurs**

#### **III. 1. CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES MALABSORBEURS**

##### **III.1.1 Consommation de lactose**

Lors de certaines études portant sur la malabsorption ou l'intolérance au lactose, des recueils alimentaires sont proposés aux volontaires. De façon générale, la consommation de lactose ou de sources de lactose est plus faible chez les sujets malabsorbeurs que chez les sujets absorbeurs. Mais la significativité de ces différences restent discutée (Escribano Subias *et al.*, 1993 ; Lember *et al.*, 2006 ; Hutyra *et al.*, 2009 ; Szilagy *et al.*, 2009 ; Keith *et al.*, 2011 ).

##### **III.1.2 Caractéristiques du microbiote du malabsorbeur**

Peu de travaux ont étudié la composition du microbiote intestinal de sujets malabsorbeurs sans charge de lactose. Cependant les analyses qualitative et quantitative du microbiote intestinal pourraient apporter des informations complémentaires sur les mécanismes mis en jeu lors du déclenchement, plus ou moins rapide, des symptômes d'intensité variable ainsi que sur leur modulation au cours du temps. En effet, les symptômes cliniques développés après une ingestion ponctuelle de lactose chez les sujets malabsorbeurs sont hétérogènes (Ceriani *et al.*, 1991 ; Suarez *et al.*, 1995 ; De Vresse *et al.*, 2001). Une étude a évalué le degré de digestion du lactose et le temps de transit oro-caecal, chez des sujets absorbeurs, malabsorbeurs avec des symptômes modérés et malabsorbeurs avec des symptômes sévères, après ingestion de <sup>13</sup>C-lactose et de <sup>2</sup>H-glucose. Le degré de digestion du lactose et le temps de transit oro-caecal étaient significativement différents entre les absorbeurs et tous les malabsorbeurs, mais similaires entre les sujets malabsorbeurs présentant des symptômes modérés et ceux présentant des symptômes sévères (Vonk *et al.*, 2003). Cette étude conclut que le degré de digestion du lactose et le temps de transit oro-caecal sont des facteurs intervenant dans le déclenchement des symptômes et suggère que d'autres facteurs, comme par exemple la composition et l'activité du microbiote intestinal, détermineraient l'intensité des symptômes.

Quelques études ont quantifié, par des techniques de dénombrement après culture, les principales espèces bactériennes présentes dans les selles de malabsorbeurs comme les bifidobactéries, les lactobacilles, les entérobactéries et les anaérobies totales (Szilagyi *et al.*, 2009 ; Szilagyi *et al.*, 2010). On observe généralement une légère augmentation, mais non significative, du nombre de bactéries totales chez les individus malabsorbeurs après une ingestion prolongée de lactose (Szilagyi *et al.*, 2010). Par ailleurs, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la composition fécale et l'ingestion chronique de lactose, toute source confondue (Szilagyi *et al.*, 2009). Une analyse plus fine consisterait à comparer les malabsorbeurs avec des symptômes modérés versus les malabsorbeurs avec des diarrhées.

Les dénombrements par des techniques moléculaires, ne nécessitant pas de culture préalable des micro-organismes, confirment un plus grand nombre de flore totale et de certains groupes bactériens. Ces techniques sont notamment la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) qui utilise des sondes fluorescentes pour marquer des séquences spécifiques de l'ADN et le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) qui est un colorant fluorescent se liant à des régions spécifiques de l'ADN riches en A et T, et sont souvent couplées à de la microscopie fluorescente. Après une charge de lactose, le nombre de bactéries totales et ceux de différents groupes (*Bacteroides*, *Eubacterium/ Clostridium coccoïdes*, *Apotobium*, *Bifidobacterium*) étaient globalement, mais non significativement, plus élevés dans les selles des sujets présentant des symptômes modérés que dans les selles des sujets présentant des symptômes sévères. Des corrélations négatives ont été également obtenues entre le score des symptômes et la quantité de bactéries totales, suggérant que la charge microbienne pourrait jouer un rôle essentiel dans la réduction des symptômes de l'intolérance au lactose (Zhong *et al.*, 2004).

### **III. 1.3 Activité enzymatique fécale**

La principale activité enzymatique étudiée dans les selles est l'activité beta-galactosidase. Aucune différence significative n'est observée après ingestion de lactose entre les sujets absorbeurs et les sujets malabsorbeurs, ni dans le pourcentage ou le type d'espèces bactériennes présentant cette activité enzymatique ni dans l'activité fécale. Ces résultats suggèrent donc que la quantité de bactéries beta-galactosidase positive joue un rôle mineur dans l'apparition des symptômes lors d'une ingestion de lactose (He *et al.*, 2005 ; Szilagyi *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'activité beta-galactosidase ne semble pas corrélée à l'ingestion quotidienne de lactose, toute source confondue (Szilagyi *et al.*, 2009).

### **III. 2. EFFETS D'UNE INGESTION AIGUE DE LACTOSE, CHEZ LE MALABSORBEUR**

L'origine et les mécanismes de survenue de l'intolérance ne sont pas entièrement élucidés. Même si la malabsorption est associée à différentes modifications digestives comme la réduction du temps de transit oro-caecal, la variation de la motilité intestinale, la stimulation de l'activité fermentaire du microbiote intestinal et l'augmentation de la sensibilité viscérale (Marteau *et al.*, 2001), leur contribution relative dans le déclenchement et l'intensité des symptômes n'est pas clairement définie (**Figure 23**).

Depuis les années 2000, plusieurs travaux se sont ainsi intéressés à l'impact de ces modifications digestives sur le déclenchement et l'intensité des symptômes de l'intolérance.

#### **III. 2.1 Réduction du temps de transit oro-caecal**

Contrairement au glucose toujours bien absorbé et associé à des temps de transit similaires entre absorbeurs et malabsorbeurs (300 minutes en moyenne), l'ingestion de lactose est associée à des temps de transit différents dans ces deux populations (300 minutes en moyenne chez les absorbeurs et 100 minutes en moyenne chez les malabsorbeurs) (He *et al.*, 2006).

Le lactose présente également un effet-dose sur le temps de transit intestinal des malabsorbeurs : une quantité ingérée divisée par quatre (de 50 g à 12 g) multiplie par cinq le temps de transit oro-caecal, réduisant ainsi significativement les symptômes et notamment les diarrhées (Labayen *et al.*, 2001 ; Ladas *et al.*, 1982). Cette normalisation du temps de transit par réduction de la dose de lactose ingéré s'observe aussi chez les individus malabsorbeurs présentant une pullulation de l'intestin grêle (Tursi *et al.*, 2006). Réciproquement, une étude a montré qu'un retard de vidange gastrique, provoqué par ingestion de propantheline ou de lopéramide, augmente le temps de transit oro-caecal et améliore la tolérance des malabsorbeurs (Peuhkuri *et al.*, 1999 ; Szilagyi *et al.*, 2000). Cette amélioration de tolérance au lactose, consécutive à une augmentation du temps de transit s'observe également lors des grossesses (Szilagyi *et al.*, 1996).

L'impact et l'effet dose du lactose ingéré sur le temps de transit oro-caecal semblent suggérer sa potentielle implication dans le déclenchement des symptômes. Mais une étude a montré que le transit oro-caecal et la survenue des symptômes n'étaient pas significativement

différents entre des absorbeurs et des malabsorbeurs du lactose, après ingestion de lactose ou de glucose (He *et al.*, 2006) (**Figure 24**). Par ailleurs, les malabsorbeurs présentant des symptômes et les malabsorbeurs sans symptômes ne présentent pas de temps de transit oro-caecaux significativement différents (Vonk *et al.*, 2003).

Ainsi, bien que l'ingestion de lactose soit associée à une réduction du temps de transit intestinal chez les malabsorbeurs, et ce de façon croissante avec les doses ingérées, aucun lien avec le déclenchement des symptômes n'a été démontré.

### III. 2.2 Variations de la motricité intestinale et colique

Certains travaux ont montré que les variations de temps de transit et de flux intestinaux, associés à une malabsorption, modifiaient les motilités intestinale et colique. Ces variations de l'activité contractile des cellules musculaires intestinales ont été mises en évidence par contact entre cellules épithéliales et AGCC (Blottiere *et al.*, 1994 ; Squires *al.*, 1992) ou par une malabsorption mimée via l'ingestion de lactulose (Barrow *et al.*, 1992 ; Bruley des Varannes *et al.*, 1992).

D'autres travaux ont étudié la concordance entre les pics d'activité motrice intestinale et la survenue des symptômes chez l'Homme, après ingestion de lactulose ou de saccharose suivie d'une infusion colique de lactulose (afin de court-circuiter l'intestin grêle). Ces études partent de la supposition qu'une stimulation d'activité motrice pourrait engendrer une partie des douleurs intestinales (Jouët *et al.*, 2002). Le pic d'activité motrice du côlon est observé une heure après l'ingestion de lactulose ou de saccharose suivie d'une infusion colique de lactulose, avec un retour à la motilité de base après quatre heures (**Figure 25**). Cette période de une à quatre heures après l'ingestion du repas correspond bien à la fenêtre de survenue des symptômes, similaires entre les deux groupes, suggérant ainsi que les symptômes d'intolérance proviennent du côlon et non de l'intestin grêle. Cependant, les événements moteurs coliques et les symptômes ne présentent aucune corrélation significative et ne coïncident que dans 37 % des cas. Il est par contre intéressant de souligner que l'amplitude des événements joue un rôle non négligeable puisque les événements de grande amplitude coïncident dans 52 % des cas avec la survenue d'un symptôme (Bassotti *et al.*, 1992 ; Lemann *et al.*, 1995).

### III. 2.3 Augmentation de la sensibilité viscérale

La sensibilité viscérale est un symptôme complexe à étudier objectivement. De façon générale, elle est définie comme une sensibilité douloureuse sous la dépendance du système neurovégétatif sympathique et parasympathique, c'est-à-dire du système nerveux autonome. Son exploration chez l'homme repose le plus souvent sur des méthodes de stimulation mécanique (tests de distension).

La sensibilité viscérale est décrite par certains malabsorbeurs mais est non systématique. En effet, aucune corrélation significative n'a jusqu'à présent été mise en évidence entre malabsorption et intolérance, et environ 25 % des sujets malabsorbeurs n'identifieraient pas leurs symptômes (Bayless *et al.*, 1975).

Pourtant, il est reconnu que les sujets âgés présentent une réduction significative de leur tolérance au lactose ainsi qu'un abaissement significatif de leur seuil de sensibilité viscérale. Cela suggère donc une corrélation entre le seuil de sensibilité viscérale et l'expression des symptômes de malabsorption (Di Stefano *et al.*, 2001).

Afin de préciser la survenue de cette sensibilité, une étude s'est intéressée aux corrélations entre la sensibilité viscérale et les symptômes ressentis chez des sujets tolérants et intolérants au lactose. Il en est ressorti que le seuil de sensibilité viscérale, mesuré par le test de distension rectale, était identique chez les sujets à jeun, tolérants ou intolérants au lactose ( $7 \pm 1$  mmHg). Après ingestion de lactulose, ce seuil ne variait pas de façon significative chez les sujets tolérants au lactose mais diminuait de façon significative chez les sujets intolérants au lactose. Cette réduction était par ailleurs fortement corrélée aux scores cumulés des différents symptômes ( $r = 0.91$ ). La modification des seuils de sensibilité n'a par contre pas présenté de corrélation avec les paramètres de transit gastro-intestinal (Di Stefano *et al.*, 2007). Ces résultats mettent en évidence la corrélation entre sensibilité viscérale et intolérance mais sans prendre en compte la malabsorption. Il aurait été intéressant d'ajouter un groupe de malabsorbeurs asymptomatiques afin de voir si, de même que pour les autres paramètres, leur sensibilité viscérale était comparable à celle des tolérants.

Ainsi, souvent associée à tort à de la psychosomatie, la sensibilité viscérale est positivement corrélée aux symptômes de l'intolérance et devrait d'avantage être prise en compte dans la démarche diagnostique.

### **III. 3. EFFETS D'UNE INGESTION CHRONIQUE DE LACTOSE ET MISE EN PLACE DES MECANISMES D'ADAPTATION, CHEZ LE MALABSORBEUR**

#### **III. 3.1 Modifications anatomiques**

Des études sur animaux sevrés révèlent des modifications anatomiques suite à une ingestion chronique de lactose pendant plusieurs mois. En effet, une hypertrophie de l'intestin grêle, du caecum et des reins a été observée chez des rats ayant reçu un régime équilibré contenant 40 % de lactose, pendant 9 mois. Ces modifications structurales peuvent s'expliquer par une accumulation d'eau dans les différents organes digestifs, suite à l'augmentation de la charge osmotique. Un effet-dose est également souligné avec des manifestations moindres chez les groupes recevant du lactose partiellement hydrolysé (David *et al.*, 1980).

Ces conséquences sont cependant réversibles puisque la réintroduction d'un régime standard ou contenant un disaccharide facilement absorbable comme le saccharose, induit une réduction de la taille et du poids des organes digestifs dès une semaine (Collares *et al.*, 1985). Cependant, aucune étude similaire n'a été menée chez l'Homme.

#### **III. 3.2 Modifications fonctionnelles**

Une ingestion chronique de lactose semble également modifier le métabolisme du lactose et de ses sucres réducteurs associés. Malgré le peu de travaux étudiant ces modifications fonctionnelles, un tel régime impacterait la composition du foie. Une étude chez le rat révèle ainsi une augmentation d'environ 130 % de sa teneur en thiamine et une diminution d'environ 16 % de sa teneur en cholestérol, après neuf mois de régime contenant du lactose. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement décrits mais ces modifications semblent spécifiques à la malabsorption du lactose puisqu'elles ne s'observent pas lors d'un régime composé de lactose pré-hydrolysé (Frangne *et al.*, 1983).

Un régime similaire semble aussi stimuler l'excrétion urinaire du galactose et du galactitol chez le rat. En effet, un régime contenant 40 % de lactose provoque, dès la première semaine, une lactosurie à hauteur de 0.36 % du lactose ingéré, suivie de l'apparition de galactose et de galactitol dans les urines. Après huit mois, le galactose et le galactitol excrétés dans les urines représentent 5 % du lactose ingéré et la rétention apparente du lactose est alors d'environ 95 % (Poiffait *et al.*, 1982).

L'impact du lactose sur la rétention gastrique est également étudié par mesure de la rétention spécifique à chaque nutriment. Après un mois de régime contenant 20 % de lactose, les taux de rétention d'une infusion contenant 2.5 % de glucose + 2.5 % de galactose diminuent significativement, alors que les taux de rétention d'infusions contenant 5 ou 10 % de lactose restent inchangés par rapport au groupe contrôle. Par ailleurs, les activités lactase ne révèlent aucune différence significative. Au vu de ces résultats, une ingestion prolongée de lactose modifierait le temps de vidange gastrique d'une solution contenant jusqu'à 5 % de monosaccharides. Le mécanisme proposé est la désensibilisation d'un récepteur intestinal, probablement par effet osmotique du lactose (Da Costa Pinto *et al.*, 1997).

De même que pour les modifications anatomiques, aucune étude clinique ne permet pour le moment d'extrapoler ces résultats à l'Homme.

### III. 3.3 Modifications du microbiote intestinal et de son activité métabolique

Le lait et ses produits dérivés ont été introduits dans l'alimentation de diverses populations, parmi lesquelles on compte des intolérants au lactose. Des intolérances ont été fréquemment rapportées au début de l'introduction du lait mais n'étaient que temporaires, avec une disparition quasi-totale après quelques semaines. Or la lactase n'étant pas une enzyme inductible : l'ingestion régulière de lactose ne stimule ni sa synthèse ni son activité catalytique au niveau du jéjunum (sécrétion jéjunale) (Gilat *et al.*, 1972). L'hypothèse avancée pour expliquer cette amélioration de tolérance est une modification du microbiote intestinal améliorant la faculté de digestion du lactose. L'adaptation du microbiote intestinal correspond à la modulation de ses espèces constitutives et de son activité métabolique.

#### Paramètres témoins d'une adaptation

La modulation intestinale a été initialement décrite chez l'Homme, lors d'une ingestion chronique de fibres fermentescibles comme le son de blé ou le lactulose (Cummings *et al.*, 1976 ; Florent *et al.*, 1985) puis lors d'une ingestion chronique de lactose (Briet *et al.*, 1997 ; Hertzler *et al.*, 1996). Les différents travaux ont abouti aux mêmes conclusions, à savoir qu'une ingestion prolongée d'une dizaine de jours conduisait à (**Figure 26**) :

- Une réduction du pH fécal et de l'excrétion d'hydrogène.
- Une augmentation de l'activité beta-galactosidase et du catabolisme du lactulose et du lactose dans les fécès.
- Une amélioration des symptômes cliniques, notamment des diarrhées.

Cependant, une étude a montré qu'il existait aussi une amélioration clinique sans autres signes d'adaptation métabolique dans le groupe contrôle recevant un régime chronique de saccharose (Briet *et al.*, 1997). Pour cet auteur, l'amélioration de tolérance au lactose serait plus un effet placebo qu'une réelle adaptation. De nouvelles études randomisées en double aveugle et contre placebo sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats.

#### Modulation de la composition du microbiote

L'adaptation des espèces constitutives en situation de malabsorption intestinale d'un sucre a été très étudiée dans les années 2000 mais seules les bactéries lactiques, notamment lactobacilles et bifidobactéries, ont été étudiées. La prolifération des lactobacilles et des bifidobactéries a été montrée *in vitro* (Beards *et al.*, 2010 ; Jiang *et al.*, 1997) et *ex vivo* par la mise en culture de selles de volontaires humains (He *et al.*, 2008 ; Hertzler *et al.*, 1996 ; Zhong *et al.*, 2004). Ces études ont notamment montré que la dégradation du lactose, l'activité lactasique et la production de D-lactate étaient optimales à un pH de 6.7, et que l'ajout de bifidobactéries optimisait la dégradation du lactose, diminuait la concentration de D-lactate et augmentait la concentration d'acétate. Les bifidobactéries semblent donc améliorer la fermentation du lactose et moduler les profils d'acides organiques et d'AGCC, dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*. Certaines études soulignent notamment la corrélation négative entre modulation de flore fécale et les symptômes d'intolérance dès quinze jours d'ingestion de lactose (**Figures 27**) (He *et al.*, 2008 ; Zhong *et al.*, 2004) alors que d'autres révèlent des tendances mais sans corrélation significative (Szilagy *et al.*, 2010). Cependant la flore fécale étant une combinaison d'une flore résidente et d'une flore en transit, l'étude de sa modulation n'apporte qu'une information partielle sur la modulation globale du microbiote intestinal. Par ailleurs, les techniques d'analyses bactériologiques utilisées dans ces études reposent généralement sur de la mise en culture classique alors que des techniques plus sophistiquées, comme la FISH ou la PCR en Temps Réel, optimiseraient le suivi de cette modulation spatio-temporelle (He *et al.*, 2006).

Des études animales complémentaires, évaluant l'adaptation du microbiote dans les différents segments coliques, permettraient d'apporter des informations intéressantes même s'il faut garder à l'esprit que ces résultats ne seraient probablement pas directement extrapolables à l'Homme.

#### Recyclage des métabolites bactériens

Pendant longtemps, une fermentation colique excessive associée à une surproduction de métabolites microbiens semblait constituer l'origine quasi exclusive des symptômes de

l'intolérance. Or certaines études ont montré que la réduction de capacité fermentaire était également responsable de diarrhées osmotiques (Holtug *et al.*, 1992) et que réciproquement, les patients souffrant de diarrhées chroniques présentaient de faibles productions d'acétate et de propionate (Treem *et al.*, 1996). Certains chercheurs ont alors suggéré que l'utilisation et la réabsorption rapide des AGCC au niveau de la muqueuse colique stimuleraient la réabsorption d'eau et d'électrolytes, réduisant ainsi la survenue des symptômes et des diarrhées osmotiques (Clausen *et al.*, 1994 ; Ganapathy *et al.*, 2008 ; Jeppesen *et al.*, 1999 ; Manokas *et al.*, 1998 ; Reynolds *et al.*, 1993).

La réutilisation métabolique des produits fermentaires assurée par le microbiote intestinal ainsi que leur absorption et/ ou utilisation *in situ* par l'hôte expliqueraient alors que certains malabsorbeurs puissent consommer de petites quantités de lactose sans manifestation d'intolérance. Cependant, le recyclage des métabolites bactériens reste peu étudié et des études *in vivo* sont nécessaires pour confirmer l'hypothèse d'une stimulation d'activité lors d'une malabsorption chronique de lactose.

### **III. 3.4 Modulation des symptômes**

L'idée d'une modulation des symptômes est envisagée depuis les années 1970 (Habte *et al.*, 1973 ; Sadre *et al.*, 1979) mais a réellement été décrite par Hertzler et Savaiano (Hertzler *et al.*, 1996). Leur étude portait sur vingt sujets intolérants au lactose ayant consommé quotidiennement du lactose à hauteur de 1g/ kg pc, pendant seize jours. Les mesures d'hydrogène expiré sur les trois heures post ingestion de lactose et le score des symptômes étaient significativement inférieurs après la période d'adaptation qu'avant. Une étude plus récente (Szilagyi *et al.*, 2004), mais ne portant que sur un sujet (case report), a montré des résultats similaires avec des précisions supplémentaires concernant :

- la spécificité de l'adaptation au polysaccharide consommé : dans cette étude, l'ingestion chronique de lactose induit une adaptation au lactose mais pas au lactulose,
- la possibilité d'inverser cette adaptation lorsque le polysaccharide n'est plus consommé quotidiennement : les auteurs rapportent qu'après plusieurs jours de non ingestion de lactose, les paramètres de malabsorption et d'intolérance reviennent à l'état initial d'avant l'adaptation.

## EN RESUME

Chez le sujet absorbeur, l'ingestion aigue de lactose est associée à son hydrolyse jéjunale, suivie de l'utilisation métabolique du glucose et du galactose libérés. Chez le malabsorbeur, l'ingestion aigue de lactose est associée à une réduction du temps de transit oro-caecal, à une augmentation de la sensibilité viscérale et à l'apparition de symptômes gastro-intestinaux d'intensité variable dont les origines précises restent discutées.

Sans ingestion de lactose, la composition et l'activité du microbiote fécal ne semblent pas significativement différentes entre les absorbeurs et les malabsorbeurs. Pourtant, une adaptation du microbiote intestinal semble survenir consécutivement à l'ingestion régulière de lactose, via une réorientation de son métabolisme vers le recyclage des produits de fermentations permettant alors la réduction des symptômes d'intolérance (He *et al.*, 2008). L'hypothèse d'un microbiote relativement plus adaptable chez les malabsorbeurs asymptomatiques serait ainsi envisageable.

Le lactose malabsorbé et ingéré de façon prolongée semble donc être favorable à l'hôte en régulant la composition, la dynamique et l'activité métabolique de son microbiote intestinal. Ces propriétés correspondent à la définition des prébiotiques (Gibson *et al.*, 1995) et suggèrent que le lactose malabsorbé pourrait être considéré en tant que tel (Szilagyi *et al.*, 2002 ; Szilagyi *et al.*, 2004).

Cependant, les conséquences de cette modulation sur la physiologie de l'hôte restent controversées en raison de l'utilisation de techniques d'analyse variées en termes de nombre de sujets, de critères de jugement et de durée de suivi.

## **IV. Méthodes de diagnostic de l'intolérance au lactose**

La mise en évidence des troubles intestinaux liés à l'intolérance au lactose peut se faire :

- par des techniques directes qui évaluent l'activité de la lactase ou sa biosynthèse par l'hôte,
- par des techniques indirectes qui évaluent soit la malabsorption du lactose (par identification de ses métabolites coliques) soit l'intolérance au lactose (par identification des symptômes déclenchés).

Cependant ces méthodes présentent divers avantages et inconvénients, détaillés ci-dessous. Leur évaluation repose notamment sur leur sensibilité et spécificité. La sensibilité d'un test est sa capacité à donner un résultat positif quand la maladie est présente (un test sensible limite les faux négatifs) et sa spécificité est sa capacité à donner un résultat négatif quand la maladie est absente (un test spécifique limite les faux positifs).

### **IV. 1. LES METHODES DETECTANT L'HYPOLACTASIE**

#### **IV. 1.1 La biopsie intestinale**

Le diagnostic de l'hypolactasie peut se faire par biopsie duodénale et/ ou jéjunale et dosage des activités lactase, sucrase et maltase des cellules épithéliales. L'hypolactasie est suggérée pour un ratio lactase/ sucrase inférieur à 0.3 et une activité lactase inférieure à 10 UI/g de protéines (Dahlqvist A *et al.*, 1970). La biopsie intestinale a longtemps été considérée comme la technique de référence. Cependant, ce dosage ne permet pas un diagnostic absolu car le site de prélèvement est souvent proximal alors qu'il peut exister une activité lactase en partie distale permettant une absorption normale du lactose (Newcomer *et al.*, 1975). Un nouveau test, basé sur une réaction colorimétrique appréciant l'activité lactasique sur des biopsies duodénales, a été développé en 2007. Il est plus rapide que les anciens tests, également basés sur une réaction colorimétrique, avec seulement vingt minutes nécessaires pour le dosage. Il présente par ailleurs une bonne fiabilité avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 100% (Kuokkanen *et al.*, 2006).

### **IV.1.2 Le test génétique**

Le diagnostic de l'hypolactasie peut également se faire par un test génétique, réalisé sur un frottis de la cavité buccale. Ce test permet d'identifier certaines mutations connues en amont du gène LCT, à l'aide d'une étude par PCR. Les polymorphismes C/T-13910 et T/T-13910 sont étroitement associés au phénotype tolérant ; le génotype C/C-13910 est associé au phénotype intolérant. Les sensibilités et spécificités rapportées pour ce test s'étendent respectivement de 93 à 100 % et de 95 à 100 % chez l'adulte (Di Stefano *et al.*, 2009 ; Rasinpera *et al.*, 2004). Cependant, le rôle du polymorphisme dans la réduction de la transcription du gène reste encore discuté.

## **IV. 2. LES METHODES DETECTANT LA MALABSORPTION**

### **IV. 2.1 Le principe des tests de charge**

Contrairement au dosage de l'activité lactase sur biopsie intestinale ou au test génétique, les techniques indirectes suivent l'apparition des métabolites du lactose une fois absorbés dans le sang ou une fois excrétés dans les selles, les urines et les gaz expirés (**Figure 28**). L'ingestion préalable d'une charge de lactose est donc nécessaire pour la réalisation de ces tests. Initialement, la dose de lactose utilisée pour les tests de tolérance était de 2 g/kg de poids corporel jusqu'à une dose maximale de 50 g (Newcomer *et al.*, 1975). Mais cette dose étant supra-physiologique, certains auteurs se sont attachés à la réduire et ont proposé une dose intermédiaire de 25 g de lactose (Rosado *et al.*, 1983). Récemment, une nouvelle réduction a été proposée à 12.5 g de lactose, assurant un maintien de la fiabilité des tests respiratoires (Argnani *et al.*, 2008). Ces tests étant basés sur le suivi dynamique des métabolites du lactose, ils nécessitent donc d'établir un niveau de base (pré-ingestion) afin d'évaluer correctement la réponse (post-ingestion).

### **IV. 2.2 Le suivi de la glycémie et de la galactosémie**

L'étude dynamique de la glycémie s'effectue toutes les quinze minutes, pendant une heure après l'ingestion de lactose. Une hausse de la glycémie supérieure à 1.7 mmol/l reflète une absorption normale du lactose alors qu'une hausse inférieure à 1.1 mmol/l suggère l'existence

de sa malabsorption. La zone comprise entre 1.1 et 1.7 mmol/ l était jusqu'alors délicate à interpréter (Borgstrom *et al.*, 1973) mais un pic seuil a été proposé à 1.4 mmol/l afin de simplifier le diagnostic (Ridefelt *et al.*, 2005). Les sensibilités et spécificités rapportées s'étendent toutes deux de 75 à 100 % (Arola *et al.*, 1994). L'analyse conjointe de la glycémie et de la galactosémie a été proposée afin d'optimiser la fiabilité de ce test de tolérance. Pour cela, une ingestion conjointe de lactose et d'éthanol (150 mg/ kg) est réalisée afin d'inhiber la conversion hépatique du galactose et de faciliter le dosage de la galactosémie. Cette combinaison semble assurer une amélioration de la sensibilité et de la spécificité du test qui sont alors respectivement de 97 % et 93 % (Arola *et al.*, 1994).

De façon similaire, le  $^{13}\text{C}$ -glucose peut être dosé dans le plasma, après l'ingestion d'un mélange de  $^{13}\text{C}$ -lactose (25 g) et de  $^2\text{H}$ -glucose (0.5 g), ce dernier servant de standard interne. Une malabsorption est diagnostiquée pour une concentration plasmatique en  $^{13}\text{C}$ -glucose inférieure à 2 mmol/ l (Vonk *et al.*, 2000) et/ ou pour un ratio de concentrations plasmatiques  $^{13}\text{C}$ -glucose/  $^2\text{H}$ -glucose inférieur à 0.46 (Vonk *et al.*, 2001). Cette technique augmente nettement la fiabilité, notamment la sensibilité du diagnostic, puisqu'environ 50 % de malabsorbeurs supplémentaires sont ainsi identifiés. Bien que fiable et précis, ce test est peu utilisé en raison de ses coûts d'analyse (Vonk *et al.*, 2001).

#### **IV. 2.3 La quantification du galactose dans les urines**

Le dosage du galactose dans les urines a également été proposé. Pour les mêmes raisons que le test sanguin, éthanol et lactose sont ingérés conjointement. Le test urinaire se fait quarante minutes après ingestion et une quantité de galactose inférieure à 2.0 mmol/l témoignerait de la malabsorption du lactose. Les sensibilités et spécificité rapportées pour cette méthode varient de 77 à 96 % et de 88 à 100 % (Arola *et al.*, 1994).

Un nouveau test équivalent a été récemment développé en Espagne. Il consiste à doser le xylose excrété dans les urines (ou présent dans le sang), après ingestion de 3 g de 4-galactosyl-xylose. De façon similaire au lactose, ce disaccharide est hydrolysé au niveau jéjunal par la lactase. Contrairement au galactose qui est converti dans le foie, le xylose n'est pas métabolisé et sa quantité retrouvée dans les urines (ou dans le sang) reflète directement la quantité de disaccharide hydrolysée et absorbée. La sensibilité et la spécificité rapportées pour ce test, chez le rat, sont respectivement de 91 et 93 % mais ces valeurs n'ont pas encore été confirmées chez l'Homme (Hermida *et al.*, 2006).

#### **IV. 2.4 Le suivi du pH des selles et identification de sucres réducteurs**

L'analyse des selles repose sur la mesure du pH par un papier indicateur et la recherche de sucres réducteurs par une technique chromatographique. Une malabsorption est suggérée pour un pH inférieur à 6 et/ ou une teneur de sucres réducteurs supérieure à 0.5 % w/w (Soeparto *et al.*, 1972). Cependant, les sensibilités et spécificités de ces tests sont faibles car d'une part, la mesure du pH manque de fiabilité chez les adultes (Soeparto *et al.*, 1972) et d'autre part, la quantité de sucres réducteurs peut être biaisée par la motilité intestinale et la réabsorption d'eau (Arola *et al.*, 1994).

#### **IV. 2.5 Le suivi de l'hydrogène expiré**

Le test respiratoire à l'hydrogène est, depuis les années 1970, une des techniques les plus utilisées (Levitt *et al.*, 1970 ; Metz *et al.*, 1976 ; Solomons *et al.*, 1980). Ce test repose sur la quantification de l'hydrogène contenu dans l'air expiré. La malabsorption est diagnostiquée lorsque le pic d'excrétion est supérieur ou égal à 20 ppm sur les quatre heures suivant l'ingestion de lactose. Les sensibilités et spécificités rapportées pour ce test varient respectivement de 80 à 100 % et de 70 à 100% (Rosado *et al.*, 1983) mais sont suspectées d'être beaucoup plus faibles en pratique. Les faux positifs sont notamment causés par une prolifération microbienne dans l'intestin grêle, survenant chez 5 à 20 % de la population générale (Pimentel *et al.*, 2003). Les faux négatifs sont notamment causés par la méthanogénèse survenant chez 30 à 50 % de la population générale dont la flore intestinale transforme une partie de l'hydrogène en méthane (Conway *et al.*, 2009 ; Vernia *et al.*, 2003). En effet, le microbiote intestinal des sujets méthano-excréteurs contient  $10^8$  à  $10^9$  micro-organismes méthanogènes capables d'effectuer cette conversion, alors que celui des sujets non méthano-excréteurs en contient jusqu'à  $10^4$  fois moins (Oufir *et al.*, 1996 ; Pochart *et al.*, 1993). Depuis 2008, il est ainsi suggéré de coupler le dosage de l'hydrogène à celui du méthane, et notamment chez les sujets âgés (Hovde *et al.*, 2009 ; Waud *et al.*, 2008), mais la nécessité de ce couplage reste encore discutée.

#### IV. 2.6 Le suivi du $^{13}\text{CO}_2$ expiré

Ce test repose sur l'utilisation de l'isotope  $^{13}\text{C}$ , stable et non radioactif, qui représente dans la nature environ 1 % des atomes de carbone (Hiele *et al.*, 1988 ; Vantrappen *et al.*, 1992). La concentration du  $^{13}\text{CO}_2$  expiré pendant les quatre ou six heures post-ingestion de  $^{13}\text{C}$ -lactose se mesure par spectrométrie de masse (Zhong *et al.*, 2002). Un enrichissement de 14 % (Newcomer *et al.*, 1975) ou 14.5 % (Hiele *et al.*, 1988 ; Vantrappen *et al.*, 1992), par rapport au niveau de base, est choisi comme seuil limite au-dessous duquel la malabsorption est diagnostiquée. Ce test respiratoire présente une sensibilité et une spécificité respectives de 84 % et 96 %, nettement supérieures à celles des autres techniques indirectes (Hiele *et al.*, 1988 ; Mainguet *et al.*, 2000). Ce test reste cependant peu utilisé en raison des coûts élevés du matériel utilisé (Kein *et al.*, 1979).

#### IV. 3. LES METHODES DETECTANT L'INTOLERANCE

Les symptômes gastro-intestinaux sont davantage pris en compte depuis les années 1995 (Suarez *et al.*, 1995 ; Hermans *et al.*, 1997). Cinq principaux symptômes ont été proposés pour l'évaluation de l'intolérance au lactose. La sensibilité et la spécificité rapportées pour chacun d'eux sont les suivantes : 41 % et 71 % pour la nausée, 70 % et 69 % pour les ballonnements, 39 % et 90 % pour la diarrhée, 65 % et 75 % pour les borborygmes, 55 % et 72 % pour les douleurs abdominales (Beyerlein *et al.*, 2008). Ces résultats concordent avec le choix des ballonnements et des borborygmes comme symptômes optimisant la différenciation entre les tolérants et les intolérants (Suarez *et al.*, 1997).

Cependant, un seul questionnaire évaluant ces symptômes a été jusqu'à présent validé (Casellas *et al.*, 2009). Il permet de construire un score obtenu à partir de cinq items (diarrhées, nausées, borborygmes, douleurs, flatulences) notés chacun de 1 (intensité quasi nulle) à 10 (intensité extrême). Un score moyen supérieur ou égal à 7.5 sur 10 témoignerait d'une intolérance au lactose. La sensibilité et spécificité de ce questionnaire d'auto-évaluation sont respectivement de 75 % et 67 %. Ces faibles valeurs s'expliquent par l'existence de symptômes non spécifiques qui peuvent s'observer lors d'un syndrome de l'intestin irritable, par la difficulté de standardiser une douleur qui peut varier entre individus voire entre ethnies (Jellema *et al.*, 2010), ainsi que par une surestimation des symptômes chez 30 % des sujets (Casellas *et al.*, 2010). Cette surestimation est considérée par certains auteurs comme une

somatisation qui se manifesterait même pour de très faibles doses de lactose ingéré (Tomba *et al.*, 2012), pour d'autres comme un effet nocebo qui se manifesterait par simple appréhension du test (Vernia *et al.*, 2010).

Les corrélations entre les différents marqueurs de la malabsorption et de l'intolérance commencent à être précisées. La corrélation entre intensité des symptômes et génotypes CC, CT et TT (Eadala *et al.*, 2011) semble admise mais celle entre intensité des symptômes et quantité d'hydrogène expiré reste controversée (Beyerlein *et al.*, 2008 ; Waud *et al.*, 2008).

### **EN RESUME**

La mise en évidence de l'hypolactasie se fait de façon directe par biopsie intestinale et test génétique. La mise en évidence de la malabsorption se fait par des techniques indirectes qui évaluent soit la non-absorption du lactose par l'hôte, soit le métabolisme bactérien du lactose. L'ensemble de ces tests présente des limites en termes de spécificité, de sensibilité, de praticité, de coût et de disponibilité. L'évaluation combinée de deux ou trois paramètres serait à envisager pour améliorer la fiabilité du diagnostic.

## **V. Objectifs et stratégie expérimentale**

### **V. 1. OBJECTIFS**

Ces travaux de recherche ont été initiés avec l'objectif d'améliorer la prise en charge globale de l'intolérance au lactose jugée insatisfaisante par les professionnels de santé. Deux problématiques principales ont été identifiées. La première concerne le diagnostic de la malabsorption et de l'intolérance au lactose. En effet, le milieu médical se détourne des outils diagnostiques non invasifs et/ou d'utilisation aisée en routine car ils sont jugés peu fiables. Par ailleurs, les symptômes de l'intolérance au lactose sont peu spécifiques. Dans la pratique, ces deux phénomènes augmentent le risque de conduire à un mauvais diagnostic (faux positifs/ faux négatifs) ainsi qu'à la confusion avec d'autres pathologies intestinales (SII et MICI). La deuxième problématique identifiée concerne le traitement de l'intolérance au lactose, une fois diagnostiquée. En effet, l'éviction du lactose du régime alimentaire est le traitement le plus classiquement utilisé mais peut se révéler incompatible avec le mode alimentaire occidental, voire responsable d'autres pathologies liées à l'éviction des produits laitiers. Le fait que la malabsorption du lactose ne soit pas systématiquement associée à une intolérance et que l'identification des facteurs déclenchant les symptômes restent à préciser supposent que ces derniers pourraient être contrôlés via l'orientation du métabolisme intracolique du lactose.

Pour atteindre l'objectif de ce travail, il apparaît nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs de la malabsorption du lactose ou de proposer des combinaisons de marqueurs classiquement utilisés, ce qui permettrait d'améliorer la fiabilité du diagnostic. Pour fonder scientifiquement la proposition de traitements de l'intolérance autres que le régime d'éviction, il semble également nécessaire de mieux cerner les phénomènes à la base du déclenchement des symptômes et pour cela d'étudier précisément les modifications qui surviennent dans l'environnement colique après une ingestion aigue et chronique de lactose.

## V. 2. STRATEGIE EXPERIMENTALE

### V. 2.1. Hypothèses

La première hypothèse faite dans ce travail est que la malabsorption du lactose est détectable en calorimétrie indirecte grâce à la mesure des échanges respiratoires de l'hôte placé en chambre calorimétrique (espace étanche, isolé thermiquement, avec un renouvellement d'air constant et équipé de plusieurs capteurs). Cette mesure donne accès à des paramètres métaboliques tels que le taux d'oxydation des lipides (Lox), le taux d'oxydation des glucides (Gox) et le quotient respiratoire ( $QR = VCO_2 / VO_2$ , rapport entre la quantité de gaz carbonique produit par l'oxydation totale d'un substrat sur la quantité d'oxygène nécessaire à cette oxydation complète). Ces paramètres apportent des informations fiables et précises sur l'utilisation métabolique des macronutriments à des fins énergétiques. Leurs mesures sont réalisables dans une période de temps relativement courte et, à ce titre, ils apportent des données précieuses dans les études de nutrition. Par ailleurs, des services hospitaliers possèdent déjà une expertise sur ce type de marqueurs utilisés pour des évaluations fonctionnelles (notamment respiratoires et métaboliques). Pourtant ils n'ont jamais été proposés pour diagnostiquer la malabsorption du lactose. La calorimétrie indirecte devrait révéler la non-utilisation du lactose chez les sujets malabsorbeurs se traduisant par un faible pic de QR et de Gox ainsi qu'une restriction moindre de Lox en comparaison avec des sujets absorbeurs.

La seconde hypothèse formulée pour ce travail concerne le devenir intracolique du lactose non digéré et les conséquences pour le microbiote intestinal et l'hôte. En effet, des études menées *ex vivo* ou *in vivo* ont mis en évidence une production plus importante et plus rapide d'acides organiques et d'AGCC dans les selles de sujets malabsorbeurs et intolérants mises en contact avec du lactose. L'accumulation rapide des métabolites bactériens semble participer au déclenchement des symptômes de l'intolérance. Nous avons fait l'hypothèse que l'ingestion aigue de lactose par le sujet malabsorbeur entraînait bien une augmentation rapide de métabolites bactériens dans le côlon (éventuellement à l'origine des symptômes d'intolérance) mais que, si l'ingestion de lactose se prolongeait, le microbiote intestinal et l'hôte étaient capables de s'adapter à leurs nouvelles conditions environnementales. Cette adaptation pourrait alors se traduire par une minimisation des paramètres à l'origine des symptômes d'intolérance.

### V. 2.21. Démarche

Le premier volet de ce travail s'est concentré sur la mesure des paramètres respiratoires (QR, Gox, Lox) tout d'abord sur un modèle animal de malabsorption du lactose, le rat adulte. Le rat devient rapidement hypolactasique après le sevrage. Il peut en outre être placé dans des cages calorimétriques adaptées à sa taille et à ses besoins pendant un temps pouvant aller jusqu'à 24 heures. Des prélèvements invasifs peuvent être réalisés tout en respectant la réglementation en matière d'expérimentation animale. Les rats ont été soumis à deux types de régime qui se différencient par la fraction glucidique contenant du saccharose ou du lactose. Ainsi ces deux régimes ont permis de comparer les effets chez le rat de l'ingestion d'un disaccharide non digéré (lactose) à celle d'un disaccharide digéré (saccharose). Les résultats ayant été concluants chez le rat, cette partie du travail de thèse a été complétée par une étude clinique visant à confirmer l'utilité du QR pour la discrimination des sujets absorbeurs et malabsorbeurs du lactose, ainsi que d'évaluer sa corrélation avec les tests diagnostiques traditionnellement utilisés.

Le deuxième volet de ce travail a porté sur l'étude chez le rat de la modulation du microbiote intestinal, du point de vue de sa composition et de son activité métabolique, ainsi que sur les conséquences sur la physiologie de l'hôte soumis à une ingestion aigüe (une prise) ou prolongée (six jours) de régime contenant du lactose ou du saccharose. La composition et l'activité du microbiote intestinal ont été caractérisées par la mesure de paramètres tels que les concentrations de populations bactériennes données, d'acide lactique, d'AGCC ou l'activité beta-galactosidase. L'état de l'environnement colique a été caractérisé par la mesure de paramètres physico-chimiques tels que le pH et l'osmolarité. Les conséquences sur la physiologie de l'hôte ont été caractérisées grâce à des paramètres tels que les concentrations d'acide lactique et d'AGCC dans le sang prélevé dans la veine porte. D'autres paramètres comme la transcription des gènes correspondant aux transporteurs d'acides organiques et d'AGCC, l'activité myéloperoxydase, les observations histologiques ont été déterminés dans des échantillons de muqueuse colique. Toutes ces mesures ont été réalisées sur des échantillons prélevés dans différents segments coliques (caecum, côlon proximal, médian ou distal) et chez des animaux soumis aux régimes de façon aigüe ou chronique. Les résultats apportent donc une vision spatio-temporelle de l'évolution des paramètres étudiés.

### **V. 2.31. Originalité du travail**

L'originalité de ce travail repose sur les marqueurs étudiés, leur dynamique de suivi et les modèles choisis. Les deux volets de recherche ont une approche innovante car ils étudient à la fois le microbiote (composition et activité métabolique), l'hôte (physiologie et activité métabolique) et leurs interactions. L'analyse microbiologique a été réalisée avec des techniques moléculaires, plus précises et permettant d'identifier un plus grand nombre d'espèces que les techniques traditionnelles de dénombrement jusqu'alors utilisées dans les études. Par ailleurs, ces recherches ont été conduites *in vivo* avec un modèle animal (rats) et clinique (volontaires sains). Enfin, l'étude animale portant sur l'adaptation du microbiote et de l'hôte en régime prolongé de lactose propose un suivi spatio-temporel des modulations et de l'adaptation en tenant compte des différents segments intestinaux, de la durée d'ingestion du lactose et des dynamiques de production, de conversion et d'absorption des métabolites coliques du lactose. Ce type d'approche est susceptible d'apporter des données pour étayer le lien entre malabsorption et intolérance.

## Travaux de recherche

---

### **I. Publication 1: Lactose malabsorption and colonic fermentations alter host metabolism in rats**

#### **Objectifs**

Des données complémentaires sont nécessaires pour préciser *in vivo* les conséquences d'une ingestion aigue de lactose dans l'environnement colique et le métabolisme de l'hôte.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les conséquences métaboliques d'une ingestion aigue de lactose, chez le rat, en relation avec l'activité du microbiote intestinal et ses interactions avec l'hôte malabsorbeur.

#### **Matériel et méthodes**

L'étude a été réalisée en deux parties. Dans chacune de ces parties, nous avons utilisé des rats mâles Wistar (350-400g) répartis en 2 groupes (n = 6) recevant 5 g de régime équilibré contenant soit 25 % de saccharose (groupe S25 contrôle) soit 25 % de lactose (groupe L25 expérimental).

Dans la première partie de l'étude, nous avons placé les rats en chambre calorimétrique, sous cycle jour/ nuit artificiel (lumière de 8h à 20h). Leurs paramètres métaboliques ont été enregistrés pendant les 24 heures suivant l'ingestion des 5 g de régimes tests L25 et S25.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons effectué des abattages séquentiels (6 rats L25 et 6 rats S25) à différents temps (t = 0h, 2h, 4h, 6h, 8h et 13h) après l'ingestion des 5 g de régime test. Pendant les abattages, nous avons prélevé du sang porte, les contenus intestinaux et la muqueuse colique. Les acides gras à chaînes courtes et les acides organiques ont été dosés respectivement par chromatographie en phase gazeuse et par kits enzymatiques, dans le sang porte et dans les contenus intestinaux. La quantification des transporteurs d'acides gras à chaînes courtes (sMCT1 et MCT1) a été réalisée par PCR en temps réel sur la muqueuse colique.

#### **Principaux résultats**

Nous observons une augmentation significative des concentrations en acides gras à chaînes courtes et en lactate dans le caecum et dans le sang porte des rats du groupe L25 en comparaison à ceux du groupe S25. Ces concentrations atteignent respectivement leur

maxima à 6 et 8 heures après l'ingestion de lactose. L'expression du transporteur d'acides gras à chaîne courte sMCT1 est également significativement plus élevée à 6 heures et 8 heures après l'ingestion de lactose, chez les rats du groupe L25 en comparaison aux rats du groupe S25.

En parallèle, les enregistrements de calorimétrie révèlent une montée significativement moindre du QR et de la Gox, ainsi qu'une inhibition moindre de la Lox, sur les 5 heures suivant l'ingestion du régime L25 en comparaison au régime S25. Ces résultats soulignent l'absorption et l'utilisation métabolique moindre du lactose par l'hôte. Cependant, au-delà de 6 heures, la tendance s'inverse et le QR et la Gox du groupe L25 deviennent significativement supérieurs à ceux de S25.

### **Conclusions**

Cette étude montre qu'à partir d'une certaine dose de lactose malabsorbé, des changements métaboliques se produisent. Ces changements impliquent des fermentations caecales et coliques du lactose qui conduisent à la production d'acides gras à chaînes courtes, à l'activation de leurs transporteurs coliques, à leur absorption colique et à leur utilisation métabolique par l'hôte.

Ces résultats soulèvent la question d'une réorientation métabolique du microbiote colique et de l'hôte malabsorbeur, lors d'une ingestion chronique de lactose. Ils ouvrent également la voie à de nouvelles techniques pour le diagnostic de la malabsorption du lactose. En effet, les études calorimétriques permettraient de mettre en évidence la malabsorption du lactose et de suivre l'adaptation métabolique consécutive du microbiote intestinal de l'hôte. Des études cliniques sont nécessaires pour valider ces résultats sur l'Homme.

## Lactose malabsorption and colonic fermentations alter host metabolism in rats

Virginie Alexandre<sup>1,2</sup>, Patrick C. Even<sup>1</sup>, Christiane Larue-Achagiotis<sup>1</sup>, Jean-Marc Blouin<sup>1</sup>, François Blachier<sup>1</sup>, Robert Benamouzig<sup>3</sup>, Daniel Tomé<sup>1</sup> and Anne-Marie Davila<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>AgroParisTech, UMR 914, CRNH-IdF, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior Department, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France

<sup>2</sup>Vivatech, 75008 Paris, France

<sup>3</sup>Gastroenterology Unit, CRNH IdF, AP-HP, University Paris 13, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

(Submitted 1 June 2012 – Final revision received 8 November 2012 – Accepted 11 November 2012)

### Abstract

Lactose malabsorption is associated with rapid production of high levels of osmotic compounds, such as organic acids and SCFA in the colon, suspected to contribute to the onset of lactose intolerance. Adult rats are lactase deficient and the present study was conducted to evaluate *in vivo* the metabolic consequences of acute lactose ingestion, including host–microbiota interactions. Rats received diets of 25% sucrose (S25 control group) or 25% lactose (L25 experimental group). SCFA and lactic acid were quantified in intestinal contents and portal blood. Expression of SCFA transporter genes was quantified in the colonic mucosa. Carbohydrate oxidation (Cox) and lipid oxidation (Lox) were computed by indirect calorimetry. Measurements were performed over a maximum of 13 h. Time, diet and time × diet variables had significant effects on SCFA concentration in the caecum ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.004$  and  $P = 0.007$ , respectively) and the portal blood ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.04$  and  $P < 0.001$ , respectively). Concomitantly, expression of sodium monocarboxylate significantly increased in the colonic mucosa of the L25 group ( $P = 0.003$  at  $t = 6$  h and  $P < 0.05$  at  $t = 8$  h). During 5 h after the meal, the L25 group's changes in metabolic parameters (Cox, Lox) were significantly lower than those of the S25 group ( $P = 0.02$ ). However, after 5 h, L25 Cox became greater than S25 ( $P = 0.004$ ). Thus, enhanced production and absorption of SCFA support the metabolic changes observed in calorimetry. These results underline the consequences of acute lactose malabsorption and measured compensations occurring in the host's metabolism, presumably through the microbiota fermentations and microbiota–host interactions.

**Key words:** Lactose malabsorption; Colonic fermentation; Host–microbiota interactions; Indirect calorimetry

Lactose malabsorption affects 20% of the population worldwide. It results from a decline in lactase expression, naturally occurring in mammals after weaning. This decline is within a specific time period for each animal species: 15 d for rabbits, 1 month for rats and to or until decades for human subjects<sup>(1,2)</sup>. A low intestinal lactase activity leads to the presence of undigested lactose in the large intestine, where it is then fermented by the microbiota. Lactose intolerance is defined as the onset of non-specific gastrointestinal symptoms such as bloating, rumbling, abdominal pain, nausea and diarrhoea. Although the factors responsible for lactose intolerance are not clearly understood, the intervention of osmotically active compounds is suspected<sup>(3)</sup>. Few treatments are available and many lactose-intolerant people are left with no other choice than to practise an exclusion diet that could lead to mineral and vitamin deficiencies.

The colonic metabolism of lactose has been reported to be associated with an increased production of bacterial metabolites, including SCFA (acetate, propionate and butyrate) and gases (hydrogen, carbon dioxide and methane)<sup>(4–7)</sup> as well as, under specific circumstances, organic acids (such as lactate, succinate and formate) and ethanol<sup>(8,9)</sup>. In physiological conditions (luminal pH 4.5–7), SCFA are specifically transported by monocarboxylate (MCT1) and sodium MCT1 (sMCT1) transporters present in the colonocyte brush border membranes<sup>(10,11)</sup>. Once absorbed, SCFA are carried in the portal vein to the liver where they can be oxidised. Butyrate is the preferred energy substrate of the mucosal cells<sup>(12,13)</sup>. In standard conditions, SCFA are at the forefront of the mammals' colonic health, and represent approximately 65% of the colonic anions (70–130 mmol/l)<sup>(10–12)</sup>. However, their concentrations are 3-fold higher as a consequence of lactose

**Abbreviations:** Cox, carbohydrate oxidation; L25, diets containing 25% lactose; Lox, lipid oxidation; MCT1, monocarboxylate; S25, diets containing 25% sucrose; sMCT1, sodium monocarboxylate.

malabsorption<sup>9,14</sup>). Such metabolic modifications may be expected in sugar malabsorption. However, most experiments on lactose malabsorption have been conducted *ex vivo* or *in vitro*. Studying the *in vivo* kinetics of bacterial fermentation, colonic absorption and subsequent host metabolism is necessary in order to be able to determine the onset of lactose intolerance. Such data could also pave the way to new strategies to improve the clinical management of lactose intolerance.

Accordingly, the aim of the present study was to investigate, *in vivo*, the metabolic consequences of malabsorption after an acute ingestion of lactose in rats, and the consequences of host–microbiota interactions. For this purpose, the present study was carried out using the rat model in which the incomplete absorption of lactose and the subsequent overproduction by the gut microbiota of lactose-derived SCFA could be detected by indirect calorimetry. Rats were given a single meal of either 25% lactose or 25% sucrose. SCFA concentrations were quantified in the large-intestinal contents and portal blood, expressions of MCT1 and sMCT1 measured in the colonic mucosa and oxidation of carbohydrate (Cox) and lipid (Lox) recorded by indirect calorimetry. These measurements were performed over a maximal 13 h period.

## Experimental methods

### Animals and diets

The experiments were carried out following the European directive 2010/63/UE relative to the protection of animals used for scientific purposes, and were approved by the ethical committee of the National Institute of Agronomic Research (INRA) (approval reference 11/012). A total of eighty-four male Wistar rats (350–400 g) were housed under an artificial 12 h light–12 dark cycle (lights on at 08.00 hours). Being more than 12 weeks old at the onset of the studies, they were naturally lactase deficient. Rats were adapted for 8 d to a standard diet of the American Institute of Nutrition (AIN) of 74% carbohydrate (63% starch, 11% sucrose), 14% protein and 12% fat as energy. This standard diet was composed of dairy proteins (140 g/kg), starch (622 g/kg), sucrose (100 g/kg), cellulose (50 g/kg), soyabean oil (40 g/kg), mineral mix AIN-93M (35 g/kg), vitamin mix AIN-93V (10 g/kg) and choline (2.3 g/kg)<sup>15</sup>. The experimental calibrated test meals were 5 g (362 kJ) of the standard diet modified to contain 25% (w/w) of either sucrose (control group, termed S25) or lactose (experimental group, termed L25) added at the expense of starch. The rats were randomly assigned to one of the following groups: L25 or S25. The test meals were administered after an overnight fast.  $n_{i,j,k}$  = seventy-two rats were serially killed for sample collection, where:  $i$ (diet) = 1, 2 (1 = L25, 2 = S25),  $j$ (time point from diet ingestion) = 1, ..., 6 (1 = 0, 2 = 2 h, 3 = 4 h, 4 = 6 h, 5 = 8 h, 6 = 13 h) and  $k$ (rat) = 1, ..., 6.  $n_{i,k}$  = twelve rats were assigned to the indirect calorimetry study.

### Blood, intestinal contents and colonic mucosa sampling and SCFA extraction

Portal blood (2 ml) was sampled directly from the hepatic vein using a heparinised syringe. Blood samples were centrifuged

for 4 min at 4°C and 600 g. A volume of 315 µl of the plasma fraction was kept in 35 µl of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> for derivatisation and GC quantification. The rest of the plasma fraction was stored at –80°C until analysis. The colonic tissues were washed in ice-cold 0.9% (w/v) NaCl (pH 7.0) and the mucosa was scraped off using a glass slide before immediate freezing in liquid N<sub>2</sub> and storage at –80°C until quantitative real-time-PCR analyses. The caecal and proximal colonic contents were simply sampled in sterile tubes. SCFA were extracted by vigorous mixing with deionised water. The volume of deionised water added was 0.9-fold of the weight for caecal samples and 1.8-fold for colonic ones. As with the plasma fraction, 315 µl of the supernatant were mixed with 35 µl of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> for subsequent derivatisation and GC quantification. The rest of the caecal and colonic fractions were kept for enzymatic reactions and spectrophotometric quantification. Samples were stored at –80°C until further analysis.

### SCFA quantification

The SCFA were measured after derivatisation (esterification) with a modified Kristensen technique<sup>16</sup>, followed by GC. This method is based on SCFA esterification by 2-chloroethylchloroformate in aqueous and acid media, using isocaproic acid as the internal standard. More precisely, 350 µl samples (315 µl sample + 35 µl 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), prepared as mentioned earlier, were mixed with 20 µl of 37% HCl and 100 µl of 1% isocaproate solution (w/v). Then, 750 µl of acetonitrile, 750 µl of 2-chloroethanol and 100 µl of pyridine were added. After careful homogenisation, the mixtures were centrifuged for 10 min at 3000 rpm and 4°C. The reaction was initiated by adding 50 µl of 2-chloroethyl chloroformate to 1.5 ml of the supernatant. Subsequently, 4 ml of distilled water were added and the esters were extracted with 500 µl of cyclohexane. They were then analysed with a GC (Varian CP3800; Varian Medical Systems) equipped with a capillary column (30 m, 0.32 mm inner diameter, Restek Rtx 502.2; Restek) and fitted with a flame ionisation detector and a split/splitless injector. Helium was used as the carrier gas (1 ml/min) and 6 µl of each sample were injected. The column was maintained at 75°C for 6 s, then the temperature was increased to 170°C at a rate of 7°C/min. This temperature was maintained for 10 min, before being increased to 220°C (50°C/min) and maintained for 3 min. The injector and the detector were utilised at 200 and 300°C, respectively. The amount of SCFA was determined with reference to an internal standard (isocaproate) and external standards (200 mM-acetate, 80 mM-propionate, 80 mM-butyrate, 10 mM-isobutyrate, 10 mM-isovalerate, 8 mM-valerate and 8 mM-caproate).

### Lactate enzymatic assay

D/L-Lactate concentrations were determined with a commercial kit (Megazyme International Ireland Limited). Samples, prepared as mentioned earlier, were homogenised and centrifuged for 5 min at 4°C and 14 000 g. The supernatant was collected for a second round of centrifugation for 15 min at

4°C and 14 000 g. A volume of 500 µl of the supernatant was applied to a spin column of a centrifuge nanosep filter (30 kD; Pall Corporation) and centrifuged at 4°C and 14 000 g, until filtration of the whole volume. D/L-lactate was then quantified in the final ultra-filtrates, according to the manufacturer's recommendations.

*Gene expression of sodium monocarboxylate and monocarboxylate*

The colonic expression of genes solute carrier family 16, member 1 (*SLC16A1*) and solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8 (*SLC5A8*), which, respectively, encode for the MCT1 and sMCT1 transporters, was investigated using quantitative RT-PCR. The colonic mucosa was scraped and total RNA isolated using TRIzol reagent, according to the manufacturer's protocol (Ambion/Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). Sample quality was assessed by 260/280 nm absorption ratio determination (between 1.8 and 2.0) and checked on a 1% agarose gel. For quantitative RT-PCR analyses, 1 µg total RNA was first reverse transcribed using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems). Reverse transcribed RNA was amplified on a thermal cycler (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) using the SYBR green (Power SYBR Green, Applied Biosystems) fluorescence method and specific oligonucleotides. The primers used were as follows: rat RPL13A – forward 5'-GGATCCCTCCACCCATGACA-3', reverse 5'-CTGGTACTTCCACCCGACCTC-3'; rat MCT1 – forward 5'-GCAACGACCAGTGAAGTGT-3', reverse 5'-AAGCCCAAGACCTCCAAT-3'; and rat SMCT1 – forward 5'-CTGGCTGTGTTTCTTTGG-3', reverse 5'-CGTTGTGCGTGCTGTTAG-3'. Results were analysed with 7300 SDS system software (Applied Biosystems). Quantification of RNA was carried out by comparison of the number of cycles required to reach reference and target threshold values ( $\delta\text{-}\delta C_t$  method).

*Indirect calorimetry*

Cox and Lox were computed using the Weir equation from continuous measurements of  $V_{CO_2}$  and carbon dioxide production ( $V_{CO_2}$ ) by indirect calorimetry<sup>(17)</sup>. The metabolic cage was equipped with force transducers placed below the metabolic chamber. This made possible the removal of the part of the respiratory exchange that was directly related to the energy expended on spontaneous activity. Thus, it was possible to compute meal-induced changes in Cox and Lox, free of short-term changes due to the cost of activity<sup>(18)</sup>. The rats were housed in the metabolic cage at 18.00 hours, with free access to water but no access to food. Temperature in the cage was regulated at 26°C to limit energy expenditure for thermoregulation. Basal Cox and Lox were measured between 06.00 and 10.00 hours the next day. The test meals were given at 10.00 hours and the changes in Cox and Lox *v.* baseline were measured during 8 and 13 h. At the end of the experiment, rats were euthanised by an intra-peritoneal injection of pentobarbital (0.1 ml/100 g body weight) and the intestinal contents, the intestinal mucosa and the portal blood samples were collected.

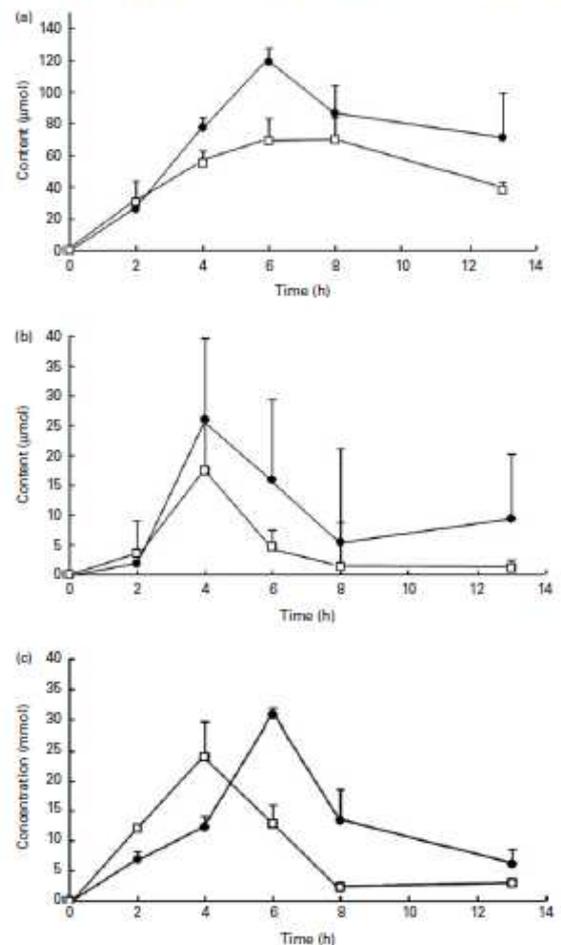
*Statistical analyses*

Results are presented as means with their standard errors. Analyses were performed with either an ANOVA using SAS software (version 9.1, SAS Institute, Inc.) or a Student's *t* test for the unpaired data.

**Results**

*SCFA and lactic acid quantification in intestinal contents and portal blood*

Lactic acid and SCFA were quantified in intestinal contents and portal blood in L25 (25% lactose diet) and S25 (25% sucrose diet) groups (Fig. 1 and Table 1). An increase of SCFA concentration was observed in intestinal contents



**Fig. 1.** Total SCFA variations after L25 (●) and S25 (□) diets in (a) caecum, (b) proximal colon, (c) portal blood. S25: diet containing 25% sucrose; L25: diet containing 25% lactose. Time ((a)  $P < 0.001$ , (b)  $P = 0.24$ , (c)  $P < 0.001$ ), diet ((a)  $P = 0.004$ , (b)  $P = 0.06$ , (c)  $P = 0.04$ ) and time  $\times$  diet ((a)  $P = 0.007$ , (b)  $P = 0.63$ , (c)  $P < 0.001$ ) effects were evaluated by ANOVA. A *P* value over 0.05 is considered as not significant. Comparisons between S25 and L25 were performed at each time point by a Student's *t* test for unpaired data and are presented in Supplementary material (available online).  $n_{L25} = 72$ , where (diet) = 1, 2, *t*(time point from diet ingestion) = 1, ..., 6 and *n*(rat) = 1, ..., 6.

**Table 1.** Acetate, propionate, butyrate and lactate in the caecum, proximal colon and portal blood after L25 and S25 diets\*

|                       | S25   | L25  | SEM   | P     |
|-----------------------|-------|------|-------|-------|
| <b>Caecum</b>         |       |      |       |       |
| Acetate               | 0.52  | 0.76 | 0.02  | 0.001 |
| Propionate            | 0.11  | 0.14 | 0.01  | 0.17  |
| Butyrate              | 0.04  | 0.05 | 0.003 | 0.54  |
| Lactate               | 0.23  | 3.96 | 0.16  | 0.001 |
| <b>Proximal colon</b> |       |      |       |       |
| Acetate               | 0.12  | 0.18 | 0.01  | 0.21  |
| Propionate            | 0.01  | 0.03 | 0.001 | 0.01  |
| Butyrate              | 0.005 | 0.04 | 0.01  | 0.54  |
| Lactate               | ND    | 1.29 | 0.06  | -     |
| <b>Portal blood</b>   |       |      |       |       |
| Acetate               | 59.6  | 95.6 | 3.07  | 0.01  |
| Propionate            | 47.7  | 56.8 | 3.35  | 0.47  |
| Butyrate              | 16.8  | 22.6 | 1.67  | 0.29  |
| Lactate               | 0.07  | 0.08 | 0.003 | 0.56  |

S25, containing 25% sucrose; L25, containing 25% lactose; ND, not detected.

\* Data are expressed as means of AUC from the plot of contents ( $\mu\text{mol}$ ) v. time (h)  $\pm$  pooled SEM for caecum and colon, and concentration ( $\text{nmol/l}$ ) v. time (h)  $\pm$  pooled SEM for portal blood. Data are compared by a Student's *t* test for unpaired data. A *P* value over 0.05 is considered as not significant.  $n_{\text{diet}} = 72$ , where *i*(diet) = 1, 2, *j*(time point from diet ingestion) = 1, ..., 6 and *k*(rat) = 1, ..., 6.

(caecum and colon) for both groups, with a peak occurring between 4 and 8 h after the ingestion of the test meal. The higher amounts of SCFA and lactic acid were mainly encountered in the caecum. Total SCFA were 140% higher in the caecum and 80% higher in the colon in the L25 group compared with the S25 group. Time, diet and time  $\times$  diet variables presented significant effects on caecal concentrations of SCFA ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.004$  and  $P = 0.007$ , respectively) and lactate ( $P = 0.004$ ,  $P < 0.001$  and  $P = 0.001$ , respectively). Significant differences, presented in the Supplementary material (available online), were especially noted at 6 h ( $P = 0.004$ ) after the ingestion of the test meal. No significant difference was noticed in the proximal colon between the L25 and S25 groups, except for propionate concentrations ( $P < 0.05$ ). A moderate increase of SCFA was also noticed after the S25 meal. Finally, quantifications in the portal blood also revealed an increase of total SCFA over time in the S25 and L25 groups, with peaks occurring at 4 and 6 h after the diets, respectively. Time, diet and time  $\times$  diet variables presented significant effects on SCFA concentrations in the portal blood ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.04$  and  $P < 0.001$ , respectively). Significant differences, presented in the Supplementary material (available online), were especially noted at 4 h ( $P = 0.009$ ) and 6 h ( $P < 0.001$ ) after the ingestion of the test meal. Total SCFA concentrations exhibited a 2-fold higher peak in the L25 group compared with the S25 group, probably driven by a significant increase of acetate concentrations ( $P = 0.01$ ) (Table 1).

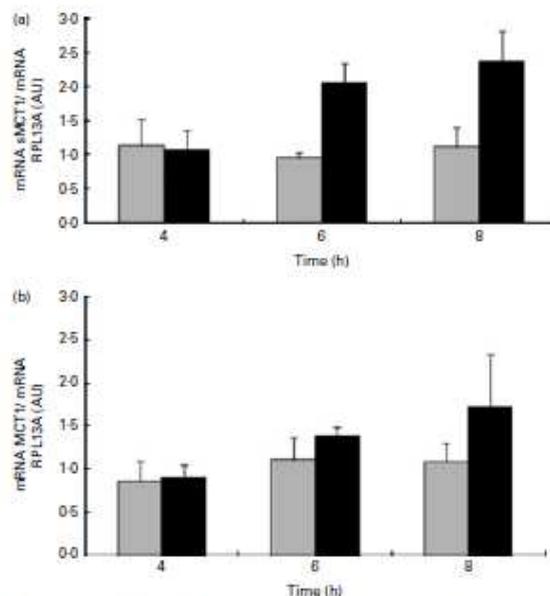
*Expression of sodium monocarboxylate and monocarboxylate genes in the colonic mucosa*

The expression of SCFA transporters sMCT1 and MCT1 was analysed in the colonic mucosa in order to determine their

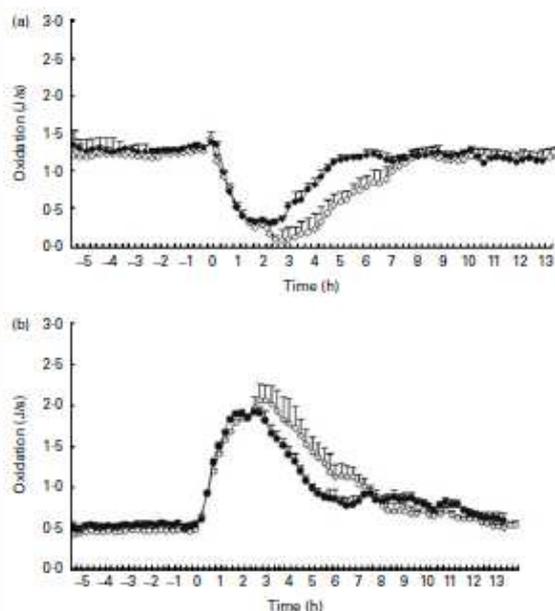
absorption. Quantitative RT-PCR analyses revealed that diet presented a significant effect on the expression of sMCT1 ( $P = 0.02$ ) (Fig. 2). The differences, presented in the Supplementary material (available online), were significant for sMCT1 at 6 h ( $P = 0.03$ ) and 8 h ( $P < 0.05$ ).

*Indirect calorimetry after a sucrose- or lactose-containing test meal*

Calorimetric records following ingestion of the test meals revealed that Cox and Lox, respectively, presented a significantly lower increase and lower inhibition after ingestion of an L25 meal compared with an S25 meal (Fig. 3). Time, diet and time  $\times$  diet variables presented significant effects on Lox ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ,  $P = 0.004$ , respectively) and Cox ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ , respectively) kinetics over the 13 h post-ingestion. During the 8 h period after the test meals, the difference in Cox between the L25 and S25 groups was 6.6 kJ (Table 2). Interestingly, the differential amount (L25–S25) of total SCFA accumulated in the caecum resulted in a differential energy of 7 kJ (difference of 2443  $\mu\text{mol}$ , with an average of  $M = 74 \text{ g/mol}$ ). After intersection of the curves, a recovery of energy occurred for the L25 group, but remained partial



**Fig. 2.** (a) Sodium monocarboxylate (sMCT1) expression after L25 (■) and S25 (□) diets; (b) monocarboxylate (MCT1) expression after L25 and S25 diets. S25, diets containing 25% sucrose; L25, diets containing 25% lactose; Time ((a)  $P = 0.24$ , (b)  $P = 0.34$ ), diet ((a)  $P = 0.02$ , (b)  $P = 0.29$ ) and time  $\times$  diet ((a)  $P = 0.19$ , (b)  $P = 0.72$ ) effects were evaluated by ANOVA. A *P* value over 0.05 is considered as not significant. Comparisons between S25 and L25 were performed at each time point by a Student's *t* test for unpaired data and are presented in Supplementary material (available online).  $n_{\text{diet}} = 36$ , where *i*(diet) = 1, 2, *j*(time point from diet ingestion) = 3, 4, 5 and *k*(rat) = 1, ..., 6. RPL13a, ribosomal protein L13a; AU, arbitrary units.



**Fig. 3.** (a) Lipid oxidation and (b) carbohydrate oxidation kinetics over 13h after L25 (●) and S25 (○) diet. S25: diet containing 25% sucrose; L25: diet containing 25% lactose. Time ((a)  $P < 0.001$ , (b)  $P < 0.001$ ), diet ((a)  $P < 0.001$ , (b)  $P < 0.001$ ) and time  $\times$  diet effects ((a)  $P = 0.004$ ; (b)  $P < 0.001$ ) are evaluated by ANOVA. A  $P$  value over 0.05 is considered as not significant.  $n_{ix} = 12$ , where (diet) = 1, 2 and  $k(\text{rat}) = 1, \dots, 6$ .

with a difference of less than 2.5 kJ between the 8 and 13 h. As the decrease in Cox was compensated by a lower inhibition of Lox, overall postprandial thermogenesis (Cox + Lox) was not significantly different between the L25 and S25 groups.

## Discussion

The present study contributes to a better knowledge of the *in vivo* kinetics of the metabolic consequences of a acute lactose

**Table 2.** Meal-induced changes (kJ) in carbohydrate oxidation (Cox) and lipid oxidation (Lox) during the periods 0–8 h and 8–13 h, after single L25 and S25 meals\*

|        | S25  |     | L25  |     | $P$   |
|--------|------|-----|------|-----|-------|
|        | Mean | SEM | Mean | SEM |       |
| 0–8 h  |      |     |      |     |       |
| Cox    | 40.6 | 2.5 | 34.0 | 1.8 | 0.049 |
| Lox    | 16.7 | 1.8 | 25.1 | 1.0 | 0.009 |
| 8–13 h |      |     |      |     |       |
| Cox    | 11.5 | 0.4 | 13.9 | 0.8 | 0.004 |
| Lox    | 21.0 | 2.0 | 21.3 | 0.3 | 0.88  |

S25, containing 25% sucrose; L25, containing 25% lactose.

\* Data are expressed as means of Cox or Lox plots (kJ)  $\pm$  SEM and are compared by a Student's  $t$  test for unpaired data. A  $P$  value over 0.05 is considered as not significant.  $n_{ix} = 12$ , where (diet) = 1, 2 and  $k(\text{rat}) = 1, \dots, 6$ .

malabsorption in rats. Lactose malabsorption appears to be mainly associated with modifications in the production of SCFA by the gut microbiota and their subsequent absorption and metabolic utilisation by the host. The rat model provides control of both internal parameters, such as genetic background (allowing similar physiological responses), and external parameters, such as the 13 h kinetics in the calorimetric chamber plus samplings of the portal vein, the intestinal contents and the colonic mucosa.

Lactose malabsorption led to microbial production (quantified in intestinal contents) and colonic absorption (indicated by quantification in portal blood and sMCT1 expression in the colonic mucosa) of SCFA. Finally, the consequent metabolic changes occurring in the lactose malabsorber host were supported by the calorimetric parameters.

In the mammalian colon, a close similarity in the molar ratio of acetate, propionate and butyrate is noted among species. The SCFA profiles are not fixed in human subjects, but, in standard conditions, the molar ratio has been reported to be about 60:20:20 (acetate:propionate:butyrate) in colonic contents and about 85:10:5 in blood, with some variation depending upon intestinal segment (left or right) and blood sample origin (portal, hepatic or peripheral)<sup>(19)</sup>. Indeed, these molar ratios may be altered by consumption of fermentable fibres or modified foods. Recent studies also underline the role of dietary proteins in the SCFA production, either in quantity or quality<sup>(20,21)</sup>. Such questions are of interest for the medical community, as SCFA, and especially butyrate, have demonstrated to have a beneficial effect on the host. The main health benefits attributed to butyrate are its role in the reduction of colonic inflammation and permeability<sup>(22)</sup> and in the protection against colorectal cancer<sup>(23)</sup>. SCFA concentration in the large bowel is the result of SCFA production by the intestinal microbiota, of *in situ* metabolism by colonocytes and of colonic absorption. Therefore, high SCFA concentrations in the caecum may be explained either by an active production and/or by a low uptake. Furthermore, once absorbed, SCFA are carried through portal blood to the liver, where most of them are metabolised, accounting for the consecutive lower concentrations in the peripheral blood<sup>(19)</sup>. In the present study, after ingestion of lactose, lactic acid and total SCFA were significantly higher in the caecum and the portal blood. One may assume that these differences account for lactose ingestion specifically, as L25 and S25 groups had both the same protein intake. Interestingly, major differences were noticed 6 h after lactose ingestion. The bioavailability of substrate and fermentation kinetics of the microbiota may explain the delayed caecal production of intermediary and end metabolites after the ingestion of lactose<sup>(24)</sup>. The substantial absorption of colonic SCFA, usually between 6.1 and 12.6  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$  per h<sup>(25)</sup>, explains the gradual metabolite concentration decrease and pH increase (from 5.6 to 6.6) from the caecum to the distal colon<sup>(19)</sup>. These findings could account for the absence of significant differences in the proximal colon after S25 or L25 diets. Similar kinetics in bell curves were observed for SCFA variations in the caecum, the proximal colon and the portal blood. However, the peaks were observed at 6 h after

the L25 meal in the caecum and the portal blood, and at 4 h after the meal in the proximal colon.

The decrease after 4 h of SCFA colonic concentrations is concomitant to the increase of mRNA for sMCT1 and MCT1 transporters in the colonic mucosa. This observation could suggest that, before 6 h, the activity of these transporters was disrupted (pH drop) or exceeded (unusually high concentrations of SCFA), leading to SCFA accumulation until the biosynthesis of a new pool of transporters. The pattern of the SCFA concentrations in portal blood is consistent with this hypothesis. We did not follow-up the transcription of sMCT1 and MCT1 in the caecal mucosa, but *in vitro* experiments proved that SCFA abundance resulted in MCT1 and sMCT1 mRNA rises, probably in order to maximise intracellular availability of SCFA<sup>(26–29)</sup>. An increase in passive uptake through the paracellular route may be also implied in the increased SCFA concentrations in the portal blood, as a fructo-oligosaccharide-induced increase in intestinal permeability was demonstrated in rats<sup>(30)</sup>.

At last, indirect calorimetry underlines the smaller increase of Cox, the smaller inhibition of Lox and the fairly stable overall thermogenic response after ingestion of an L25 meal compared with an S25 meal. Indirect calorimetry confirms the lower absorption and subsequent metabolic utilisation of lactose in rats, with a reversed trend between the L25 and S25 groups, beyond 6 h after the test meals. Finally, with the L25 diet, the excess energy available in caecal contents (as SCFA) is in the same range (6–7 kJ) as the energy under-expended for Cox during 8 h after the ingestion of the diet. Furthermore, the recovery of this amount of energy may also explain the absence of differences when comparing the thermogenesis after lactose and sucrose diets. These results can be interpreted as the oxidation of the SCFA produced by the microbial fermentation of lactose, whose metabolites are then absorbed and oxidised by the host. Thus, the use of new metabolites, largely produced and accumulated under lactose ingestion, may be considered as capable of providing this delayed energy. Such an idea has already been suggested in a calorimetric study in rats fed with various dietary fibres, in which Cox remained higher for a longer period after the ingestion of the fibres than after the ingestion of the control diet<sup>(31)</sup>. Among the accumulated metabolites, caecal and colonic SCFA are presumably playing a major metabolic role. Indeed, several studies confirm their capacity to be easily absorbed across the colonic mucosa, resulting in a salvage of carbohydrate energy that otherwise would have been lost in faeces<sup>(32–34)</sup>.

Overall, the results provided by the measurements of the luminal and the blood SCFA, transporter gene expression and by indirect calorimetry method showed that up to a given load of undigested lactose, metabolic changes occur from 6 h after lactose ingestion. They involve caecal and colonic fermentation of lactose, leading to the caecal production of SCFA, subsequent activation of SCFA-specific transporters and colonic absorption of the SCFA that are metabolised in the host's tissues, accounting for the metabolic compensations from 6 h. The present study emphasises the adaptation of both the colonic microbiota and the host

metabolisms, but also supports the suggested nutritional strategies to optimise the microflora and host adaptation in order to alleviate the symptoms of lactose intolerance. These results raise the question of the metabolic reorientation of the colonic microbiota and the host over chronic lactose ingestion by lactose malabsorbers. They also pave the way to the use of indirect calorimetry as a non-invasive tool to detect intestinal lactose malabsorption and to explain, at least partly, the subsequent metabolic adaptation through microbial fermentations. Clinical trials are needed to confirm the validity of this methodological approach in human subjects.

### Supplementary material

To view supplementary material for this article, please visit <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512005557>

### Acknowledgements

We (V. A. and A.-M. D.) want to express our thanks to Patrick Even, Christiane Larue-Achagiotis and Jean-Marc Blouin for their expert technical assistance and to François Blachier, Robert Benamouzig and Daniel Tomé for their precious help in the redaction of this article. We gratefully acknowledge Corine Delteil and Sarah Bock for their assistance during the microbiological analyses, Nachiket Nadkarni for his helpful English advice, Tristan Mary-Huard and Pierre Barbillon for their help for the statistical analyses. We also thank Vivatch for financial support. No conflict of interest has been reported.

### References

1. Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, *et al.* (1998) The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* **114**, 1230–1236.
2. Sebastio G, Villa M, Sartorio R, *et al.* (1989) Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet* **45**, 489–497.
3. Marteau P & Flourie B (2001) Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *Br J Nutr* **85**, Suppl 1, S17–S21.
4. Cummings JH & Macfarlane GT (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* **70**, 443–459.
5. Arola H & Tamm A (1994) Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol Suppl* **202**, 21–25.
6. Beards E, Tuohy K & Gibson G (2010) Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food ingredients following *in vitro* fermentation by human colonic microbiota. *Anaerobe* **16**, 420–425.
7. Hawksworth G, Drasar BS & Hill MJ (1971) Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J Med Microbiol* **4**, 451–459.
8. Cummings JH & Macfarlane GT (1997) Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **21**, 357–365.
9. He T, Priebe MG, Harmsen HJ, *et al.* (2006) Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *J Nutr* **136**, 58–63.
10. Papillon E, Bonaz B & Foumet J (1999) Short chain fatty acids: effects on gastrointestinal function and therapeutic



- potential in gastroenterology. *Gastroenterologie clinique et biologique* **23**, 761–769.
11. Soergel KH (1994) Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Invest* **72**, 742–748.
  12. Bugaut M (1987) Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B* **86**, 439–472.
  13. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, *et al.* (2008) Review Article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 104–119.
  14. Hertzler SR & Savaiano DA (1996) Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* **64**, 232–236.
  15. Reeves PG, Rossow KL & Lindlauf J (1993) Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* **123**, 1923–1931.
  16. Kristensen NB, Pierzynowski SG & Danfaer A (2000) Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intravenously infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *J Anim Sci* **78**, 1372–1379.
  17. Cunningham JJ (1990) Calculation of energy expenditure from indirect calorimetry: assessment of the Weir equation. *Nutrition* **6**, 222–223.
  18. Pinheiro Volp AC, Esteves de Oliveira FC, Duarte Moreira Alves R, *et al.* (2011) Energy expenditure: components and evaluation methods. *Nutr Hosp* **26**, 430–440.
  19. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, *et al.* (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* **28**, 1221–1227.
  20. Morita T, Kasaoka S & Kuriyama S (2004) Physiological functions of resistant proteins: proteins and peptides regulating large bowel fermentation of indigestible polysaccharide. *JAOAC Int* **87**, 792–796.
  21. Andriamihaja M, Davila AM, Eklou-Lawson M, *et al.* (2010) Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet. *Am J Physiol* **299**, G1030–G1037.
  22. Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, *et al.* (2012) Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. *Lipids* **47**, 669–678.
  23. Fung KY, Cosgrove L, Lockett T, *et al.* (2012) A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr* **108**, 820–831.
  24. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, *et al.* (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* **40**, 235–243.
  25. Cummings JH (1981) Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **22**, 763–779.
  26. Kawamata K, Hayashi H & Suzuki Y (2007) Propionate absorption associated with bicarbonate secretion *in vitro* in the mouse cecum. *Pflugers Archiv* **454**, 253–262.
  27. Kirat D, Inoue H, Iwano H, *et al.* (2006) Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Vet J* **171**, 462–467.
  28. Kirat D & Kato S (2006) Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) mediates transport of short-chain fatty acids in bovine caecum. *Exp Physiol* **91**, 835–844.
  29. Cuff MA, Lambert DW & Shirazi-Beechey SP (2002) Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* **539**, 361–371.
  30. Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, *et al.* (2005) Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats. *J Nutr* **135**, 837–842.
  31. Aust L, Dongowski G, Frenz U, *et al.* (2001) Estimation of available energy of dietary fibres by indirect calorimetry in rats. *Eur J Nutr* **40**, 23–29.
  32. Jeppesen PB & Mortensen PB (1999) Colonic digestion and absorption of energy from carbohydrates and medium-chain fat in small bowel failure. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **23**, S101–S105.
  33. Mortensen PB & Clausen MR (1996) Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* **216**, 132–148.
  34. Pomare EW, Branch WJ & Cummings JH (1985) Carbohydrate fermentation in the human colon and its relation to acetate concentrations in venous blood. *J Clin Invest* **75**, 1448–1454.

## **II. Publication 2: Agreement between indirect calorimetry and traditional tests of lactose malabsorption**

### **Objectifs**

Les tests utilisés pour le diagnostic de la malabsorption du lactose manquent souvent de fiabilité. L'étude présentée dans la publication 1 montre que la mesure du QR, chez le rat, peut mettre en évidence la malabsorption du lactose dans les heures qui suivent son ingestion. Cette étude clinique exploratoire vise à déterminer l'intérêt de suivre le QR (mais aussi la Gox et la Lox) après l'ingestion de lactose dans le but d'identifier une malabsorption chez l'Homme, ainsi que d'évaluer ses corrélations avec les méthodes indirectes traditionnellement utilisées.

### **Matériel et méthodes**

Après recueil des consentements, une série consécutive de sujets a été sélectionnée selon leur statut absorbeur (n=10) ou malabsorbeur (n=10). Ce statut a été déterminé, après une nuit de jeûne, par leur pic glycémique pendant l'heure suivant l'ingestion de lactose (25g) : un pic inférieur à 1.0 mmol/L est spécifique d'un malabsorbeur alors qu'un pic supérieur à 1.5 mmol/L est spécifique d'un absorbeur.

Nous avons suivi leur expiration d'hydrogène et leur cinétique de QR, respectivement pendant 3 et 4h après une nuit de jeûne suivi de l'ingestion de lactose (25g). Les sujets ont également évalué, à la fin du test, l'intensité et la localisation de leurs symptômes gastro-intestinaux.

### **Principaux résultats**

Les différences de QR ( $p = 0.002$ ), de Gox ( $p = 0.009$ ) et de Lox ( $p = 0.006$ ) sont significatives entre les absorbeurs et les malabsorbeurs sur les 100 minutes suivant l'ingestion de lactose. Les différences de QR, Gox et Lox sont également significatives sur la plus courte fenêtre 30-50 minutes (respectivement  $p = 0.001$ ,  $p = 0.002$ ,  $p = 0.001$ ). Le score total des symptômes ( $p = 0.04$ ), notamment les flatulences ( $p = 0.05$ ), et l'intensité de la douleur dans l'hypogastre ( $p = 0.02$ ) sont significativement plus élevées chez les malabsorbeurs que chez les absorbeurs.

Par ailleurs, le QR est bien corrélé aux marqueurs traditionnels de la malabsorption et de l'intolérance :  $R = 0.74$  ( $p < 0.001$ ) avec la glycémie,  $R = -0.51$  ( $p < 0.01$ ) avec le test respiratoire à l'hydrogène et le score total des symptômes  $R = -0.51$  ( $p = 0.05$ ).

### **Conclusions**

Les cinétiques des paramètres métaboliques (QR, Gox et Lox) sont significativement différentes entre des sujets absorbeurs et des sujets malabsorbeurs, sur les 4 heures suivant l'ingestion de lactose. Un suivi de ces paramètres sur la fenêtre 30-50 min après ingestion de lactose révèle des mesures également significativement différentes.

La calorimétrie indirecte semble donc un outil simple et non-invasif pour détecter la malabsorption du lactose. Des études complémentaires sont nécessaires pour préciser la place de ce nouveau test diagnostique dans de plus larges populations.

## **Agreement between indirect calorimetry and traditional tests of lactose malabsorption**

Virginie Alexandre<sup>1,2</sup>, Anne-Marie Davila<sup>1,\*</sup>, Michel Bouchoucha<sup>3</sup>, Claire Bertin<sup>2</sup>, Patrick Even<sup>1</sup>, Christine Lamberto<sup>4</sup>, Daniel Tomé<sup>1</sup>, Robert Benamouzig<sup>3</sup>

<sup>1</sup> AgroParisTech, Nutrition Physiology and Ingestion Behavior, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> Vivatech, 8 rue Christophe Colomb, 75008 Paris, France

<sup>3</sup> Gastroenterology Department, Avicenne Hospital, 93000 Bobigny, France

<sup>4</sup> Functional Explorations Department, Avicenne Hospital, 93000 Bobigny, France

### **\* Corresponding author**

Anne-Marie Davila

AgroParisTech, Nutrition Physiology and Ingestion Behavior Department,  
16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France.

E-mail: [davila@agroparistech.fr](mailto:davila@agroparistech.fr)

Tel: + 33 1 44 08 86 76

Fax: + 33 1 44 08 18 58

**Electronic word count** (excluding abstract, references, tables, figures): 3876

We thank Vivatech for financial support. No conflict of interest has been reported.

## **ABBREVIATIONS**

A: Absorber

Cox: Carbohydrate Oxidation

HBT: Hydrogen Breath Test

Lox: Lipid Oxidation

M: Malabsorber

RQ: Respiratory Quotient

## **ABSTRACT**

### *Background*

Lactose malabsorption occurs frequently and the variably consecutive intolerance may seriously impair quality of life. An adequate diagnostic must be based on a reliable and convenient method but such a test is not yet applied in routine. A recent animal study showed that the respiratory quotient changed significantly after ingestion of sucrose and lactose in naturally lactase-deficient rats.

### *Aims*

This exploratory study evaluated the relevance of monitoring respiratory quotient after lactose ingestion, in order to detect malabsorption.

### *Methods*

10 lactose absorbers and 10 lactose malabsorbers were identified and classified by a lactose tolerance test (25g). After an overnight fast, a second lactose challenge was performed to monitor hydrogen excretions and respiratory quotient kinetics over 4 hours. Participants also completed questionnaires to score and localise their gastro-intestinal symptoms.

### *Results*

Respiratory quotient kinetics were different between absorbers and malabsorbers during the 100 minutes after lactose ingestion ( $p < 0.01$ ), and even during the shorter initial 30-50 minute period. Respiratory quotient was significantly positively correlated to the peak of glycaemia ( $R = 0.74$ ) and negatively to hydrogen excretions ( $R = -0.51$ ) and the symptoms score ( $R = -0.46$ ).

### *Conclusions*

Indirect calorimetry could improve the reliability of lactose malabsorption diagnosis. Studies on larger populations are needed to confirm its validity and to propose a simplified measurement.

## **KEYWORDS**

Lactose malabsorption, diagnostic, respiratory quotient

## INTRODUCTION

Hypolactasia is a widespread intestinal problem that affects almost 75% of the population worldwide, with large variations depending on ethnic background. Despite recent identification of the genetic locus, lactose intolerance remains poorly diagnosed by the medical community, mainly due to the heterogeneity of terminologies and the questionable reliability of the diagnostic tools.

Hypolactasia, which refers to the deficiency or absence of lactase secretion, may be detected in duodenal or jejunal biopsies and by genetic tests. Biopsy is the only direct method but is an invasive technique. The genetic test, identifying some mutations in the gene encoding lactase, has a reported sensitivity of 93-100% and specificity of 95-100%, but remains poorly available.

Several other techniques are available to detect malabsorption, but they present limitations. These tests require the ingestion of a lactose load and include the dynamic study of glycaemia, the analysis of stool pH, urine galactose, the HBT or the measurement of  $^{13}\text{C}$ -glucose in serum or  $^{13}\text{CO}_2$  in exhaled air. Glycaemia analysis presents sensitivity and specificity both reported to be from 70 to 95 % [1], with no reliability in diabetics or in patients with bacterial overgrowth. The stool pH is easily analysed but its reliability may be disturbed by intestinal motility and water reabsorption. Urine galactose presents variable sensitivity (77-96%) and specificity 88-100% [2]. The HBT, quantifying the amount of hydrogen created from the colonic fermentation of the undigested carbohydrates, has been considered a gold standard for over 30 years. Its sensitivity and specificity range from 80-100% and 70-100% respectively [3]. However, around 20% of patients present an intestinal bacterial overgrowth leading to false positive results or a methano-excretion leading to false negative results [4]. Since 2008, it has been suggested to detect both hydrogen and methane in the expired air to reduce the number of false negatives [5]. The monitoring of  $^{13}\text{C}$ -glucose in serum or  $^{13}\text{CO}_2$  in exhaled air following ingestion of labelled  $^{13}\text{C}$ -lactose was developed in 2000. According to these studies, the proportion of lactose malabsorbers is almost 50% higher than described in the literature [6-8]. However, this technique remains rarely used.

Subjective techniques can highlight lactose intolerance, corresponding to the expression of symptoms. The available tests are usually self-completed questionnaires to score the main gastro-intestinal symptoms, such as rumbling, bloating, cramping, nausea and diarrhoea. The sensitivity and specificity of these questionnaires are only 75% and 67% respectively due to

the variability in appreciating one's own symptoms [9], with an overestimation observed in 30% of the subjects [10].

Thus, none of the available techniques allows a precise and absolute diagnosis. In this context, it is useful to evaluate new tools or new combinations in order to optimise the diagnosis of lactose malabsorption.

A recent animal study showed that the kinetics of Respiratory Quotient (RQ), Carbohydrate Oxidation (Cox) and Lipid Oxidation (Lox), after ingestion of sucrose and lactose, depended on the capacity of the host to absorb sugars (Alexandre et al., 2012, British Journal of Nutrition, In Press). Therefore, we aimed to monitor, on selected absorbers and malabsorbers, the RQ, Cox and Lox during after a lactose load (25g) and to evaluate their efficacy in diagnosing lactose malabsorption. Concomitantly, blood sugar levels were measured using a portable glycaemia lector, hydrogen breath excretion was quantified using a portable hydrogen detector, and RQ, Cox and Lox kinetics were monitored using a ventilated-hood system. Symptoms were also evaluated before the ingestion of lactose and after the 4 hours, by subjectively scoring the five main gastro-intestinal symptoms (diarrhoea, pain, nausea, rumbling and bloating).

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Participants*

The study was carried-out on 20 healthy volunteers (10 first lactose absorbers and 10 first lactose malabsorbers) identified by the one-hour glycaemia after lactose ingestion. No participant had gastrointestinal or pulmonary disease, had taken antibiotics or other drugs affecting intestinal function for 8 days prior to the study, or had practiced intense physical activity for two days prior to the study. Additionally, they had followed the nutritional recommendations for meals during the two days before the study [11,12].

### *Experimental protocol*

The study took place in the Gastroenterology Department of Avicenne Hospital (Bobigny, France). After being identified as lactose absorbers or malabsorbers, the participants ingested 25 g of lactose diluted in 250 ml of water after an overnight fast. Their respiratory parameters were measured using a ventilated-hood system (canopy) for four hours and their hydrogen excretions were recorded over three hours. At the end of the test the participants also completed a symptoms questionnaire to score and localise their gastrointestinal symptoms.

### *Lactose tolerance test*

Samples of capillary blood to test glucose concentration were taken at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes, using a *Precision XceedPro* (Abbott, Rungis, France). For each point, measures were performed twice on the same sample and the mean value was recorded. A glycaemia rise equal to or higher than 1.5 mmol/l was considered to be lactose absorption; a plasma glucose rise equal to or lower than 1.0 mmol/l was considered to be lactose malabsorption [1]. All the included participants presented glycaemia peaks above or equal to 1.5 mmol/l for the lactose absorbers and below or equal to 1.0 mmol/l for the lactose malabsorbers, confirming their classifications [13], [2].

### *Hydrogen Breath Test (HBT)*

The exhaled hydrogen was measured in parts per million using a *GastroLyzer* (Bedfont Scientific Ltd, Maidstone, Kent, England). A hydrogen excretion 20 ppm higher than baseline in at least two subsequent measurements was associated to lactose malabsorption [14,15].

### *RQ, Cox and Lox kinetics*

RQ, Cox and Lox were computed from  $VCO_2$  exhaled and  $VO_2$  consumed, recorded every minute, using a canopy *Deltatrac II* (Datex Ohmeda, Limonest, France). In such a system, the subject inspires the atmospheric air through a hole in the capsule and expires via a non return valve into a measurement unit [16-18]. When participants came for the measurements, they were laid down in supination with the canopy overhead. They had at least 30 minutes to become habituated. Once parameters were stable, we recorded 10 minutes of baseline. Then, the participants ingested the lactose and the measurements were launched over 4 hours.

### *Symptom evaluation*

Each participant rated the intensity of the five main gastrointestinal symptoms (nausea, bloating, diarrhoea, borborygmi and abdominal pain), before and after the lactose challenge, on a 10-cm visual analogue scale ranging from 0 (no symptom) to 10 (maximum symptoms) [9]. Symptoms were associated to lactose malabsorption for a mean delta above or equal to 7.5/10 [9].

Pain topology was also evaluated. Participants reported, on a diagram, the pain intensity that they experienced after the lactose challenge, using a 10 point Likert scale ranging from 0 (none) to 9 (extreme): right hypochondrium (segment 1), epigastrium (segment 2), left hypochondrium (segment 3), right lumbar (segment 4), periumbilical (segment 5), left lumbar (segment 6), right iliac (segment 7), hypogastrium (segment 8) and left iliac (segment 9) (Figure 4).

### *Ethics*

The study was conducted according to the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee of Saint-Germain-en-Laye (Paris XI). Written informed consent was given by all participants before inclusion.

### *Statistical analysis*

Results are presented as means  $\pm$  SEM. Analyses were performed with either an ANOVA on repeated measures or a Student's t-test for unpaired data. The areas under the curves for RQ, glycaemia, HBT and symptoms were correlated by computing the Pearson's coefficients. The software used was SAS (version 9.1). The significance level of all statistical analyses was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### *Participants characteristics*

The study was carried-out on the 10 lactose absorbers (mean age:  $29 \pm 4$  years old, men ratio: 40%) and the 10 lactose malabsorbers (mean age:  $39 \pm 4$  years old, men ratio: 20%). No statistical difference was observed for the patients' baseline characteristics, even if a slightly higher mean age was noticed in the malabsorber group (Table 1).

### *Glycaemia*

Peak and evolution of glycaemia over one hour after the lactose ingestion is reported in Figure 1. The average of the peak is  $1.9 \pm 0.2$  mmol/ L blood in the absorbers group while it is  $0.6 \pm 0.1$  mmol/ L blood in the malabsorbers group. The differences were highly significant ( $p < 0.001$ ) since the status of the participants was based on this value. Time and time\*status presented significant effects on glycaemia ( $p < 0.001$  for both) and differences between the two groups became significant from 45 min.

### *Hydrogen Breath Test*

Peak and evolution of expired hydrogen over three hours after the lactose ingestion is reported in Figure 2. An 8-ppm increase was noticed in the absorber group while a significant higher 40-ppm increase was noticed in the malabsorber group ( $p = 0.0002$ ), with a peak reached from 150 min after the lactose ingestion. However, one lactose absorber (A6) presented a hydrogen peak of 23 ppm whereas one lactose malabsorber (M1) presented a hydrogen peak of 10 ppm. Time and time\*status presented significant effects on glycaemia ( $p < 0.001$  for both) and differences between the two groups became significant from 135 min.

### *RQ, Cox and Lox monitoring*

The kinetics of RQ, Cox and Lox during 4 hours after the ingestion of lactose are reported in Figure 3. Time, status and time\*status variables presented significant effects on RQ ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  respectively), Cox ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.004$  respectively) and Lox ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$  respectively). RQ and Lox raised over the time, with a maximum reached around 60 min post-ingestion in both groups, but presented lower increases in the malabsorber group during 100 min post-ingestion ( $p = 0.002$  and  $p = 0.009$  respectively). Lox decreased over the time, with a minimum reached around 60 min post-ingestion in both groups, but presented a lower inhibition in the malabsorber group during 100 min post-ingestion ( $p = 0.006$ ). The differences between the two groups were also significant over the short period of 30-50 minutes after the lactose load ( $p = 0.001$  for RQ,  $p = 0.002$  for Cox,  $p = 0.001$  for Lox).

### *Symptoms evaluation*

Symptom scores and localisation are presented in Figures 4. In the malabsorber group, the total score of symptoms was significantly higher ( $p = 0.04$ ), with an increase in bloating ( $p < 0.05$ ) and in the hypogastrium pain (segment 8) ( $p = 0.02$ ). Indeed, during the test, five participants experienced symptoms with moderate to high intensity and two participants experienced symptoms with low intensity. No other symptom or segment appeared different between the two groups.

### *Correlations between parameters*

The correlations between parameters are presented in Table 2. The correlations between RQ and traditional techniques are good indicators of RQ reliability in diagnosing lactose malabsorption. 1-hour RQ was positively correlated to glycaemia ( $R = 0.74$ ,  $p = 0.0002$ ) and negatively correlated to HBT ( $R = -0.51$ ,  $p = 0.03$ ) and to the total score of symptoms ( $R = -0.46$ ,  $p < 0.05$ ). Other parameters were also significantly correlated such as 1-hour Cox versus glycaemia ( $R = 0.9$ ,  $p = 0.003$ ) and HBT ( $R = -0.99$ ,  $p = 0.04$ ), 3-hour Cox versus hypogastrium pain ( $R = -0.48$ ,  $p = 0.04$ ), and 4-hour Cox versus hypogastrium pain ( $R = -0.49$ ,  $p = 0.03$ ).

### *Individual analyses*

Results of all the completed outcomes, for each participant, are presented in supplementary data (S1). The following cut-offs were used according to the literature: a 1.5 mmol/ L peak for glycaemia [13], a 20 ppm peak for HBT [14] and a score of 8/10 for total symptoms [9]. A 0.05 peak was arbitrarily proposed for the 1 hour-RQ. In the absorber group, one participant

presented divergent results with RQ and glycaemia suggesting lactose absorption while HBT and score of total symptoms suggested malabsorption. In the malabsorber group, five participants were asymptomatic but four of them presented HBT, RQ and glycaemia indicating a malabsorption.

## **DISCUSSION**

The objective of this exploratory study, performed on 10 absorbers and 10 malabsorbers of lactose, was to evaluate the reliability of monitoring RQ after a lactose ingestion to highlight malabsorption.

RQ, as well as Cox and Lox computed from RQ and energy expenditure, presented significant differences between absorbers and malabsorbers during 100 minutes after ingestion of the lactose load, confirming in humans results previously reported in rats. Indeed, normal lactose absorption leads to a switch in the metabolic pathways from lipid utilization in the fasted state to glucose utilization in the post-prandial state. On the opposite, lactose malabsorption leads to a moderate switch or even to no switch at all from lipid to carbohydrate utilizations. Furthermore, monitoring RQ over a short period after ingestion seems to be sufficient to detect malabsorbers. Indeed, differences in RQ changes were observed between absorbers and malabsorbers within 45 minutes after the lactose load ( $p = 0.01$ ), supposing a putative diagnostic usefulness.

RQ changes, in particular the 1 hour-RQ changes were significantly correlated with traditional techniques, such as glycaemia, hydrogen expiration and symptoms. Besides, similar correlations were noticed between RQ and symptoms, and HBT and symptoms, suggesting that RQ could also be used to detect lactose intolerance. However, these two last correlations, RQ versus HBT and RQ versus total score of symptoms are low and clinical relevance may be questioned despite low  $p$ -values.

The total score of symptoms was significantly higher at the end of the test in the malabsorber group compared to the absorber group. The significant symptom reported by the malabsorber group was bloating, which confirms that bloating is the most sensitive symptom of lactose intolerance [19]. Besides, the major localisation of symptoms in the hypogastrium corresponds to the rectosigmoid and is linked to the significant increase of bloating.

The significant differences in the hydrogen expiration confirmed the correct allocation of participants in the two subgroups but raises questions for participants A6 and M1. The status

of participant A6 was confirmed by his glycaemia (1.8 mmol/L) and RQ (0.11) delta versus baseline. Such analysis led us to believe that patient A6 may not have fully respected the recommended residue-free diet, or may have had an undiagnosed intestinal bacterial overgrowth. The status of participant M1 was a bit more uncertain since different status could be determined according his glycaemia (0.3 mmol/L) and RQ (0.08) delta versus baseline. We also noticed that the RQ kinetics were not similar to those of other absorbers and presented abrupt peaks. Such irregular kinetics are more specific to hyperventilation than enhanced glucose oxidation [20,21]. Thus, considering that RQ peaks of participant M1 were an artefact, the kinetics would fit with their low glycaemia peak. Additionally, methanoproduction, occurring in 20% of the population, would account for the absence of both a hydrogen peak and gastro-intestinal symptoms. A second battery of tests, including the evaluation of methane expiration, would be necessary to confirm or rebut our diagnostic.

In conclusion, these two participants illustrated well the questionable reliability of HBT and our exploratory clinical study suggests that monitoring RQ may optimise the diagnostic of lactose malabsorption. However, we have to concede that the main limitation of RQ is the risk of hyperventilation, disturbing the kinetics. The baseline step should not be neglected and should last at least 30 minutes before the beginning of recording, which raises the problem of duration. The initial selection of lactose absorbers and malabsorbers participants must also be more restrictive, in order to prevent from wrong classification. To do so, an option is to combine the glycaemia tests and the HBT as inclusive criteria.

Future work will involve confirming the reliability of RQ for detecting lactose malabsorption in larger and more variable populations, such as participants presenting a glycaemia peak in the twilight zone, diabetics, patients with an intestinal resection, patients with a short transit time. Complementary studies would help to determine standard responses in each population, to identify the specific time of response in order to reduce the time window of RQ measurements, and to define a degree of malabsorption depending on the amplitude of the RQ changes. At last, complementary studies are essential to optimize the design of the protocol by defining specific points of measurements that would reduce the time under the canopy and discomfort for the patient, but would also allow simultaneous evaluation of 2 or 3 patients (as actually possible with the HBT).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We gratefully acknowledge Marie-Claude Amard and Philippe Gomez for their technical assistances, and Nachiket Nadkarni for his helpful English advice. We also thank Claire Bertin from Vivatech for financial support. No conflict of interest has been reported.

## REFERENCES

- [1 Jarvela IE: Molecular diagnosis of adult-type hypolactasia (lactase non-persistence). *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65:535-539.
- 2 Arola H: Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;202:26-35.
- 3 Rosado JL, Solomons NW: Sensitivity and specificity of the hydrogen breath-analysis test for detecting malabsorption of physiological doses of lactose. *Clin Chem* 1983;29:545-548.
- 4 Pylaris E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzivras D, Koussoulas V, Barbatzas C, Pimentel M: The prevalence of overgrowth by aerobic bacteria in the small intestine by small bowel culture: Relationship with irritable bowel syndrome. *Digestive diseases and sciences*;57:1321-1329.
- 5 Hovde O, Farup PG: A comparison of diagnostic tests for lactose malabsorption--which one is the best? *BMC Gastroenterol* 2009;9:82.
- 6 Koetse HA, Stellaard F, Bijleveld CM, Elzinga H, Boverhof R, van der Meer R, Vonk RJ, Sauer PJ: Non-invasive detection of low-intestinal lactase activity in children by use of a combined  $^{13}\text{C}/\text{H}_2$  breath test. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:35-40.
- 7 Vonk RJ, Lin Y, Koetse HA, Huang C, Zeng G, Elzinga H, Antoine J, Stellaard F: Lactose (mal)digestion evaluated by the  $^{13}\text{C}$ -lactose digestion test. *Eur J Clin Invest* 2000;30:140-146.
- 8 Vonk RJ, Stellaard F, Priebe MG, Koetse HA, Hagedoorn RE, De Bruijn S, Elzinga H, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM: The  $^{13}\text{C}/2\text{h}$ -glucose test for determination of small intestinal lactase activity. *Eur J Clin Invest* 2001;31:226-233.
- 9 Casellas F, Varela E, Aparici A, Casaus M, Rodriguez P: Development, validation, and applicability of a symptoms questionnaire for lactose malabsorption screening. *Digestive diseases and sciences* 2009;54:1059-1065.
- 10 Casellas F, Aparici A, Casaus M, Rodriguez P, Malagelada JR: Subjective perception of lactose intolerance does not always indicate lactose malabsorption. *Clin Gastroenterol Hepatol*;8:581-586.
- 11 Kerlin P, Wong L: Breath hydrogen testing in bacterial overgrowth of the small intestine. *Gastroenterology* 1988;95:982-988.

- 12 Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ: Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: An evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *The American journal of gastroenterology* 2002;97:1113-1126.
- 13 Fielding JF, Baynes S, Fottrell PJ: The lactose tolerance test and intestinal lactase activity. *Irish journal of medical science* 1983;152:196-198.
- 14 Casellas F, Malagelada JR: Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. *Digestive diseases and sciences* 2003;48:1333-1338.
- 15 Corazza GR, Sorge M, Strocchi A, Lattanzi MC, Benati G, Gasbarrini G: Methodology of the h<sub>2</sub> breath test. II. Importance of the test duration in the diagnosis of carbohydrate malabsorption. *Ital J Gastroenterol* 1990;22:303-305.
- 16 Levine JA: Measurement of energy expenditure. *Public Health Nutr* 2005;8:1123-1132.
- 17 Levine JA, Schleusner SJ, Jensen MD: Energy expenditure of nonexercise activity. *The American journal of clinical nutrition* 2000;72:1451-1454.
- 18 Weissman C, Damask MC, Askanazi J, Rosenbaum SH, Kinney JM: Evaluation of a non-invasive method for the measurement of metabolic rate in humans. *Clin Sci (Lond)* 1985;69:135-141.
- 19 Beyerlein L, Pohl D, Delco F, Stutz B, Fried M, Tutuian R: Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50 g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:659-665.
- 20 Brandi LS, Bertolini R, Calafa M: Indirect calorimetry in critically ill patients: Clinical applications and practical advice. *Nutrition* 1997;13:349-358.
- 21 Lev S, Cohen J, Singer P: Indirect calorimetry measurements in the ventilated critically ill patient: Facts and controversies--the heat is on. *Crit Care Clin*;26:e1-9.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Glycaemia peak (A) and evolution (B) over one hour after the lactose ingestion.

(■), (●): Lactose malabsorbers; (□), (○): Lactose absorbers. Data are presented as means  $\pm$  SEM and are compared by a Student's test for unpaired data. (\*):  $p < 0.05$ . Time, status and time\*status effects are evaluated by an ANOVA. A p-value over 0.05 is considered as not significant.  $n = 20$ .

**Figure 2:** Expired hydrogen peak (A) and evolution (B) over three hours after the lactose ingestion. (■), (●): Lactose malabsorbers; (□), (○): Lactose absorbers. Data are presented as means  $\pm$  SEM and are compared by a Student's test for unpaired data. (\*):  $p < 0.05$ . Time, status and time\*status effects are evaluated by an ANOVA. A p-value over 0.05 is considered as not significant. ppm: part per million.  $n = 20$ .

**Figure 3:** RQ (A), Cox (B) and Lox (C) kinetics over four hours after the lactose challenge. (●): Lactose malabsorbers; (○): Lactose absorbers. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Time, status and time\*status effects are evaluated by an ANOVA. A p-value over 0.05 is considered as not significant. RQ, Cox and Lox changes are also compared over 100 minutes after the lactose challenge by a Student's test for unpaired data. (\*):  $p < 0.05$ .  $n = 20$ .

**Figure 4:** Symptoms score amplitude (A) and abdominal pain topology (B), at the end of the lactose challenge. (□): Lactose absorbers; (■): Lactose malabsorbers. Data are presented as means  $\pm$  SEM and are compared by a Student's test for unpaired data. (\*):  $p < 0.05$ .  $n = 20$ .

### **III. Publication 3: Intestinal microbiota modulation and physiological consequences on the host, during a chronic lactose malabsorption**

#### **Objectifs**

Peu de travaux ont étudié *in vivo* les variations métaboliques et physiologiques consécutives à une malabsorption chronique de lactose. L'objectif de ce travail est de suivre les modulations de la composition et de l'activité du microbiote intestinal ainsi que les conséquences sur la physiologie de l'hôte malabsorbeur, lors d'une ingestion subchronique (6 jours) de lactose chez le rat.

#### **Méthodes**

Nous avons utilisé des rats mâles Wistar (350-400g) répartis en 2 groupes recevant un régime équilibré contenant soit 25 % de lactose (groupe L25 expérimental) soit 25 % de saccharose (groupe S25 contrôle *pair-fed*). Nous avons effectué des abattages séquentiels au 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> jour de régime (6 rats de chaque groupe par jour). Lors de ces abattages, nous avons prélevé du sang porte, les contenus intestinaux et des segments coliques (proximaux, médians et distaux). Les acides gras à chaînes courtes (AGCC) et le lactate ont été dosés respectivement par chromatographie en phase gazeuse et par kits enzymatiques dans les contenus intestinaux et dans le sang porte. Les dynamiques de populations bactériennes prédéfinies (lactobacilles, bifidobactéries, entérobactéries, entérocoques, clostridies, bactéries sulfato-réductrices, bactéries acétogènes, archées méthanogènes) ont été suivies par qPCR absolue, dans le caecum et le côlon. La myeloperoxydase (MPO) a été quantifiée par dosage enzymatique dans la muqueuse colique proximale et distale, et une étude histologique a été réalisée dans la muqueuse colique médiane. La présence de sang dans les selles (mise en évidence par le test Hemocult) ainsi que l'osmolarité et le pH des contenus caeaux et coliques ont également été évalués.

#### **Principaux résultats**

La comparaison au cours du temps du groupe L25 versus S25 *pair-fed* montre une stabilité du nombre de bactéries totales, malgré une prolifération des groupes bactériens fermentaires primaires et/ou à activité beta-galactosidase-positif dans le caecum et le côlon proximal et des groupes hydrogénéotrophes dans le côlon proximal et distal. Après 6 jours de régime L25, la prédominance des bifidobactéries et des groupes *Lactobacillus* et *Bacteroides* s'installe

dans le caecum ; celle des bactéries lactiques et du groupe *Bacteroides* s'installe dans le côlon proximal ; celle des bifidobactéries et du groupe *Bacteroides* s'installe dans le côlon distal. Les bactéries sulfato-réductrices diminuent dans tous les segments à la faveur des bactéries acétogènes dans le caecum et le côlon proximal (effet régime  $p < 10^{-4}$ ), et à la faveur des bactéries acétogènes et des archées méthanogènes dans le côlon distal (effet régime  $p < 10^{-4}$ ). Parallèlement, l'activité beta-galactosidase est supérieure dans le caecum du groupe L25, (effet temps\*régime  $p < 0.05$ ). Les concentrations coliques en AGCC deviennent significativement supérieures dans le groupe L25, en comparaison au groupe S25, avec une interaction temps\*régime notamment dans le caecum ( $p = 0.007$ ), le côlon distal ( $p = 0.002$ ) et le sang porte ( $p = 0.009$ ). Les concentrations sanguines en AGCC présentent une nette augmentation à J1, suivie d'une stabilisation à J2. Enfin, l'activité MPO et l'histologie des muqueuses traduisent un état inflammatoire transitoire à J1 et J2 pour le groupe L25 avec notamment une activité MPO supérieure dans le côlon proximal ( $p=0.04$ ) et le côlon distal ( $p=0.03$ ), un ratio (aire de la muqueuse/ aire de la section) plus petit ( $p=0.03$ ) et un ratio cellules (muco-sécrétrices/ colonocytes) plus grand ( $p=0.04$ ). L'atténuation de ces paramètres, observée au jour 6, laisse supposer une réduction de l'inflammation et une habitude de l'hôte aux conséquences de l'ingestion chronique de lactose.

## **Conclusions**

L'ingestion subchronique de lactose modifie donc la composition et l'activité du microbiote intestinal. Les premiers jours d'ingestion de lactose sont associés à une activité fermentaire importante du microbiote intestinal, à un faible recyclage des métabolites bactériens coliques et à un remaniement de la proportion de chaque population constitutive. Au fil des jours, l'évolution de la composition du microbiote intestinal se poursuit et laisse supposer un meilleur recyclage des métabolites du lactose. Cette période est aussi associée à une réduction de l'inflammation de la muqueuse. Ces résultats soutiennent l'idée que l'ingestion régulière de lactose pourrait, après plusieurs jours d'adaptation du microbiote intestinal, avoir un effet sur la physiologie de l'hôte et notamment sur l'amélioration de sa tolérance.

**Intestinal microbiota modulation and physiological consequences on the host, during a chronic lactose malabsorption<sup>1-4</sup>**

Virginie Alexandre<sup>5,6</sup>, Yolanda Sanz<sup>7</sup>, Antoine Martin<sup>8</sup>, Annaïg Lan<sup>5</sup>, Robert Benamouzig<sup>9</sup>, François Blachier<sup>5</sup>, Daniel Tomé<sup>5</sup>, Anne-Marie Davila<sup>5,\*</sup>

<sup>5</sup> AgroParisTech, UMR 914, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, 75005 Paris, France

<sup>6</sup> Vivatech, 75008 Paris, France

<sup>7</sup> Institute of Agrochemistry and Food Technology, National Research Council (IATA-CSIC), Valencia, Spain.

<sup>8</sup> Laboratory of Anatomical Pathology, AP-HP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

<sup>9</sup> Gastroenterology Unit, CRNH IdF, AP-HP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

Running title: Adaptation to lactose malabsorption

1: Financial support from Vivatech

2: Authors disclosures: Virginie Alexandre, Yolanda Sanz, Antoine Martin, Robert Benamouzig, Annaïg Lan, François Blachier, Daniel Tomé, Anne-Marie Davila. No conflict of interest.

3: Supplemental data: S1 to S7

4: Abbreviations used: ANOVA; MPO, Myeloperoxidase; PCR, Polymerase Chain Reaction; SCFA, Short Chain Fatty Acids.

\*: To whom correspondence should be addressed: Anne-Marie Davila, [davila@agroparistech.fr](mailto:davila@agroparistech.fr).

## **Abstract**

Lactose malabsorption has been mainly studied for acute ingestion and consequences of chronic lactose malabsorption remain unclear. This study monitors the potential adaptations of both the intestinal microbiota and the malabsorber host, during prolonged lactose ingestion. Two groups of Wistar male rats received a diet containing either 25 % of lactose (experimental L25 group) or 25% of sucrose (S25 *pair-fed* control group). Sacrifices were carried-out after 1, 2 and 6 days of diets. Intestinal contents were sampled to evaluate the microbiota composition and activity. Portal blood and colonic mucosa were sampled to evaluate the host physiology. The microbial composition revealed stability in the number of total bacteria over both diets, with a reshaping in the dominance of genus and bacterial groups according to an increasing gradient pattern from caecum to distal colon in the L25 group. Generally, the evaluated micro-organisms were more abundant in the intestinal contents of L25 group. The fermentative capacity was rapidly stimulated (increase of lactic acid bacteria and other fermentative bacteria). The hydrogen-recycling capacity was also quickly stimulated in distal colon (increase of acetogenic bacteria and methanoarchaea) and more slowly in caecum and proximal colon. Concomitantly, in the L25 group compared to the S25 *pair-fed* group, the beta-galactosidase activity increased in caecum (diet effect:  $p < 0.001$ ) and proximal colon (diet effect:  $p < 0.05$ ), as well as the intestinal and plasmatic SCFA concentrations. Consequently, the caecal, proximal and distal colonic contents were acidified (diet effect:  $p < 0.001$  for each). A transient inflammatory state was observed in the colon of L25 group by a MPO activity higher in the proximal ( $p = 0.04$ ) and distal ( $p = 0.03$ ) colon and by a lower ratio mucosa area/ section area ( $p = 0.03$ ), especially during the first days of L25 diet. These findings reveal that a prolonged ingestion of lactose changes the colonic microbiota and leads to an adaptation of the host's physiology.

## Introduction

Consequences of lactose malabsorption have been mainly described for acute ingestion, in animal and clinical studies. The origin and mechanisms leading to the symptoms of intolerance remain unclear. Nevertheless, it is well established that acute malabsorption is associated to a reduction of the oro-caecal transit time (1-5), an activation of the intestinal motility (6, 7), an enhancement of the intestinal fermentation (8-10), and an increase of visceral sensitivity (11, 12).

Consequences of a lactose malabsorption are less described after chronic ingestions. Phyla composing the microbiota are quite stable over the life but diet, especially its indigestible fraction, influences the repartition of species and functional groups (13). However, few data are available on the modifications induced by a prolonged lactose malabsorption. *In vitro* and *ex vivo* studies usually evaluated the evolutions of lactobacilli and bifidobacteria over a chronic malabsorption of lactose. They underlined a proliferation of lactobacilli and bifidobacteria, a stimulation of beta-galactosidase activity and an increase of lactate concentrations, in a continuous culture system and at the optimal pH of 6.7 (14, 15). One clinical study compared the microbiota composition of lactose malabsorbers at baseline and found no difference, especially in the number of bacteria with a beta-galactosidase activity (16). Another clinical study compared the modification of the microbiota composition in malabsorbers, after a 2-week ingestion of lactose, and highlighted only a proliferation trend of lactobacilli and bifidobacteria (2). Other trials revealed that a 2-week ingestion of lactose by a malabsorber had similar consequences as lactulose, ie an increase of faecal beta-galactosidase and a decrease of faecal pH, hydrogen expiration and bloating (17, 18). Therefore, the literature suggests an adaptation of the malabsorber host under chronic ingestion, associated with a reduction of the clinical symptoms. Since the endogenous lactase is not an inducible enzyme (19), the adaptation may be connected to other functional modifications such as the microbiota composition and metabolic activity or host physiological adaptations. The understanding of such mechanisms is essential to optimise the clinical approach and care of lactose intolerance.

We performed an animal study to highlight the mechanisms of modulation and adaptation to a chronic ingestion of lactose by a malabsorber host. For this purpose, we compared series of parameters related to microbiota and host physiology (in large intestine) between the L25 group receiving a lactose-containing diet (experimental group) and the S25 *pair fed* group receiving a sucrose-containing diet (control group). Modifications in intestinal microbiota

composition were monitored through real-time PCR enumerations and modifications in microbiota metabolic activity were monitored through beta-galactosidase activity, SCFA and lactic acid quantifications. The overall luminal environment was characterized with pH and osmolarity . The host physiology was described by SCFA or lactic acid measurements in portal blood, myeloperoxidase activity quantification and histological observation of colonic mucosa.

## **Material and methods**

### *Animals and diets*

The experiments were carried out following the European directive 2010/63/UE relative to the protection of animals used for scientific purposes, and were approved by the ethical committee of INRA (Approval reference 12/002).

36 male Wistar rats (350-400g) were housed under an artificial 12:12 L/D cycle (lights on at 8:00 am). Being more than twelve weeks old at the onset of the studies, they were naturally lactase deficient. Rats were adapted during 8 days to a standard diet of 74% carbohydrate (63% starch, 11% sucrose), 14% protein and 12% fat as energy. This standard diet was composed of dairy proteins (140 g/kg), starch (622 g/kg), sucrose (100 g/kg), cellulose (50 g/kg), soybean oil (40 g/kg), mineral mix AIN-93M (35 g/kg), vitamin mix AIN-93V (10 g/kg) and choline (2.3 g/kg) (20). The experimental test meals were composed of the standard diet modified to contain 25% (w/w) of either lactose (experimental group, termed L25) or sucrose (*pair-fed* control group, termed S25 *pair-fed*), added at the expense of starch. The rats were randomly assigned to one of these groups, L25 or S25 *pair-fed*.  $n_{i,j,k} = 36$  rats were serially sacrificed for sample collection where:  $i(\text{diet})=1,2$  (1=L25, 2=S25),  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  (1=1day, 2=2days, 3=6days) and  $k(\text{rat})= 1,\dots,6$ . The sacrifices were performed after 1, 2 and 6 days, 13 hours after the last meal, by an intra-peritoneal injection of pentobarbital (0.1 ml/ 100 g bw).

### *Sample collection and storage*

Portal blood (2 ml) was sampled directly from the hepatic vein, using a heparinised syringe. Blood samples were centrifuged for 4 min at 4°C and 600 g. 315 µl of the plasmatic fractions were mixed with 35 µl of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> for further derivatization and gas chromatography (GC) quantification of SCFA. The rest of the plasmatic fraction was kept in tubes for analyses by enzymatic assays. All samples were stored at -80°C until analyses.

Caecal and colonic contents were sampled in sterile microtubes to determine SCFA and lactate concentrations (500 mg). SCFA and lactate were extracted from caecal and colonic contents by vigorous mixing with respectively 0.9 fold and 1.8 fold of deionised water. The mixture was centrifuged and 315 µl of the supernatants were mixed with 35 µl of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and stored at -80°C until derivatization and GC quantification. The rest of the supernatants were either used directly to measure pH and osmolarity or stored at -80°C for lactate quantification.

For microbiological quantifications, 200 mg of caecal and colonic contents were placed in 300 µl of PBS and stored at -80°C until analyses.

For beta-galactosidase activity determination, 100 mg of caecal and colonic contents were placed in microtubes and mixed with 900 µl of phosphate buffer (0.05 M, pH= 6.8). After careful homogenisation, the tubes were centrifuged 5 min at 200 g. The supernatants were kept in new tubes and 500 µl of phosphate buffer was added to suspend the pellets. The last two steps were repeated twice. The three supernatants, originating from the same sample, were pooled and centrifuged 3 min at 9000 g and 4°C. The pellet was resuspended with 100 µl of lysis buffer and stored at -20°C until analysis.

The colonic tissues were washed in ice cold 0.9 % (w/v) NaCl (pH 7.0). 1 cm of the proximal segment and 1 cm of the distal segment were removed, directly placed in liquid nitrogen and stored at -80°C until MPO analyses. 1 cm of the median segment was removed for the histological analyses and placed in paraformaldehyde 7 % for 24 hours at room temperature. Then the segments were equally divided (2\*0.5 cm) and placed in ethanol 70 % at 4°C, until inclusion and lame preparations.

#### *Microbiological analyses*

Caecal and colonic samples were used for DNA extraction using the QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). qPCR was used to quantify the different bacterial groups of faecal microbiota using genus- and group- specific primers described in Table 1 (21-28). Briefly, PCR amplification and detection were performed with a stepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) using Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The reaction mixture was composed of 1 µl of DNA, 5 µl of Fast Syber Green Master Mix, 0.1 to 0.3 µl of each primer, and sterile water up to 10 µl. Quantification was performed using standard curves, established with known concentrations of plasmids containing the respective DNA amplicon for each set of primers, as previously described (29).

### *SCFA quantification*

The SCFA were measured after derivatization (esterification) with a modified Kristensen technique (30), followed by GC. This method is based on SCFA esterification by 2-chloroethylchloroformate in aqueous and acid medium, using isocaproic acid as internal standard. More precisely, the samples (350  $\mu$ l) prepared as mentioned above were mixed with 20  $\mu$ l 37% HCl and 100  $\mu$ l of a 1% isocaproate solution (w/v). Then 750  $\mu$ l acetonitrile, 750  $\mu$ l 2-chloroethanol and 100  $\mu$ l pyridine were added. After careful homogenization, the mixtures were centrifuged during 10 min at 3000 rpm and 4°C. The reaction was initiated by adding 50  $\mu$ l 2-chloroethyl chloroformate to 1.5 ml of the supernatant. Subsequently 4 ml of distilled water was added and the esters were extracted with 500  $\mu$ l of cyclohexane. They were analyzed with a gas chromatograph (Varian CP3800) equipped with a capillary column (30 m, 0.32 mm i.d., Restek Rtx 502.2) and fitted with a flame ionization detector and a split/splitless injector. Helium was used as the carrier gas (1 ml/min) and 6  $\mu$ l of each sample was injected. The column was maintained at 75°C for 6 s then the temperature was increased to 170°C at a rate of 7°C/min. This temperature was maintained for 10 min, before being increased to 220°C (50°C/min) and kept for 3 min. The injector and the detector were utilized respectively at 200°C and 300°C. The amount of SCFA was determined with reference to an internal standard (isocaproate) and external standards (200 mM acetate, 80 mM propionate, 80 mM butyrate, 10 mM isobutyrate, 10 mM isovalerate, 8 mM valerate and 8 mM caproate).

### *Lactate enzymatic assay*

D/L-lactate concentrations were determined with a commercial kit (Megazyme International Ireland Limited, Wicklow, Ireland). Samples, prepared as mentioned above, were homogenised and centrifuged during 5 min at 4°C and 14000 g. The supernatant was collected for a second centrifugation during 15 min at 4°C and 14000 g. 500  $\mu$ l of the supernatant was applied to a spin column of a centrifuge nanosep filter (30 kD) (Pall Corporation, Saint-Germain-en-Laye, France) and centrifuged at 4°C and 14000 g, until filtration of the whole volume. D/L lactate was then quantified in the final ultra-filtrates, according to the manufacturer's recommendations.

### *pH and osmolarity measurements*

The measurements were performed on 100  $\mu$ l of filtrated intestinal samples. Osmolarity and pH were measured using respectively a Löser Osmometer (Camlab, Cambridge, UK) and pH strip tests (Merck, Darmstadt, Germany).

#### *Determination of beta-galactosidase activity*

Two freeze (- 20°C) and thaw (37°C) cycles were performed to lyse the cells. After the preparation of the samples according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen, Saint Aubin, France), the spectrophotometric reading was performed at 420 nm.

#### *Determination of specific myeloperoxidase activity*

500 µL of phosphate buffer (50 mM, pH 6), containing 0,5% of hexadecyl trimethylammonium bromure (HTAB), were added to the defrozen samples. Homogenization was performed by mechanical lysis (2\*10 sec) with an Ultraturax (Ultra Turrax T25, IMLAB, Lille). Then the samples were centrifuged during 30 min at 10 000 g and 4°C. The supernatants were kept on ice. The pellet was resuspended with 500 µL of phosphate buffer containing HTAB and submitted to freeze (1 min in liquid nitrogen) and thaw (10 min in 37°C water-bath) cycles, followed by mechanical lysis with an Ultraturax (3\*3 sec). The mixture was centrifuged. Then, the three supernatants were pooled and used to determine MPO activity. 50µL of the supernatant were mixed with 50 µL of phosphate buffer (50mM, pH 6, HTAB 0.5 %), 238 µL of 6 µL of phosphate buffer (50mM, pH 6), 6 µL of O-dianisidine dihydrochlorure (20mg/mL) and 6 µL of hydrogen peroxide. The activity of MPO was determined at 450 nm, from the differences between absorbance at 10 minutes and initial absorbance. The total protein content was determined on 5 µl of the same sample with a commercial kit (Biorad, Strasbourg, France) based on the Bradford dye-binding method, according to the manufacturer's recommendations.

#### *Histological analysis*

The histological preparations of colonic segments were performed by the histological and morphological platform of Cochin Institute (Paris XIII, France) and then analysed using an optic microscope Axio Imager Z1 (Zeiss, Le Pecq, France). The ratio mucosa/ total section was electronically computed on the whole sections with the software Fiji version 32. The numbers of inflammatory clusters, goblet cells, colonocytes, eosinophil and polynuclear cells were enumerated on four sections of each preparation, and their means were recorded.

#### *Statistical analyses*

Results are presented as means ± SEM. Analyses were performed with either an ANOVA or a Student's t-test for the unpaired data, both using the software SAS (version 9.1). Pearson's coefficients were computed to correlate the parameters. The significance level of all statistical analyses was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### *Microbiological analyses*

The microbiological analyses were performed by qPCR on caecal and colonic contents. Table 2 (A, B and C) presents the results of specific genus or bacterial groups enumerations after 1, 2 and 6 days of L25 and S25 *pair-fed* diets. The total number of bacteria remained stable during the experiment, all along the intestines (caecum, proximal colon and distal colon). The S25 *pair-fed* group exhibited a segment-specific composition of the dominant microbiota (at least 8.log10 copies/g content) that was reshaped with L25 diet. Indeed, in caecum, the *Clostridium leptum* group was no longer in the dominant microbiota from day 2. In proximal colon, *Lactobacillus* and *Clostridium coccoides* groups caught up with the dominant microbiota from day 1 and *Clostridium leptum* group became subdominant from day 2. In distal colon, *Bifidobacterium*, acetogenic bacteria, *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Clostridium coccoides* groups caught up with the dominant microbiota from day 1. Generally, the micro-organisms evaluated in this study were significantly more abundant in the intestinal contents of L25 group with an increasing gradient number from caecum to distal colon (Table 2). Diet variable presented significant effect mainly on the populations of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* group, *Enterococcus* and methanoarchaea in proximal and distal colon (Supplemental data S1).

Relative variations of the microbiota (L25/S25) are also presented in Figures 1-2-3. The statistical analysis revealed that time\*bacteria variables had significant effects lactic acid bacteria (LAB) in caecum, and for non LAB-fermentative bacteria and hydrogenotrophic bacteria in all segments. In all these cases, the population dynamics of bacteria may be taken into account. The L25/S25 ratios were high for all LAB, in all intestinal segments (Figure 1). At day 6, the ratios remained high for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* group in caecum and for all LAB in proximal colon and moderately high for all LAB in distal colon. The population dynamics of non LAB (Figure 2) were also deeply shaped by the intestinal segment. At day 6, L25/S25 ratios remained high for *Bacteroides* and *Clostridium coccoides* groups in caecum, for the enterobacteriaceae, *Bacteroides* and *Clostridium coccoides* groups in proximal colon and mainly for *Bacteroides* group in distal colon. L25/S25 ratios of the *Clostridium leptum* group decreased continuously in colon over the 6 days of experiment, especially in proximal colon. The relative evolutions of hydrogenotrophic bacteria (Figure 3) were characterized by a transient increase of the L25/S25 ratios of sulfate-reducing bacteria at day 1, followed by a decrease from day 2 to day 6. This trend was particularly pronounced in

caecum. The L25/S25 ratios of acetogenic bacteria and methanoarchaea were increasingly higher from caecum to distal colon.

#### *Determination of beta-galactosidase activity*

Beta-galactosidase activity was quantified in caecal and colonic contents of L25 and S25 *pair-fed* groups (supplemental data S2). Time, diet and time\*diet variables presented significant effects on caecal beta-galactosidase activity ( $p=0.01$ ,  $p<0.001$  and  $p<0.05$  respectively), and time and diet variables presented significant effects on colonic beta-galactosidase activity ( $p=0.02$  and  $p=0.04$  respectively). Significant differences between L25 and S25 *pair-fed* diet were especially observed in caecum after 1 day of diet ( $p<0.01$ ) and in colon after 6 days of diet ( $p<0.001$ ).

#### *SCFA quantification in intestinal contents and portal blood*

SCFA were quantified in intestinal contents and portal blood in L25 and S25 *pair-fed* groups (Figure 4). Time, diet and time\*diet variables presented significant effects on SCFA concentrations in caecum ( $p=0.004$ ,  $p=0.001$  and  $p=0.007$  respectively), distal colon ( $p=0.002$ ,  $p=0.002$  and  $p=0.02$  respectively) and portal blood ( $p=0.03$ ,  $p<0.001$  and  $p=0.009$  respectively) whereas only time variables presented significant effects on SCFA concentrations in proximal colon ( $p=0.01$ ). Significant differences between L25 and S25 *pair-fed* groups were especially noted at day 1 in caecum ( $p<0.001$ ), days 2 and 6 in distal colon ( $p<0.05$  for both), and day 2 in portal blood ( $p<0.001$ ). Table 3 highlights the differences in intestinal and sanguine SCFA, between the two groups. Indeed, in the L25 group compared to the S25 *pair-fed* group, concentrations in acetate, propionate and butyrate ( $p<0.001$ ) were higher in caecum ( $p=0.003$ ,  $p=0.02$ ,  $p<0.001$  respectively), distal colon ( $p=0.01$ ,  $p=0.01$ ,  $p<0.05$  respectively) and portal blood ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  respectively). Overall, total SCFA over the L25 diet, in each colonic segment (30 % in caecum, 3-fold in proximal colon and 4-fold in distal colon).

Lactate was also quantified in the caecum of L25 and S25 *pair-fed* groups (supplemental data S3). Only diet variable presented significant effects on caecal lactate concentrations ( $p<0.001$ ) and differences between the two groups were observed at days 1 ( $p<0.001$ ), 2 ( $p<0.01$ ) and 6 ( $p<0.05$ ).

#### *pH and osmolarity*

pH and osmolarity were measured in caecum, proximal colon and distal colon (supplemental data S4 and S5). Diet and time\*diet variables presented significant effects on pH in caecum ( $p<0.001$  and  $p=0.02$  respectively), proximal colon ( $p<0.001$  and  $p=0.03$  respectively) and

distal colon ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  respectively). Significant differences between the two groups were observed after 1, 2 and 6 days of diet ( $p < 0.001$  for each). Interestingly, osmolarity was negatively correlated to pH in the proximal colon ( $R = -0.46$ ,  $p = 0.02$ ). Indeed, diet presented significant effects on osmolarity in proximal ( $p = 0.04$ ) and distal colons ( $p < 0.01$ ).

#### *MPO activity*

MPO activity was quantified in the proximal and distal colonic mucosa (Figure 5). Time and time\*diet variables presented significant effects on the MPO activity in proximal colon ( $p = 0.04$  for both). MPO activity was significantly higher in the L25 group compared to the S25 *pair-fed* group, especially at day 2, both in proximal ( $p = 0.03$ ) and distal colon ( $p = 0.02$ ).

#### *Histological analysis*

The histological analyses revealed significant differences between L25 and S25 *pair-fed* groups. Indeed, a general lower ratio [mucosa/ total section] ( $p = 0.03$ ) and a general higher ratio [goblet cells/ colonocytes] ( $p = 0.04$ ) were observed in the L25 group, with main differences at day 1 and day 2 (Supplemental data S6). No significant difference was observed in the numbers of inflammatory clusters or eosinophil cells.

## **Discussion**

This study underlined the modulation of the intestinal microbiota and the consequences on the malabsorber host's physiology, over a prolonged ingestion of lactose.

The first aspect of the intestinal modulation concerns the modification of microbiota composition. Despite a stable number of total bacteria, groups and genus repartitions were modified in L25 group, compared to S25 *pair-fed* group. In caecum, the profile variations of dominant microflora were more limited than in other segments since it is usually the main intestinal part where easily fermentable substrates are fermented. However, lactose profoundly affected the population dynamics of fermentative bacteria (LAB and non-LAB) over the 6 days of experiment. At day 6, the numbers of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* group, *Clostridium coccoides* and *Bacteroides* groups drastically increased. At day 6, lactic acid bacteria and *Bacteroides* group became predominant in proximal colon whereas *Bifidobacterium* and *Bacteroides* group became predominant in distal colon. *Clostridium leptum* group became sub-dominant over the 6 days of experiment in caecum and distal colon. Lactobacilli and bifidobacteria proliferations are usually considered as favourable for gut health, however *Clostridium leptum* decrease has been described as a common trait of IBD

microbiota (31, 32). Sulfate-reducing bacteria were stimulated over a temporary period in all intestinal contents. The numbers of methanoarchaea increased in all intestinal segments, especially in distal colon, and the numbers of acetogenic bacteria increased, especially in proximal and distal colons. Such proliferations actually reveal two successive proliferation waves in caecum and proximal colon of L25 group. The first wave corresponds to the rapid growth of some LAB and non LAB fermentative bacteria (*Bifidobacterium*, *Bacteroides* group, enterobacteriaceae and *Lactobacillus* group), responsible for the production of osmotic compounds and presumably the development of the intolerance symptoms (33). The second wave, corresponding to the quite slow growth of bacteria with the ability to recycle the generated metabolites (acetogenic bacteria, sulfate-reducing bacteria and methanoarchaea) that is supposed to recycle the osmotic compounds and gases produced and to play a key role in the alleviation of intestinal symptoms (34-36). Interestingly, the growth kinetics of fermentative bacteria and hydrogenotrophic bacteria were quite similar in distal colon of L25 group. Furthermore, sulfate-reducing bacteria are the only hydrogenotrophic bacteria exhibiting an increased followed by a decreased concentration over the lactose diet, probably due to the depletion in sulfates (diet or more probably sulfomucins). Moreover, despite their competition for hydrogen, acetogenic bacteria and methanoarchaea proliferated with parallel kinetics but the broad range of substrates used by acetogenic bacteria (such as SCFA, organic acids, mono-di-tri-tetra saccharides) confer them a fitness advantage over this lactose diet (37).

The second aspect of the colonic modulation concerns the modification of microbiota metabolic activity. The beta-galactosidase activity increased over the first two days of L25 diet, similarly to results obtained on the stools of lactose intolerant volunteers (38), before decreasing. This enzymatic kinetic may be related to the dynamics of the previously mentioned beta-galactosidase positive bacteria (39-41). Furthermore, the enhanced production of lactate and SCFA in the L25 group may be attributed to the proliferations of lactic acid and other fermentative bacteria especially over the first two days. Despite a limited production and accumulation under normal circumstances, lactic acid is an important electrons sink in the colonic ecosystem. Indeed, it is used to regenerate cofactors that are rapidly depleted during growth in fermentative bacteria (31). While D and L-stereoisomers can be both generated by colonic micro-organisms, L-stereoisomer remains the major metabolite. These findings are consistent with the results

found with *ex vivo* lactose fermentation in human stools (8) and *in vivo* FOS fermentation in rats (42).

The third aspect of the colonic modulation concerns the environmental parameters such as pH and osmolarity. Indeed, caecal and colonic pH were stable and around 6 all along the L25 diet. Such values are lower than those found in literature where caecal pH varies between 6.4 and 7.2 and colonic pH varies between 6.8 and 7.6, depending on the fed or fasted status of the rats (43).

Such microbiota modulations lead to an adaptation of the host's physiology, supported by the microbiota-host interactions. The SCFA concentrations in the portal blood increased at day 1 and then stabilized. This suggests a rapid but limited adaptation of the host whose SCFA specific transporters, such as MCT1 and sMCT1, may be rapidly saturated (Alexandre et al, 2012, British Journal of Nutrition, In Press). The consequences are an accumulation of SCFA, an acidification of the contents and an increased osmolarity, mainly in the proximal and distal colonic contents of the L25 group. Furthermore, physiological and histological modifications are noticed in the L25 group over the diet: the first days of L25 diet are associated to a significant rise of the MPO activity, a thinner mucosa, a dilated lumen and an increased number of goblet cells. These characteristics may indicate a moderate inflammatory state. Indeed, inflammatory bowel condition has been characterized by a significant increase in MPO activity in the colonic mucosa (44), mucosal erosion has been underlined during a DSS induced colic inflammation (45) and stimulated mucus secretion, induced by growth of goblet cells, has showed physical protection during a colonic mucosa inflammation (46). Similar consequences indicating mucosal irritations have been previously shown with a prolonged FOS ingestion in rats (42, 47) and, with more moderate effects, in humans (48). They were also associated to a higher colonisation and translocation of salmonella (49, 50). However, the return of these parameters to their initial values after 6 days suggests an adaptation of the host and probably a reduction of his symptoms. The reduction of the inflammation may be also justified by the microbiota modulation since it has been demonstrated that probiotic bacteria interacted with the host epithelium and could resolve colonic inflammation (44) and/or by the high butyrate concentrations all along the colonic segments. Indeed, anti-inflammatory properties of butyrate have been underlined in inflammatory bowel disease, mainly through NF-kappa-B inhibition and anti-oxydation modulation (51-53). At last, the food intake pattern (supplemental data S7) reveals a rupture in the L25 diet ingestion from

day 2 to day 5 probably corresponding to the period with intense symptoms of intolerance, followed by a compensation period from day 5 where the food intakes re-increase and overtake the day-1 values. This last period is also an indicator of the host's adaptation that gets habituated to the diet with alleviated symptoms.

To conclude, this study monitors the modulations of both the malabsorber host and its colonic microbiota, and highlights the microbiota-host interactions. A prolonged ingestion of lactose modifies the composition and metabolic activity of the colonic microbiota, with a segment-specific pattern. Overall, fermentative and hydrogen-recycling capacities are increased all along the intestines, but especially in caecum and proximal colon for fermentations, and in distal colon for hydrogen-recycling. Few genus or groups are stabilised at day 6 (*Clostridium leptum* group in caecum and proximal colon, *Lactobacillus* group in proximal colon and *Bacteroides* group in distal colon). Further longer studies would help to describe the new microbiota balance, keeping in mind that rat and human microbiota are different. These results pave the way to new nutritional strategies for the treatment of lactose intolerance. Over all, small but regular amounts of lactose seem to modulate the host's physiology and tolerance. The benefits of classic probiotics such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* group are shown but other supplementations could also be suggested. Indeed, the beneficial effects of supplementation in specific *Bacteroides* strains or in hydrogenotrophic bacteria such as acetogens could be evaluated. Supplementation in prebiotics, specifically enhancing the growth of these genus or groups, could be another strategy for the alleviation of lactose intolerance symptoms.

## References

1. Ladas S, Papanikos J, Arapakis G. Lactose malabsorption in Greek adults: correlation of small bowel transit time with the severity of lactose intolerance. *Gut*. 1982 Nov;23:968-73.
2. Szilagyi A, Shrier I, Heilpern D, Je J, Park S, Chong G, Lalonde C, Cote LF, Lee B. Differential impact of lactose/lactase phenotype on colonic microflora. *Can J Gastroenterol*. Jun;24:373-9.
3. Labayen I, Forga L, Gonzalez A, Lenoir-Wijnkoop I, Nutr R, Martinez JA. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2001 Apr;15:543-9.
4. Vonk RJ, Priebe MG, Koetse HA, Stellaard F, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM, Zhong Y, Huang CY. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *Eur J Clin Invest*. 2003 Jan;33:70-5.
5. He T, Priebe MG, Welling GW, Vonk RJ. Effect of lactose on oro-cecal transit in lactose digesters and maldigesters. *Eur J Clin Invest*. 2006 Oct;36:737-42.
6. Squires PE, Rumsey RD, Edwards CA, Read NW. Effect of short-chain fatty acids on contractile activity and fluid flow in rat colon in vitro. *The American journal of physiology*. 1992 May;262:G813-7.
7. Barrow L, Steed KP, Spiller RC, Watts PJ, Melia CD, Davies MC, Wilson CG. Scintigraphic demonstration of lactulose-induced accelerated proximal colon transit. *Gastroenterology*. 1992 Oct;103:1167-73.
8. He T, Priebe MG, Harmsen HJ, Stellaard F, Sun X, Welling GW, Vonk RJ. Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *The Journal of nutrition*. 2006 Jan;136:58-63.
9. Henningsson AM, Bjorck IM, Nyman EM. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. *The Journal of nutrition*. 2002 Oct;132:3098-104.
10. He T, Venema K, Priebe MG, Welling GW, Brummer RJ, Vonk RJ. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *Eur J Clin Invest*. 2008 Aug;38:541-7.
11. Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Strocchi A, Corazza GR. Lactose malabsorption and intolerance in the elderly. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Dec;36:1274-8.

12. Di Stefano M, Miceli E, Mazzocchi S, Tana P, Moroni F, Corazza GR. Visceral hypersensitivity and intolerance symptoms in lactose malabsorption. *Neurogastroenterol Motil.* 2007 Nov;19:887-95.
13. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal.* Feb;5:220-30.
14. Jiang T, Savaiano DA. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Digestive diseases and sciences.* 1997 Nov;42:2370-7.
15. Beards E, Tuohy K, Gibson G. Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food ingredients following in vitro fermentation by human colonic microbiota. *Anaerobe.* Aug;16:420-5.
16. He T, Priebe MG, Vonk RJ, Welling GW. Identification of bacteria with beta-galactosidase activity in faeces from lactase non-persistent subjects. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005 Nov 1;54:463-9.
17. Florent C, Flourie B, Leblond A, Rautureau M, Bernier JJ, Rambaud JC. Influence of chronic lactulose ingestion on the colonic metabolism of lactulose in man (an in vivo study). *J Clin Invest.* 1985 Feb;75:608-13.
18. Hertzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr.* 1996 Aug;64:232-6.
19. Gilat T, Russo S, Gelman-Malachi E, Aldor TA. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. *Gastroenterology.* 1972 Jun;62:1125-7.
20. Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *The Journal of nutrition.* 1993 Nov;123:1923-31.
21. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and environmental microbiology.* 2002 Nov;68:5445-51.
22. He JW, Jiang S. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and environmental microbiology.* 2005 May;71:2250-5.

23. Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, Duncan A, Holtrop G, Louis P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *The British journal of nutrition*. 2009 Feb;101:541-50.
24. Ahmed S, Macfarlane GT, Fite A, McBain AJ, Gilbert P, Macfarlane S. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and environmental microbiology*. 2007 Nov;73:7435-42.
25. Xu K, Liu H, Du G, Chen J. Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe*. 2009 Oct;15:204-13.
26. Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and environmental microbiology*. 1994 Apr;60:1232-40.
27. Stewart JA, Chadwick VS, Murray A. Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Letters in applied microbiology*. 2006 Jul;43:58-63.
28. Leloup J, Loy A, Knab NJ, Borowski C, Wagner M, Jorgensen BB. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environmental microbiology*. 2007 Jan;9:131-42.
29. Lee C, Kim J, Shin SG, Hwang S. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*. 2006 May 29;123:273-80.
30. Kristensen NB, Pierzynowski SG, Danfaer A. Net portal appearance of volatile fatty acids in sheep intraruminally infused with mixtures of acetate, propionate, isobutyrate, butyrate, and valerate. *J Anim Sci*. 2000 May;78:1372-9.
31. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Dore J. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Feb;12:106-11.
32. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Dore J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Aug;15:1183-9.
33. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *Journal of AOAC International*. Jan-Feb;95:50-60.

34. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, Allison C, Segal I, Vorster HH, Walker AR. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut*. 1990 Jun;31:679-83.
35. Dear KL, Elia M, Hunter JO. Do interventions which reduce colonic bacterial fermentation improve symptoms of irritable bowel syndrome? *Digestive diseases and sciences*. 2005 Apr;50:758-66.
36. Nava GM, Carbonero F, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *The ISME journal*. Jan;6:57-70.
37. Rey FE, Faith JJ, Bain J, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Newgard CB, Gordon JI. Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. *The Journal of biological chemistry*. Jul 16;285:22082-90.
38. Briet F, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Arrigoni E, Rambaud JC. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut*. 1997 Nov;41:632-5.
39. Zhao Y, He W, Liu WF, Liu CC, Feng LK, Sun L, Yan YB, Hang HY. Two distinct states of *Escherichia coli* cells that overexpress recombinant heterogeneous beta-galactosidase. *The Journal of biological chemistry*. Mar 16;287:9259-68.
40. Yi SH, Alli I, Park KH, Lee B. Overexpression and characterization of a novel transgalactosylase and hydrolytic beta-galactosidase from a human isolate *Bifidobacterium breve* B24. *New biotechnology*. Oct;28:806-13.
41. Honda H, Kataoka F, Nagaoka S, Kawai Y, Kitazawa H, Itoh H, Kimura K, Taketomo N, Yamazaki Y, et al. Beta-galactosidase, phospho-beta-galactosidase and phospho-beta-glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Letters in applied microbiology*. 2007 Nov;45:461-6.
42. Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van der Meer R. Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats. *The Journal of nutrition*. 2005 Apr;135:837-42.
43. Ward FW, Coates ME. Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. *Laboratory animals*. 1987 Jul;21:216-22.
44. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. Sep 7;16:4145-51.

45. Hakansson A, Branning C, Molin G, Adawi D, Hagslatt ML, Nyman M, Jeppsson B, Ahrne S. Colorectal Oncogenesis and Inflammation in a Rat Model Based on Chronic Inflammation due to Cycling DSS Treatments. *Gastroenterology research and practice*.2011:924045.
46. Gaudier E, Hoebler C. [Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity]. *Gastroenterologie clinique et biologique*. 2006 Aug-Sep;30:965-74.
47. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *The British journal of nutrition*. 2003 May;89:597-606.
48. Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Katan MB, van der Meer R. Dietary fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in healthy men. *The Journal of nutrition*. 2006 Jan;136:70-4.
49. Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van der Meer R. Dietary fructo-oligosaccharides dose-dependently increase translocation of salmonella in rats. *The Journal of nutrition*. 2003 Jul;133:2313-8.
50. Bovee-Oudenhoven IM, ten Bruggencate SJ, Lettink-Wissink ML, van der Meer R. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonisation but stimulate translocation of salmonella in rats. *Gut*. 2003 Nov;52:1572-8.
51. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000 Sep;47:397-403.
52. Russo I, Luciani A, De Cicco P, Troncone E, Ciacci C. Butyrate attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in intestinal cells and Crohn's mucosa through modulation of antioxidant defense machinery. *PloS one*.7:e32841.
53. Huda-Faujan N, Abdulamir AS, Fatimah AB, Anas OM, Shuhaimi M, Yazid AM, Loong YY. The impact of the level of the intestinal short chain Fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *The open biochemistry journal*.4:53-8.

### **Acknowledgements**

We gratefully acknowledge Corine Delteil and Catherine Chaumontet for their technical assistance all along this experiment. We also acknowledge Nicolas Darcel for his help in analyzing the histological pictures and Pierre Barbillon for his help with statistics. We also thank Vivatech for the financial support.

### **Statements of author's contributions to manuscript**

We, Virginie Alexandre and Anne-Marie Davila, want to express our thanks to Yolanda Sanz for her collaboration for the microbiological analyses, to Antoine Martin and Annaïg Lan for their expert technical assistance and to Yolanda Sanz, François Blachier, Robert Benamouzig and Daniel Tomé for their precious help in the redaction of this article.

**SUPPLEMENTAL DATA**

| (A)                       | <b>Time effect</b> | <b>Diet effect</b> | <b>Time*Diet effect</b> |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i>    | p = 0.04           | p < 0.001          |                         |
| <b>Enterobacteriaceae</b> |                    | p = 0.02           |                         |
| <i>Bacteroides</i> group  |                    | p < 0.001          |                         |

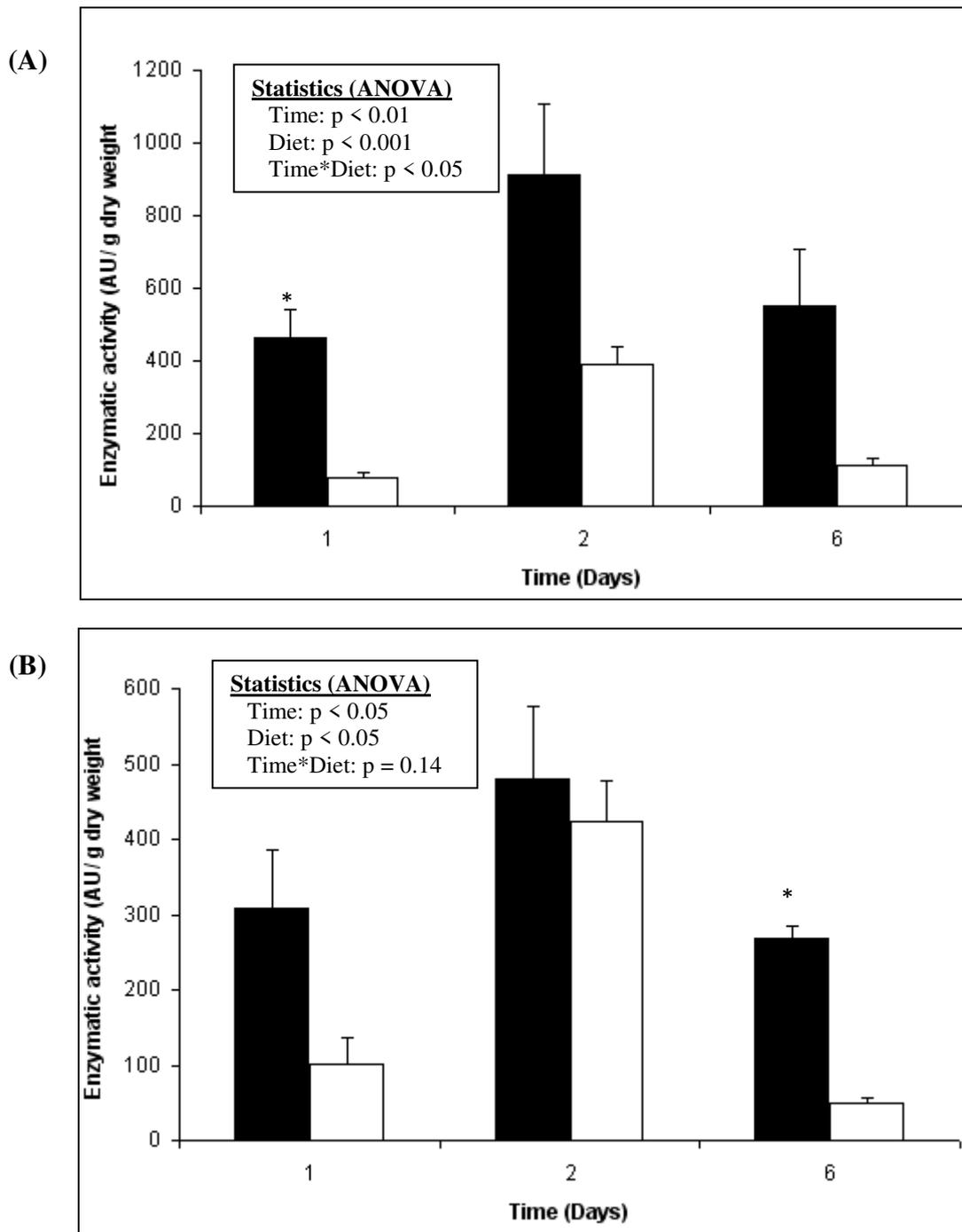
  

| (B)                        | <b>Time effect</b> | <b>Diet effect</b> | <b>Time*Diet effect</b> |
|----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i>     |                    | p = 0.02           |                         |
| <i>Lactobacillus</i> group |                    | p < 0.001          |                         |
| <i>Enterococcus</i>        |                    | p = 0.02           |                         |
| <b>Enterobacteriaceae</b>  |                    | p < 0.001          |                         |
| <i>Bacteroides</i>         |                    | p < 0.001          |                         |
| <b>Methanoarchaea</b>      | p = 0.05           | p < 0.001          |                         |

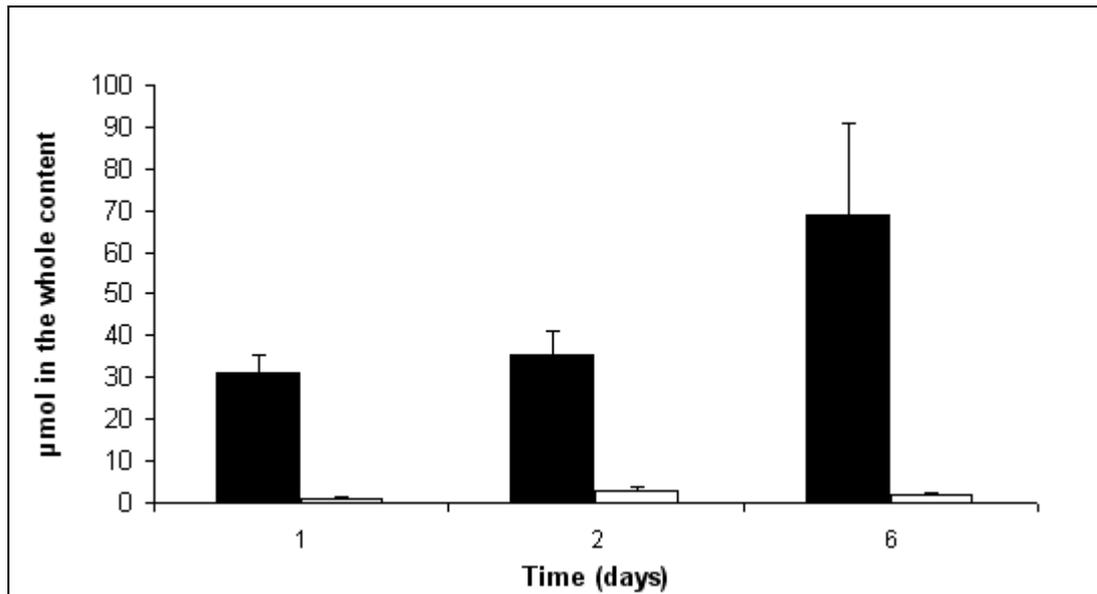
  

| (C)                        | <b>Time effect</b> | <b>Diet effect</b> | <b>Time*Diet effect</b> |
|----------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|
| <i>Bifidobacterium</i>     |                    | p < 0.001          |                         |
| <i>Lactobacillus</i> group |                    | p < 0.001          |                         |
| <i>Enterococcus</i>        |                    | p < 0.001          | p = 0.04                |
| <b>Enterobacteriaceae</b>  | p = 0.01           | p < 0.001          | p = 0.04                |
| <i>Bacteroides</i> group   |                    | p < 0.001          |                         |
| <b>Methanoarchaea</b>      | p = 0.004          | p < 0.001          |                         |

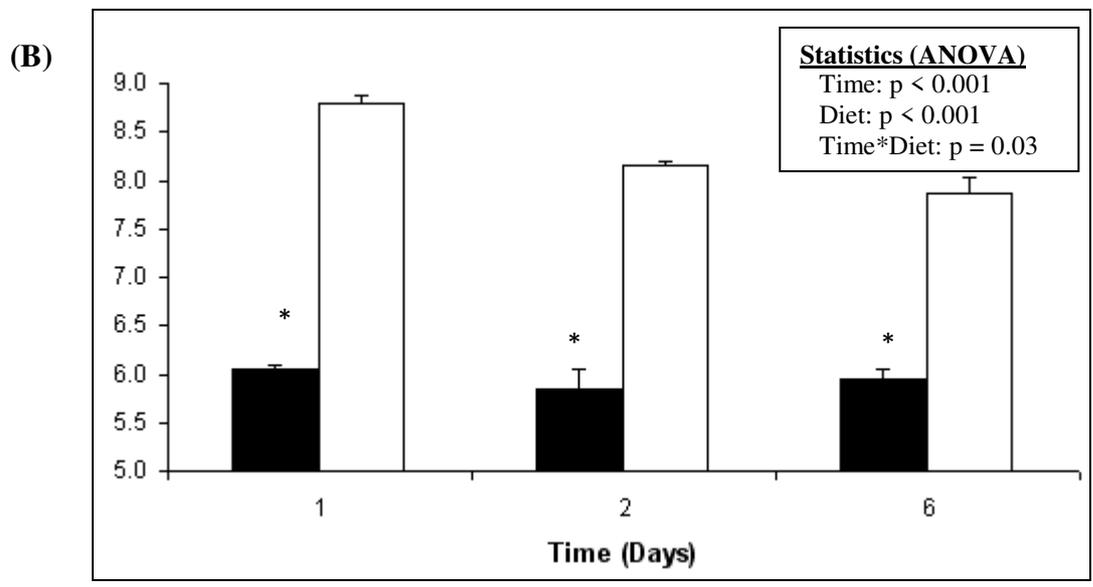
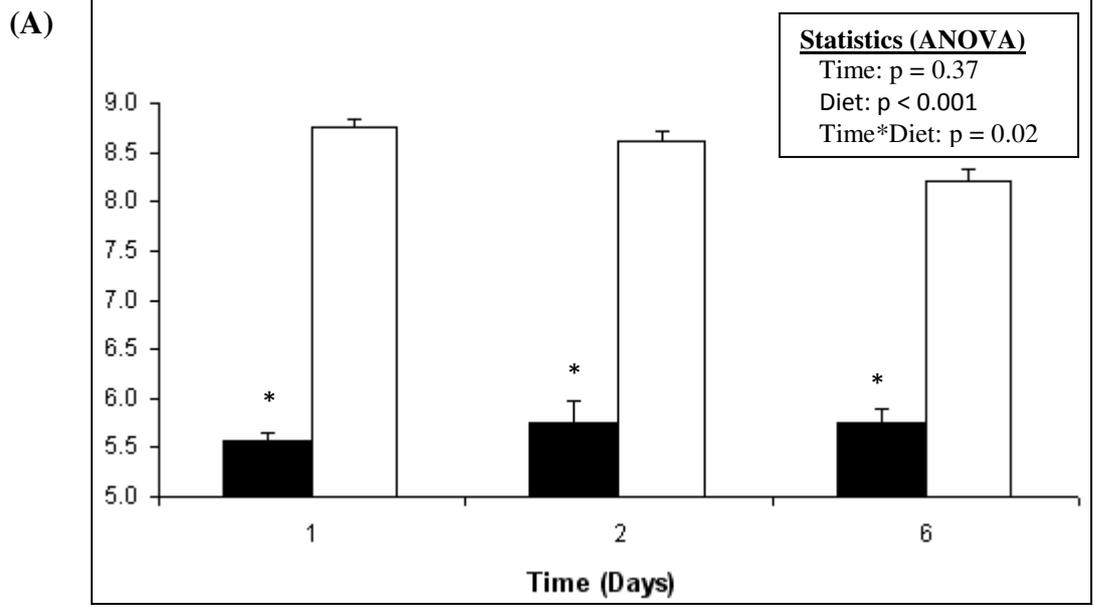
**S1: Effects of time, diet and time\*diet variables on intestinal microbiota after L25 and S25 pair-fed diets in caecum (A), proximal (B) and distal (C) colon.**  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i(\text{diet})=1,2$ ,  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  and  $k(\text{rat})= 1,\dots,6$ . Time, diet and time\*diet effects are evaluated by an ANOVA. A p-value over 0.05 was considered as not significant.



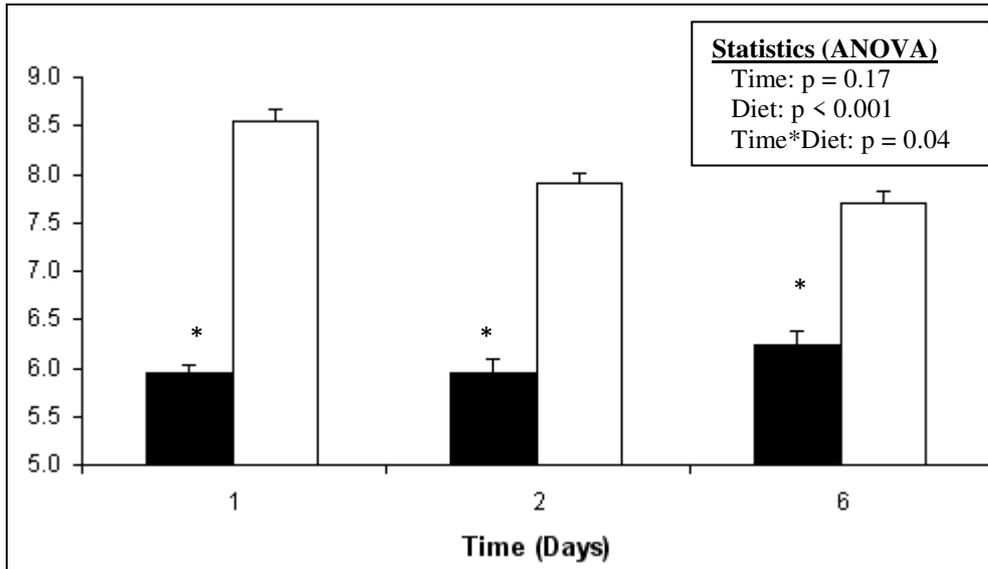
**S2: Beta-galactosidase activity in caecum (A) and proximal colon (B) over 6 days of L25 and S25 pair-fed diets.** (■) L25: diet containing 25% of lactose; (□) S25: pair-fed diet containing 25% of sucrose. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Time, diet and time\*diet effects are evaluated by an ANOVA. Comparisons at specific time are evaluated by a Student's test for unpaired data. A p-value over 0.05 was considered as not significant (for ANOVA). (\*) (for Student's test):  $p < 0.05$ .  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i$ (diet)=1,2,  $j$ (time point from diet ingestion)=1,2,3 and  $k$ (rat)= 1,...,6.



**S3: Lactate caecal concentrations over 6 days of L25 and S25 *pair-fed* diets.** (■) L25: diet containing 25% of lactose; (□) S25: *pair-fed* diet containing 25% of sucrose. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Time, diet and time\*diet effects are evaluated by an ANOVA. Comparisons at specific time are evaluated by a Student's test for unpaired. A p-value over 0.05 was considered as not significant (for ANOVA). (\*) (for Student's test):  $p < 0.05$ .  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i(\text{diet})=1,2$ ,  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  and  $k(\text{rat})= 1, \dots, 6$ .

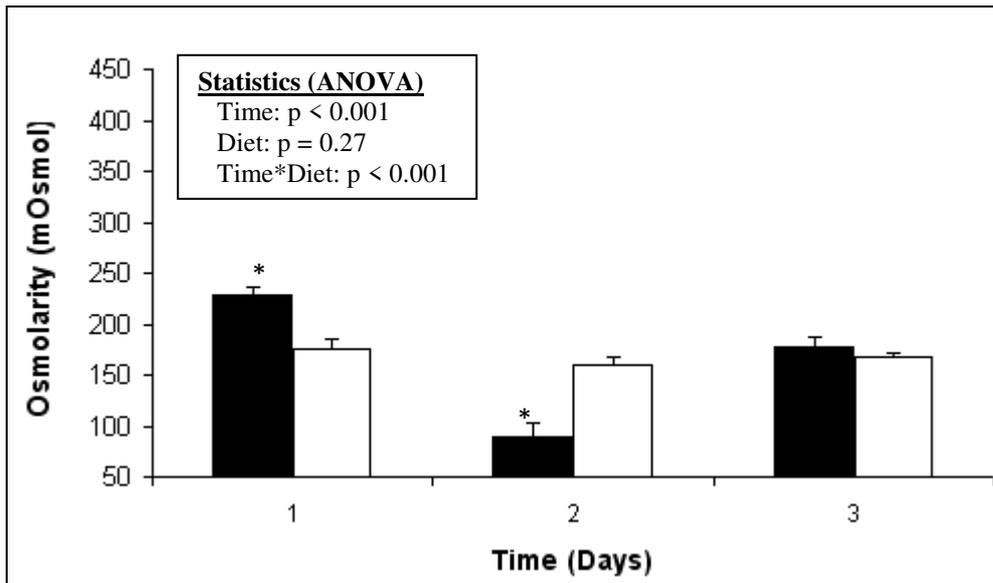


(C)

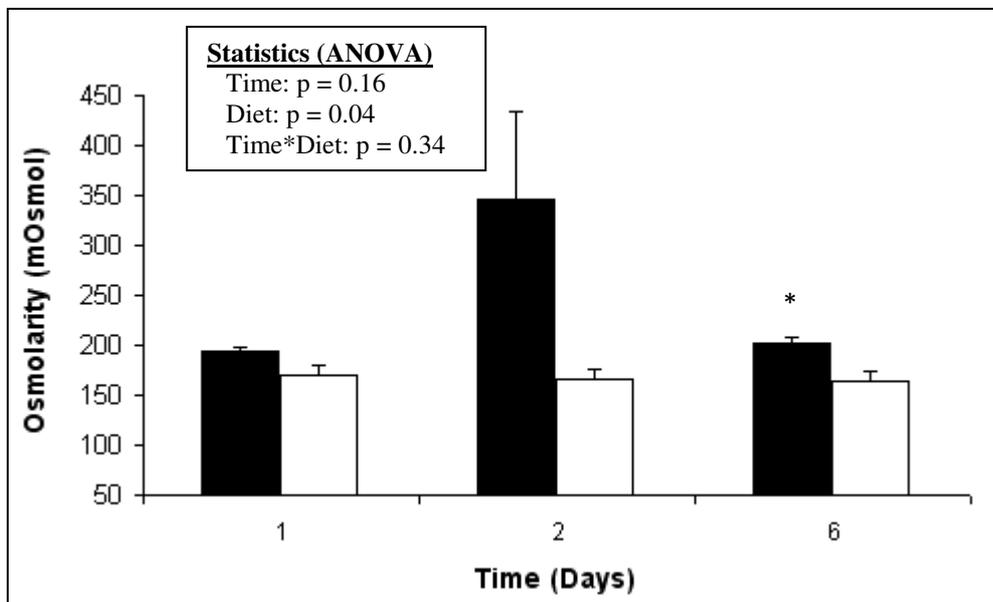


**S4: pH in caecum (A), proximal (B) and distal (C) colon over 6 days of L25 and S25 pair-fed diets.** (■) L25: diet containing 25% of lactose; (□) S25: pair-fed diet containing 25% of sucrose. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Time, diet and time\*diet effects are evaluated by an ANOVA. Comparisons at specific time are evaluated by a Student's test for unpaired data. A p-value over 0.05 was considered as not significant (for ANOVA). (\*) (for Student's test): p < 0.05.  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i(\text{diet})=1,2$ ,  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  and  $k(\text{rat})=1, \dots, 6$ .

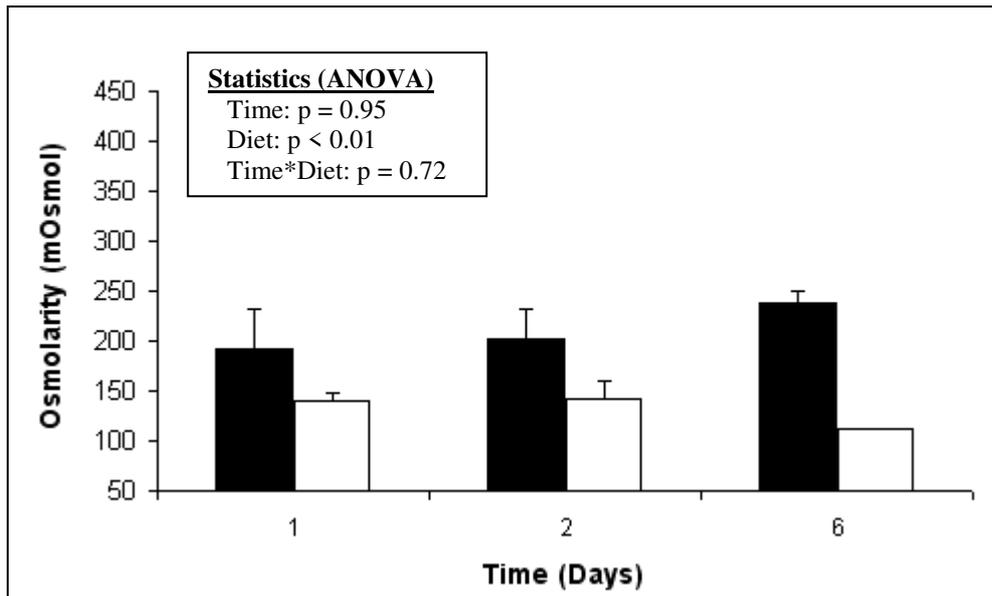
(A)



(B)



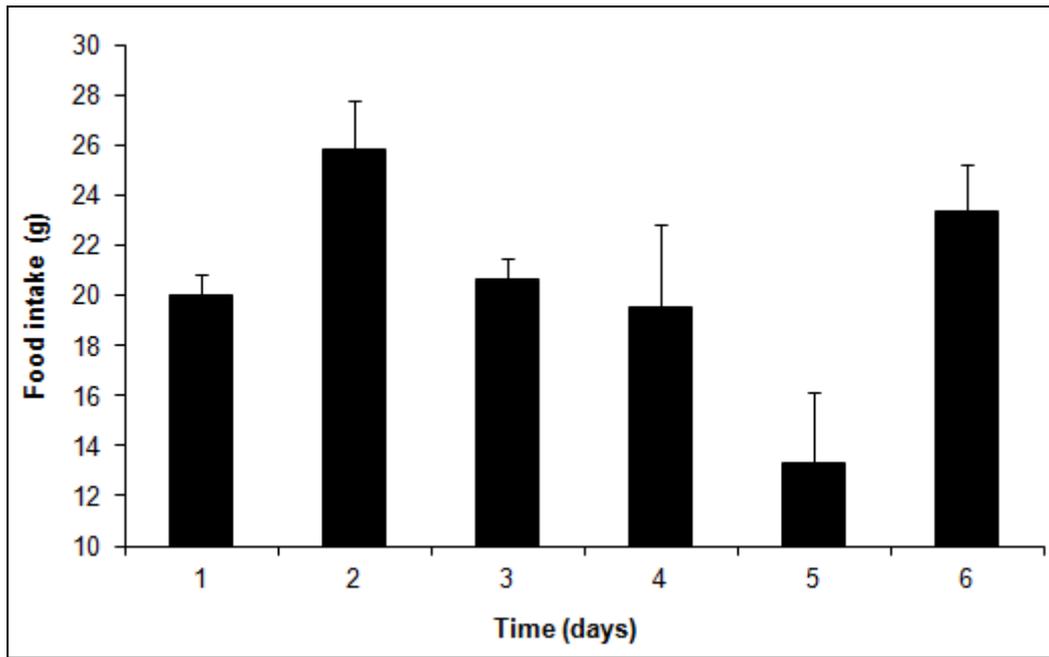
(C)



**S5: Osmolarity in caecum (A), proximal (B) and distal (C) colon over 6 days of L25 and S25 pair-fed diets.** (■) L25: diet containing 25% of lactose; (□) S25: pair-fed diet containing 25% of sucrose. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Time, diet and time\*diet effects are evaluated by an ANOVA. Comparisons at specific time are evaluated by a Student's test for unpaired data. A p-value over 0.05 was considered as not significant (for ANOVA). (\*) (for Student's test):  $p < 0.05$ .  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i(\text{diet})=1,2$ ,  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  and  $k(\text{rat})= 1, \dots, 6$ .

|                                      | S25         |             |             | L25          |              |              |
|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|                                      | Day 1       | Day 2       | Day 6       | Day 1        | Day 2        | Day 6        |
| Ratio [mucosa/<br>section]           | 0.75 ± 0.02 | 0.71 ± 0.02 | 0.72 ± 0.02 | 0.68 ± 0.01* | 0.61 ± 0.04* | 0.67 ± 0.02* |
| Ratio [goblet cells/<br>colonocytes] | 0.70 ± 0.14 | 0.52 ± 0.07 | 0.70 ± 0.18 | 0.93 ± 0.09  | 1.03 ± 0.25* | 0.87 ± 0.11  |

**S6: Histological parameters after 1, 2 and 6 days of L25 and S25 pair-fed diets.** Data are expressed as means ± SEM. L25: diet containing 25% of lactose; S25: pair-fed diet containing 25% of sucrose. Data are compared (L25 versus S25) by a Student's test for unpaired data (at day 1, day 2, day 6). (\*):  $p < 0.05$ .  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i(\text{diet})=1,2$ ,  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  and  $k(\text{rat})=1,\dots,6$ .



**S7: Food intakes pattern in L25 group.** Data are presented as means  $\pm$  SEM.  $n_{i,j,k} = 36$  where  $i(\text{diet})=1,2$ ,  $j(\text{time point from diet ingestion})=1,2,3$  and  $k(\text{rat})= 1, \dots, 6$ .

## IV. Publication 4: L'intolérance au lactose en 2011 (article de revue)

# L'intolérance au lactose en 2011

### Lactose intolerance in 2011

Virginie Alexandre<sup>(1)(2)(3)</sup>, Anne-Marie Davila<sup>(1)</sup>, Michel Bouchoucha<sup>(4)</sup>, Guillaume Cadiot<sup>(5)</sup>, Robert Benamouzig<sup>(4)</sup>

<sup>1</sup> UMR 914 AgroParisTech, Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> Vivatech, 8 rue Christophe Colomb, 75008 Paris, France

<sup>3</sup> Fondation Urgo, 21304 Chenove, France

<sup>4</sup> Hôpital Avicenne, service d'hépatogastroentérologie, 93000 Bobigny, France

<sup>5</sup> Hôpital Robert Debré, service d'hépatogastroentérologie, 51092 Reims, France

e-mail : <alexandre@agroparistech.fr>

#### Résumé

L'intolérance au lactose est l'expression d'une malabsorption intestinale, causée par une hypolactasie. Cette déficience en lactase peut être d'origine primaire congénitale lorsqu'elle résulte d'une mutation du gène codant pour la lactase et apparaît dès la naissance, ou d'origine primaire acquise lorsqu'elle se développe avec l'âge. Dans les deux cas, la perte d'activité lactasique est irréversible. La déficience en lactase peut également être d'origine secondaire, notamment dans le cadre d'une atteinte épithéliale intestinale ; elle est dans ce cas réversible. Les symptômes associés à l'intolérance sont non spécifiques et semblables à ceux du syndrome de l'intestin irritable. Actuellement, plusieurs méthodes diagnostiques caractérisant de façon spécifique l'hypolactasie, la malabsorption ou l'intolérance sont disponibles. Cependant, leur fiabilité est relative et ces méthodes sont encore peu accessibles. Une évaluation conjointe de la malabsorption et de l'intolérance devrait être systématiquement réalisée, afin d'optimiser la fiabilité du diagnostic. En cas d'hypolactasie avec malabsorption et intolérance, des solutions thérapeutiques existent. Elles font notamment appel au régime d'exclusion, à la consommation de denrées alimentaires dé lactosées et à une enzymothérapie substitutive.

■ Mots clés : intolérance au lactose, malabsorption

#### Abstract

Lactose intolerance results from intestinal malabsorption, due to hypolactasia. Such a deficiency may have a congenital primary origin when resulting from a mutation of the lactase coding gene and appearing at birth, or an acquired primary origin when developing over time. In both cases, hypolactasia is non-reversible. Lactase deficiency may also have a secondary origin when resulting from an intestinal epithelial disease. In such cases, hypolactasia is reversible. The symptoms associated to intolerance are not specific but similar to those of the irritable bowel syndrome. Nowadays, various diagnostic techniques are available but of limited reliability and lacking of accessibility. A combined evaluation of malabsorption and intolerance must be systematically performed in order to optimise the diagnostic reliability. In case of hypolactasia with malabsorption and intolerance, therapeutic solutions exist. They are based on an exclusion diet, the use of lactose-free foods and substitutive enzymotherapy.

■ Key words: lactose intolerance, malabsorption

**B**ien que largement documentée aujourd'hui, l'intolérance au lactose reste encore peu reconnue par les professionnels de santé. L'hétérogénéité et le manque de

standardisation des termes employés limitent son diagnostic et sa prise en charge thérapeutique.

Les objectifs de cet article sont de bien préciser les éléments nosologiques et

et *Oncologie digestive*

Tirés à part : V. Alexandre

de décrire les méthodes diagnostiques et les traitements disponibles.

## Hétérogénéité de la terminologie

Malgré une volonté d'harmonisation, un flou important persiste dans la terminologie et les termes d'hypolactasie, de malabsorption et d'intolérance au lactose sont souvent confondus.

L'hypolactasie correspond à une dérégulation de la synthèse et/ou de l'activité enzymatique de la lactase, glycoprotéine présente à la surface des villosités jéjunales. Cette déficience en lactase peut être d'origine primaire congénitale lorsqu'elle résulte d'une mutation du gène codant pour la lactase et apparaît alors dès la naissance [1], ou d'origine primaire acquise lorsqu'elle se développe avec l'âge [2]. Les symptômes provoqués sont d'intensité sévère dans le cas d'une déficience congénitale et d'intensité légère à modérée dans le cas d'une déficience acquise. La perte d'activité lactasique est irréversible dans les deux cas. La déficience en lactase peut également être d'origine secondaire, notamment dans le cadre d'une atteinte épithéliale intestinale ; elle est dans ce cas réversible. D'intensité modérée à sévère, cette déficience reste temporaire car dès que l'épithélium guérit, l'activité lactasique reprend sa valeur initiale [3]. La malabsorption, ou maldigestion, correspond à la mauvaise dégradation jéjunale du lactose qui arrive alors intact au niveau du côlon où il est fermenté. L'intolérance correspond à l'expression des symptômes à l'échelle de l'individu [4].

Ces trois termes ne sont donc pas équivalents, mais inclusifs. Ainsi, un intolérant au lactose sera nécessairement hypolactasique et malabsorbeur, alors qu'un individu hypolactasique ne présentera pas nécessairement de malabsorption ou d'intolérance.

“ L'intolérance, correspondant à l'expression des symptômes, est créée par la malabsorption intestinale du lactose, qui est secondaire à une hypolactasie ”

## Une exposition au lactose croissante

L'intolérance au lactose est décrite depuis l'Antiquité. À partir des années 1960, l'exposition au lactose a nettement augmenté du fait de son adjonction croissante dans les préparations alimentaires. Les avancées technologiques d'après-guerre ont en effet mis en évidence les nombreuses propriétés fonctionnelles du lactose comme

son effet sur la fixation des arômes, la cristallisation, la gélification, l'émulsion et la coloration des produits [5]. Ainsi, on trouve aujourd'hui fréquemment du lactose dans les produits laitiers (lait, yaourts, crème fraîche, glace), mais aussi dans les produits manufacturés (charcuteries, viennoiseries/pâtisseries industrielles, pâtes à gâteau/pizza/tarte/crêpe, céréales pour petit-déjeuner, soupes instantanées, sauces...) ainsi que dans l'enrobage de certains médicaments et pilules contraceptives (tableau 1).

## Prévalence de l'hypolactasie

Chez l'adulte sain, la perte d'expression de l'activité lactasique n'est pas une maladie, mais plutôt une évolution normale. En effet, tout mammifère, une fois sevré, perd graduellement sa faculté à digérer le lactose. On estime que l'hypolactasie touche environ 75 % de la population mondiale adulte, avec de grandes disparités selon l'origine ethnique des individus. Elle est observée chez 20 % des Européens du Nord, 40 % des Européens méditerranéens, 70 % des Africains et 90 % des Asiatiques [2]. En France, on estime entre 10 et 30 % la proportion d'hypolactasiques. En cas de symptomatologie digestive liée à une autre maladie, la prévalence rapportée est assez variable, mais reste proche des 10 à 30 % observés dans la population générale [6]. L'intolérance au lactose a été rapportée comme plus fréquente chez les patients ayant une maladie inflammatoire chronique intestinale (40 %) [7]. Elle pourrait en revanche être moins fréquente chez ceux présentant une maladie coeliaque (10 %) [7]. Chez les patients ayant une pullulation microbienne, la prévalence de l'hypolactasie est similaire à celle de la population générale, mais le ressenti des symptômes est nettement supérieur [7].

“ Du fait de la forte exposition au lactose, l'hypolactasie concerne 75 % de la population mondiale mais sa prévalence reste variable selon les populations ”

## Sémiologie

L'intolérance au lactose est associée à la survenue de symptômes non spécifiques. Ces symptômes apparaissent trente minutes à deux heures après l'ingestion de lactose et sont notamment gastro-intestinaux. Les douleurs abdominales, distensions intestinales, borborygmes et flatulences sont présents dans 100 % des cas alors que les nausées et vomissements sont présents dans 78 % des cas (tableau 2). L'intensité de ces symptômes varie selon

**Tableau 1. Classement des principaux aliments selon leur teneur en lactose. Informations extraites le 28 janvier 2011 du National Digestive Diseases Clearinghouse, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.**

| Aliments                             | Teneur en lactose (pour 100 g/100 mL) |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Laits</b>                         |                                       |
| Lait entier en poudre                | 38 g                                  |
| Lait condensé sucré                  | 12 g                                  |
| Lait de brebis                       | 4-5 g                                 |
| Lait de chamelle                     | 4-5 g                                 |
| Lait de chèvre                       | 4-5 g                                 |
| Lait écrémé                          | 4-5 g                                 |
| Lait entier                          | 4-5 g                                 |
| Lait dé lactosé                      | 0,5 g                                 |
| <b>Produits laitiers</b>             |                                       |
| Riz au lait                          | 18 g                                  |
| Crème glacée                         | 7 g                                   |
| Crème dessert                        | 3-6 g                                 |
| Yaourt nature                        | 3 g                                   |
| Crème fraîche, crème fouettée        | 2-4 g                                 |
| Fromage blanc                        | 2-4 g                                 |
| Roquefort                            | 2-4 g                                 |
| Édam                                 | 2 g                                   |
| Parmesan                             | 1-3 g                                 |
| Beurre                               | < 1 g                                 |
| Camembert                            | < 1 g                                 |
| Emmental                             | < 1 g                                 |
| Fromage de brebis                    | < 1 g                                 |
| Margarine                            | < 1 g                                 |
| Mozzarella                           | < 1 g                                 |
| <b>Produits industriels</b>          |                                       |
| Charcuteries                         | 4 g                                   |
| Gaufres, pancakes, biscuits, cookies | 2-4 g                                 |
| Purées et soupes instantanées        | 2-4 g                                 |
| Viennoiseries                        | 2 g                                   |
| Céréales petit-déjeuner              | 1-3 g                                 |

**Tableau 2. Les différents symptômes présentés lors d'une intolérance au lactose. Extrait de Matthews SB, et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate J* 2005 ; 1981 : 167-73.**

| Symptômes gastro-intestinaux | % parmi les patients présentant des symptômes (n = 133) |
|------------------------------|---|
| Douleurs abdominales         | 100   |
| Distension intestinale       | 100   |
| Borborygme                   | 100   |
| Flatulence                   | 100   |
| Nausée                       | 78  |
| Vomissement                  | 78  |
| Diarrhée osmotique           | 70  |
| Constipation                 | 30  |

la quantité ingérée de lactose [8]. Certains auteurs y associent des intolérances légères, modérées et sévères. À charge identique, le lactose sous forme solide induit moins de symptômes que le lactose sous forme liquide. Une explication avancée est le temps de vidange gastrique plus long pour un aliment solide, ce qui échelonne l'arrivée du lactose dans le côlon [9]. De façon similaire, l'augmentation de la teneur énergétique du repas qui accompagne l'ingestion de lactose peut réduire la sévérité des symptômes.

## Métabolisme du lactose

Chez un sujet absorbeur, le lactose est hydrolysé au niveau du jéjunum en glucose et galactose, ensuite absorbés au niveau de l'iléon. Le galactose peut participer à la synthèse de glycoprotéines et de glycolipides, être isomérisé en glucose au niveau du foie, ou être excrété dans les urines. Le glucose subit les réactions métaboliques d'utilisation directe par les muscles, le cerveau et les autres tissus, de stockage dans le foie sous forme de glycogène et de triglycérides et d'accumulation dans le tissu adipeux. Chez un sujet malabsorbeur, le lactose parvient intact jusqu'au côlon proximal où il se comporte alors comme une fibre fermentescible. La fermentation colique, réalisée par la flore anaérobie hydrolytique et glycolytique, produit des sucres réducteurs (lactitol et galactitol), des métabolites intermédiaires et des produits terminaux de dégradation (acides gras à courtes chaînes, gaz) [10]. Les métabolites

intermédiaires et terminaux, restant dans les contenus coliques, provoquent une augmentation de charge osmotique, un afflux d'eau et une distension intestinale [11].

Une adaptation colique est possible chez certains individus. Selon un phénomène similaire à celui observé avec le lactulose, la consommation régulière de lactose pourrait moduler la flore colique et orienter son métabolisme vers le « recyclage » des sucres réducteurs, des acides organiques et des acides gras à chaînes courtes [10]. Ainsi, l'équilibre dynamique entre les taux de production, de dégradation et de réabsorption des composés osmotiquement actifs permettrait de réduire les symptômes [12]. Par ailleurs, certains auteurs ont mis en évidence une modification qualitative et quantitative de la flore colique lors d'une ingestion prolongée de lactose [13, 14]. Les bénéfices symptomatologiques de cette modulation restent cependant discutés.

“ La fermentation colique du lactose est à l'origine de l'intolérance ”

## Outils diagnostiques : avantages et limites

### Tests caractérisant l'hypolactasie

Le dosage des activités lactase, sucrase et maltase sur biopsie intestinale a longtemps été considéré comme la technique de référence. L'hypolactasie est suggérée pour un ratio lactase/sucrase inférieur à 0,3 et une activité lactase inférieure à 10 UI/g de protéines [15]. Cependant, ce dosage ne permet pas un diagnostic « absolu » car le site de prélèvement est souvent proximal, alors qu'il peut exister une activité lactase en partie distale permettant une absorption normale du lactose. Un nouveau test, basé sur une réaction colorimétrique appréciant l'activité lactasique, a été développé en 2007. Plus rapide – 20 minutes sont nécessaires pour le dosage –, il semble présenter une bonne fiabilité avec une sensibilité de 95 % et une spécificité de 100 % [16].

Un test génétique permet d'identifier certaines mutations connues dans le gène codant la lactase, à l'aide d'une étude par PCR. Il se pratique sur de l'ADN constitutionnel, par exemple obtenu à partir d'un frottis buccal. Les polymorphismes C/T-13910 et T/T-13910 sont étroitement associés au phénotype tolérant ; le génotype C/C-13910 est associé au phénotype intolérant. Les sensibilités et spécificités rapportées pour ce test s'étendent respectivement de 93 à 100 % et de 95 à 100 % chez l'adulte [17]. Cependant, le rôle du polymorphisme dans la

réduction de la transcription du gène reste encore discuté.

### Tests caractérisant la malabsorption

L'analyse du pH des selles par un papier indicateur et la recherche de sucres par une technique chromatographique ont été utilisées. Une malabsorption est suggérée quand le pH est inférieur à 6, la quantité des sucres réducteurs est supérieure à 0,5 % et que du lactose apparaît sur le chromatogramme [18]. La sensibilité de ce test est faible, de même que sa spécificité, car la mesure du pH peut manquer de fiabilité et la quantité de sucres réducteurs peut être biaisée par la motilité intestinale et la réabsorption d'eau.

Le dosage de galactose dans les urines a également été proposé. Pour les mêmes raisons que le test sanguin, éthanol et lactose sont ingérés conjointement. Le test urinaire se fait 40 minutes après ingestion et une quantité de galactose inférieure à 2,0 mmol/L témoignerait de la malabsorption du lactose. Les sensibilités et spécificités rapportées pour cette méthode varient de 77 à 96 % et de 88 à 100 % [19].

L'étude dynamique de la glycémie, toutes les 15 minutes pendant 1 heure après l'ingestion de 25 à 50 g de lactose, peut aussi mettre en évidence la malabsorption de ce sucre. Une hausse de la glycémie supérieure à 1,7 mmol/L reflète une absorption normale du lactose, alors qu'une hausse inférieure à 1,1 mmol/L suggère l'existence de sa malabsorption. La zone comprise entre 1,1 et 1,7 mmol/L est délicate à interpréter. Les sensibilités et spécificités rapportées s'étendent toutes deux de 70 à 95 % [20]. Afin d'optimiser ces paramètres, l'étude conjointe de la glycémie et de la galactosémie a été proposée. L'éthanol, ajouté aux doses de 150 mg/kg, est ingéré en même temps que le lactose et permet d'inhiber la conversion hépatique du galactose. Cette combinaison semble assurer une amélioration de la sensibilité et de la spécificité qui sont alors respectivement de 97 % et 93 % [21].

Le test respiratoire à l'hydrogène est, depuis les années 1975, une des techniques les plus utilisées. Ce test repose sur la quantification d'hydrogène contenu dans l'air expiré. Si cette quantité est supérieure ou égale à 20 ppm sur les trois heures suivant l'ingestion de 25 à 50 g de lactose, la malabsorption est diagnostiquée. Les sensibilités et spécificités rapportées pour ce test varient respectivement de 80 à 100 % et de 70 à 100 % [22]. La fiabilité de ce test reste critiquée. Les faux positifs sont notamment causés par la pullulation microbienne, présente chez 5 % de la population. Les faux négatifs sont notamment causés par la méthano-excrétion survenant chez 30 à 50 % de la population générale dont la flore intestinale transforme l'hydrogène en méthane. Depuis 2008, il est ainsi suggéré de coupler le dosage de l'hydrogène à celui du méthane [23].

“ Le test respiratoire à l'hydrogène repose sur la quantification d'hydrogène contenu dans l'air expiré. Si cette quantité est supérieure ou égale à 20 ppm sur les trois heures suivant l'ingestion de 25 à 50 g de lactose, la malabsorption est diagnostiquée ”

## Caractérisation de l'intolérance

L'évaluation des symptômes, déclenchés après l'ingestion de 25 g de lactose, peut aussi être utilisée par un questionnaire validé en 2009 [24]. Ce questionnaire permet de construire un score obtenu à partir de cinq items (diarrhées, nausées, borborygmes, douleurs, flatulences) notés chacun de 1 à 10. Un score moyen supérieur ou égal à 7,5 sur 10 témoignerait d'une intolérance au lactose. La sensibilité et spécificité de ce test sont respectivement de 75 % et 67 %. Ces faibles valeurs s'expliquent par l'existence de symptômes non spécifiques, aussi observés lors d'un syndrome de l'intestin irritable, et par une surestimation des symptômes chez 30 % des sujets [25].

“ Une évaluation conjointe de la malabsorption et de l'intolérance devrait être systématiquement réalisée afin d'optimiser la fiabilité du diagnostic ”

## Thérapeutique

La principale solution proposée en routine est l'exclusion des produits contenant du lactose et leur substitution par des denrées alimentaires naturellement pauvres en lactose (par exemple : laits de chamelle, laits végétaux) ou traités pour le devenir. Depuis les années 1990, l'hydrolyse préalable du lactose est fréquemment utilisée. De nombreux produits « sans lactose » ou « à teneur réduite en lactose » sont apparus sur le marché comme les produits laitiers dé lactosés par procédé chimique (ajout de lactase de micro-organismes) ou mécanique (ultrafiltration). Récemment, le régime d'exclusion a été généralisé à tous les polysaccharides fermentescibles, appelés FODMAP (*Fermentable Oligo, Di, and Mono-saccharides, And Polyols*). Les études ont révélé des bénéfices symptomatiques chez 75 % des patients présentant un syndrome de l'intestin irritable [26]. Ce régime est cependant très difficile à suivre, notamment en raison des sources cachées de lactose. Par ailleurs, il

conduit à éliminer les produits laitiers et peut provoquer, sur le long terme, des carences importantes en vitamines (B2, D) et minéraux (Ca, P).

L'usage des compléments alimentaires enrichis en activité lactasique est aussi proposé. Cette enzymothérapie substitutive est très plébiscitée dans les pays anglo-saxons, mais reste encore peu utilisée en France. Des études cliniques ont mis en évidence les bénéfices symptomatiques de cette enzymothérapie substitutive en lactase extraite de champignons comme *Aspergillus oryzae* [27] ou de levures comme *Kluyveromyces lactis* [28]. Les principaux résultats sont des réductions hautement significatives ( $p < 0,01$ ) de l'hydrogène expiré et des symptômes gastro-intestinaux sur les heures suivant l'ingestion conjointe de lactose et de lactase. Ainsi, une supplémentation en lactase facilite la consommation de produits laitiers, essentiels notamment pendant les périodes de croissance et de périménopause.

D'autres stratégies améliorant la digestion du lactose sont en cours de développement via une supplémentation en prébiotiques et/ou probiotiques.

“ Les solutions thérapeutiques font appel au régime d'exclusion, à la consommation de denrées alimentaires dé lactosées et à une supplémentation en lactase exogène au moment de la consommation de produits contenant du lactose ”

## Conclusions et perspectives

Bien qu'étudiée depuis plus de cinquante ans et largement vulgarisée, l'intolérance au lactose est encore associée à une prise en charge non codifiée. Malgré la diversité des tests existants, leur fiabilité relative et leur manque d'accessibilité limitent les possibilités d'un diagnostic fiable. La combinaison de deux tests simples, comme l'étude de la glycémie et le test respiratoire à l'hydrogène après charge en lactose, devrait être systématiquement proposée aux patients présentant une symptomatologie évocatrice. Ceci est d'autant plus important que l'intolérance est une condition chronique et que des solutions thérapeutiques existent pour cette condition. ■

**Remerciements :** Nous remercions le Dr Claire Bertin, de la société Vivatech, qui coencadre la thèse de sciences de Virginie Alexandre, ainsi que Priscille Rosnet, pour la Fondation Urgo, qui a contribué à l'élaboration de ce travail. Nous remercions également le Pr Guillaume Cadiot et le Pr Robert Benamouzig pour leur concours scientifique. Virginie Alexandre bénéficie d'une bourse Cifre pour la réalisation de sa thèse de sciences et du soutien de Vivatech.

### Take home messages

- L'hypolactasie touche environ 20 % de la population française.
- En cas de symptômes évocateurs, des possibilités diagnostiques existent et une combinaison de tests simples doit être systématiquement proposée.
- Les solutions thérapeutiques disponibles sont le régime d'exclusion, la consommation de denrées alimentaires dé lactosées et la supplémentation en lactase exogène lors de la consommation de sources de lactose.

**Conflits d'intérêts :** RB est investigateur d'une étude en cours sur le quotient respiratoire et la mise en évidence de la malabsorption du lactose. GC et RB exercent une activité de conseil auprès de la fondation Urgo. ■

### Références

Les références importantes apparaissent en gras.

1. Jarvela I, Tornainen S, Kolho KL. Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Ann Med* 2009 ; 41 : 568-75.
2. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1994 ; 202 : 7-20.
3. Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 2000 ; 19 : 165S-75S.
4. Harrington LK, Mayberry JF. A re-appraisal of lactose intolerance. *Int J Clin Pract* 2008 ; 62 : 1541-6.
5. Barbut S. Effects of milk powder and its components on texture, yield, and color of a lean poultry meat model system. *Poult Sci* 2010 ; 89 : 1320-4.
6. Farup PG, Monsbakken KW, Vandvik PO. Lactose malabsorption in a population with irritable bowel syndrome: Prevalence and symptoms. A case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2004 ; 39 : 645-9.
7. Zhao J, Fox M, Cong Y, et al. Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: The role of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2010 ; 31 : 892-900.
8. Labayen I, Forga L, Gonzalez A, et al. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment Pharmacol Ther* 2001 ; 15 : 543-9.
9. Vesa TH, Marteau PR, Briet FB, et al. Raising milk energy content retards gastric emptying of lactose in lactose-intolerant humans with little effect on lactose digestion. *J Nutr* 1997 ; 127 : 2316-20.
10. Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol* 1994 ; 202 : 21-5.
11. Hertzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1996 ; 64 : 232-6.
12. He T, Venema K, Priebe MG, et al. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *Eur J Clin Invest* 2008 ; 38 : 541-7.
13. Briet F, Pochart P, Marteau P, et al. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: A placebo effect. *Gut* 1997 ; 41 : 632-5.
14. Szilagyi A, Shrier I, Heilpern D, et al. Differential impact of lactose/lactase phenotype on colonic microflora. *Can J Gastroenterol* 2010 ; 24 : 373-9.
15. Dahlqvist A, Lindberg T, Meeuwisse G, et al. Intestinal dipeptidases and disaccharidases in children with malabsorption. *Acta Paediatr Scand* 1970 ; 59 : 621-30.
16. Kuokkanen M, Myllyniemi M, Vauhkonen M, et al. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy* 2006 ; 38 : 708-12.
17. Rasinpera H, Savilahti E, Enattah NS, et al. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004 ; 53 : 1571-6.
18. Soeparto P, Stobg EA, Walker-Smith JA. Role of chemical examination of the stool in diagnosis of sugar malabsorption in children. *Arch Dis Child* 1972 ; 47 : 56-61.
19. Arola H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol* 1994 ; 202 : 26-35.
20. Jarvela IE. Molecular diagnosis of adult-type hypolactasia (lactase non-persistence). *Scand J Clin Lab Invest* 2005 ; 65 : 535-9.
21. Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, et al. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975 ; 293 : 1232-6.
22. Rosado JL, Solomons NW. Sensitivity and specificity of the hydrogen breath-analysis test for detecting malabsorption of physiological doses of lactose. *Clin Chem* 1983 ; 29 : 545-8.
23. Hovde O, Farup PG. A comparison of diagnostic tests for lactose malabsorption-which one is the best? *BMC Gastroenterol* 2009 ; 9 : 82.
24. Casellas F, Varela E, Aparici A, et al. Development, validation, and applicability of a symptoms questionnaire for lactose malabsorption screening. *Dig Dis Sci* 2009 ; 54 : 1059-65.
25. Casellas F, Aparici A, Casaus M, et al. Subjective perception of lactose intolerance does not always indicate lactose malabsorption. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010 ; 8 : 581-6.
26. Gibson PR, Shepherd SJ. Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The fodmap approach. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 ; 25 : 252-8.
27. Portincasa P, Di Ciaula A, Vacca M, et al. Beneficial effects of oral tilactase on patients with hypolactasia. *Eur J Clin Invest* 2008 ; 38 : 835-44.
28. Montalto M, Nucera G, Santoro L, et al. Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: A crossover double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Nutr* 2005 ; 59 : 489-93.

## **V. Discussion, conclusions et perspectives**

### **V. 1. DISCUSSION GENERALE**

Ce travail a permis de valider l'hypothèse selon laquelle la non-utilisation du lactose liée à sa malabsorption par les sujets malabsorbants peut être détectée par mesure des échanges respiratoires en calorimétrie indirecte. Pendant les quelques heures suivant l'ingestion de lactose, celui-ci passe l'intestin grêle sans être absorbé et parvient au côlon où il est fermenté. L'absence d'absorption iléale s'observe en calorimétrie indirecte, comme souligné dans les études animale et clinique, avec une montée moindre du QR et de la Gox et une inhibition moindre de la Lox. Les différences maximales entre les 2 groupes sont obtenues aux environs de 3 heures post-ingestion chez les animaux (groupe saccharose versus groupe lactose) et de 1 heure post-ingestion chez l'Homme (absorbants versus malabsorbants). Le pic de QR atteint sa valeur maximale de 0.93 à  $t = 210$  min chez le rat recevant un régime lactose et de 0.87 à  $t = 50$  min chez le sujet malabsorbant. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences de cinétique. D'une part, contrairement à l'Homme qui est capable d'ingérer du lactose seul dilué dans de l'eau pur, le rat a reçu un régime contenant du lactose mélangé à d'autres nutriments qui ont ainsi contribué à une montée plus importante de QR. De plus, la dose de lactose ingérée n'est pas transposable de l'animal à l'Homme puisque le rat a ingéré en moyenne 3.1 g de lactose/ kg poids corporel alors que l'Homme a ingéré en moyenne 0.4 g de lactose/ kg poids corporel. Par ailleurs, les pics de QR significativement différents entre les rats recevant le régime saccharose (QR max = 1) ou lactose (QR max = 0.93), et entre les sujets absorbants (QR max = 0.93) et malabsorbants (QR max = 0.87) suggèrent que cette mesure métabolique pourrait être utilisée pour détecter la malabsorption du lactose chez l'Homme. Comme indiqué dans l'étude clinique, la mesure du QR pourrait être couplée à d'autres paramètres cliniques comme le score des symptômes (principalement des flatulences) ou la localisation de la douleur, et biologiques comme la glycémie. La mesure de QR présente l'avantage d'une préparation simple (une nuit de jeûne) contrairement au test respiratoire à l'hydrogène qui nécessite une préparation sur 48 h (régime sans résidus, absence de cigarette et d'activité physique). Il est à noter que la principale difficulté de sa mesure est le bruit de fond causé par l'hyperventilation du patient mais qu'elle peut être minimisée par l'habituation du sujet à l'appareil durant une

trentaine de minutes avant l'établissement de la ligne de base. La mesure du QR pourrait s'avérer être une méthode diagnostique également intéressante pour certains patients, notamment diabétiques ou atteints d'une pullulation de l'intestin grêle. En effet, chez ces patients, les techniques traditionnelles ne sont pas applicables puisque leur condition peut engendrer des résultats erronés. Par exemple, un faux diagnostic négatif peut se produire dans le cas du test de glycémie réalisé chez un sujet diabétique non traité (l'augmentation de glycémie peut être due à une glycémie aléatoire, plutôt qu'à la bonne absorption intestinale du lactose) et un faux diagnostic positif peut se produire dans le cas du test respiratoire à l'hydrogène réalisé chez un patient atteint d'une pullulation de l'intestin grêle (l'augmentation d'hydrogène expiré peut être due à la fermentation d'une partie du lactose dans l'intestin grêle par les bactéries gram négatif présentes, plutôt qu'à la fermentation du lactose malabsorbé au niveau du côlon). Des études complémentaires restent cependant nécessaires pour valider l'efficacité de la mesure du QR sur un plus grand échantillon, ainsi que sur les populations particulières (patients diabétiques, atteints d'une pullulation de l'intestin grêle, fumeurs, sportifs, asthmatiques...) chez qui les modifications connues du métabolisme glucidique, de la fermentation microbienne intestinale, du temps de transit colique et des troubles de la respiration sont susceptibles de perturber les valeurs de QR enregistrées.

Ce travail a également permis de valider l'hypothèse que le devenir intracolique du lactose non digéré était susceptible de moduler l'activité et la composition du microbiote intestinal et le métabolisme de l'hôte. Dans le côlon du rat ayant ingéré du lactose, comme dans celui du sujet malabsorbeur, la chaîne trophique de fermentation du lactose par le microbiote est alors initiée. Le lactose utilisé comme substrat énergétique permet la prolifération des bactéries fermentaires primaires et/ou à activité beta-galactosidase positive (lactobacilles, bifidobactéries, entérobactéries, *Bacteroides*) notamment dans le caecum et le côlon proximal. Ces proliférations sont associées à l'augmentation d'activité beta-galactosidase et à la production de gaz (appréciée qualitativement dans le caecum des animaux au moment des dissections), d'AGCC et de lactate dans les contenus caecaux et coliques. L'augmentation des concentrations en métabolites microbiens témoignent de leur accumulation, observée dès le premier jour d'ingestion de lactose. Les élévations des concentrations en AGCC et en acide lactique coïncident avec une augmentation de l'expression des transporteurs coliques spécifiques à ces composés 6

heures après l'ingestion de lactose. Cette réabsorption colique peut être interprétée comme le résultat d'interactions microbiote-hôte. Cependant, au-delà de la 8<sup>e</sup> heure post-ingestion, l'expression des transporteurs coliques reste stable suggérant une saturation des capacités adaptatives de l'hôte. Pendant la période [6-8h] post-ingestion, l'activation des transporteurs peut expliquer la hausse (et le moment d'apparition du pic) des teneurs en AGCC et lactate dans le sang porte. Lorsque l'ingestion de lactose se prolonge dans le temps (jusqu'à 6 jours), la saturation des transporteurs coliques à AGCC reste visible avec une stabilisation de la concentration en AGCC et en lactate dans le sang porte. Les AGCC absorbés par l'hôte sont alors métabolisés dans le foie ou dans les autres tissus (muscle, cerveau, cœur). L'apport tardif d'énergie qu'ils représentent s'observe également en calorimétrie indirecte au-delà de la 8<sup>e</sup> heure post ingestion, avec une stabilisation du QR et de la Gox au-dessus de la ligne de base. Le défaut d'absorption de polysaccharides provenant de diverses fibres alimentaires (cellulose, pectines, amidon résistant, arabinoxylane) suivi d'une récupération tardive d'énergie, avait d'ailleurs été mis en évidence par calorimétrie indirecte et avait révélé des effets plus ou moins prononcés selon la nature de ces fibres (Aust *et al.*, 2001).

Lorsque l'ingestion de lactose est prolongée jusqu'à 6 jours, les AGCC et le lactate poursuivent leur accumulation dans le lumen conduisant à une acidification des contenus et à une augmentation d'osmolarité. Pendant les premiers jours d'ingestion de lactose nous avons observé une hausse de l'activité MPO ainsi qu'une modification de paramètres histologiques de la muqueuse colique avec une réduction du ratio [muqueuse/section] et une augmentation du ratio cellules [muco-sécrétrices/colonyctes]. Cet état transitoire qui s'atténue après le 2<sup>e</sup> jour est néanmoins évocateur d'un état inflammatoire. De façon similaire, des mécanismes inflammatoires ont été observés chez le rat (Ten Bruggencate *et al.*, 2005) et l'Homme (Ten Bruggencate *et al.*, 2006) recevant un régime contenant des fructo-oligosaccharides pendant 2 semaines. Dans ce cas, l'ingestion chronique de fibres fermentescibles a conduit à une prolifération caecale et colique de bifidobactéries et de lactobacilles, à une augmentation des concentrations caecales en AGCC et des concentrations en mucines fécales, ainsi qu'à une augmentation de la perméabilité intestinale (excrétion urinaire de CrEDTA) et de la translocation bactérienne (Salmonelle) probablement due à une altération des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. Bien que les conséquences d'une telle ingestion chronique de fibres

fermentescibles semblent relativement bien établies, aucune étude n'a confirmé de telles données lors d'une ingestion chronique de lactose par un individu malabsorbeur.

La principale modulation d'un apport prolongé en lactose concerne le microbiote intestinal. Même si le nombre de bactéries totales reste stable, de profonds remaniements des équilibres entre les populations étudiées se produisent de façon segment-spécifique. En effet, après 6 jours consécutifs d'ingestion de lactose, la prédominance des bifidobactéries et des groupes *Lactobacillus* et *Bacteroides* s'installe dans le caecum ; celle des bactéries lactiques et du groupe *Bacteroides* s'installe dans le côlon proximal ; celle des bifidobactéries et du groupe *Bacteroides* s'installe dans le côlon distal. Les bactéries sulfato-réductrices diminuent dans tous les segments à la faveur des bactéries acétogènes dans le caecum et le côlon proximal, et à la faveur des bactéries acétogènes et des archées méthanogènes dans le côlon distal. Les évolutions spatio-temporelles des différentes populations bactériennes peuvent être liées aux évolutions des paramètres physico-chimiques dans le lumen (hausse d'osmolarité, baisse du pH, baisse des concentrations en donneurs et accepteurs d'électrons...) et à l'établissement d'interactions entre populations (compétitions, syntrophismes). Ces modulations de composition, associées à des modulations d'activités métaboliques, ont alors contribué à la création à J6 d'une zone de fermentation active tout le long du côlon et principalement dans le caecum et le côlon proximal, ainsi que d'une zone de récupération d'hydrogène à partir du caecum et s'intensifiant fortement dans le côlon distal. Malgré des conditions d'étude et des techniques d'analyse très différentes, nos résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres équipes soulignant la modulation de composition et d'activité des bactéries des contenus, ainsi que l'amélioration de la tolérance de l'hôte (Briet *et al.*, 1997 ; He *et al.*, 2006 ; He *et al.*, 2007 ; Hertzler *et al.*, 1996 ; Ten Bruggencate *et al.*, 2005 ; Ten Bruggencate *et al.*, 2006 ; Szilagy *et al.*, 2010). De plus, nos résultats complètent ceux obtenus précédemment et semblent originaux dans la mesure où ils présentent une description des conséquences d'une malabsorption prolongée de lactose :

- spatio-temporelle avec un suivi des variations de chaque segment à différents temps,
- intégrée avec l'évaluation des conséquences globales, à l'échelle du métabolisme du microbiote et de l'hôte mais aussi à l'échelle de la physiologie de l'hôte.

La modification de la physiologie de l'hôte pourrait donc être consécutive aux modulations du microbiote. La modification des paramètres inflammatoires liée à une

évolution de la composition du microbiote intestinal a déjà été décrite dans la littérature scientifique. En effet, l'administration chronique (21 jours) d'un régime déficient en magnésium sur un modèle souris a d'abord conduit à une diminution rapide des teneurs coliques en bifidobactéries puis à une perturbation de la fonction barrière de l'épithélium intestinal, à une inflammation de l'épithélium intestinal (augmentation des TNF-alpha et des interleukines IL-6) et à des perturbations métaboliques comme le diabète de type-2 (Cani *et al.*, 2008; Pachikian *et al.*, 2010).

Comme illustré dans la **figure 29**, les résultats de nos études permettent donc de proposer un nouveau marqueur de la malabsorption du lactose qui, après une plus ample validation, pourrait être utilisé pour le diagnostic chez l'homme. Ils mettent également en évidence les conséquences de l'ingestion aiguë ou chronique de lactose sur la dynamique des populations bactériennes coliques, sur leurs activités métaboliques et sur la physiologie de l'hôte. Ces résultats soulignent l'existence d'interactions entre le microbiote intestinal et l'hôte malabsorbeur mis en situation d'ingestion de lactose. Certains des mécanismes d'interaction suggérés dans ce travail pourraient être exploités pour arriver à une atténuation des symptômes de l'intolérance au lactose.

## V. 2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos travaux mettent en évidence la modulation du microbiote intestinal essentielle à l'adaptation de la physiologie de l'hôte malabsorbeur ingérant du lactose, aussi bien ponctuellement que de façon prolongée. Ces résultats suggèrent l'importance des interactions hôte-microbiote, dans le cadre d'une malabsorption aiguë et chronique de lactose.

Plusieurs perspectives peuvent alors être envisagées. Premièrement, la calorimétrie indirecte pourrait être utilisée comme méthode diagnostique (complémentaire aux tests cliniques) de la malabsorption du lactose. Deuxièmement, certains micro-organismes pourraient être utilisés pour réduire les symptômes de l'intolérance. Notre étude a suggéré les bénéfices de probiotiques « traditionnels » constitués de souches de lactobacilles ou de bifidobactéries mais aussi, de façon plus originale, les bénéfices d'une complémentation (si toutefois elle est techniquement possible) en micro-organismes

hydrogénotrophes (bactéries acétogènes ou archées méthanogènes) ainsi qu'en *Bacteroides* (avec des propriétés protéolytiques atténuées).

Suite aux résultats obtenus lors de ce projet de thèse, le développement d'un kit de diagnostic (couplant la détection de la malabsorption et de l'intolérance au lactose) et de traitement optimisé a débuté au sein de l'entreprise Vivatech ayant financé ce projet.

## Références

---

### A

Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Feb;129(2):434-40, 440.

Anthoni SR, Rasinperä HA, Kotamies AJ, Komu HA, Pihlajamäki HK, Kolho KL, Järvelä IE. Molecularly defined adult-type hypolactasia among working age people with reference to milk consumption and gastrointestinal symptoms. *World J Gastroenterol.* 2007 Feb 28;13(8):1230-5.

Argnani F, Di Camillo M, Marinaro V, Foglietta T, Avallone V, Cannella C, Vernia P. Hydrogen breath test for the diagnosis of lactose intolerance, is the routine sugar load the best one? *World J Gastroenterol.* 2008 Oct 28;14(40):6204-7.

Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One.* 2009 Sep 23;4(9):e7125.

Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1994;202:21-5.

Attaluri A, Jackson M, Valestin J, Rao SS. Methanogenic flora is associated with altered colonic transit but not stool characteristics in constipation without IBS. *Am J Gastroenterol.* 2010 Jun;105(6):1407-11.

Aust L, Dongowski G, Frenz U, Täufel A, Noack R. Estimation of available energy of dietary fibres by indirect calorimetry in rats. *Eur J Nutr.* 2001 Feb;40(1):23-9.

## **B**

Bácsi K, Kósa JP, Lazáry A. LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2009 Apr;20(4):639-45.

Ballesta S, Velasco C, Borobio MV, Argüelles F, Perea EJ. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Fresh versus pasteurized yogurt: comparative study of the effects on microbiological and immunological parameters, and gastrointestinal comfort. 2008 Nov;26(9):552-7.

Barbut S. Effects of milk powder and its components on texture, yield, and color of a lean poultry meat model system. *Poult Sci.* 2010 Jun;89(6):1320-4.

Barrett JS, Irving PM, Shepherd SJ, Muir JG, Gibson PR. Comparison of the prevalence of fructose and lactose malabsorption across chronic intestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Jul 1;30(2):165-74.

Barrow L, Steed KP, Spiller RC, Watts PJ, Melia CD, Davies MC, Wilson CG. Scintigraphic demonstration of lactulose induced accelerated proximal colon transit. *Gastroenterol.* 1992 Oct;103:1167–1173, 1992.

Barth JA, Li W, Krasinski SD, Montgomery RK, Verhave M, Grand RJ. Asymmetrical localization of mRNAs in enterocytes of human jejunum. *J Histochem Cytochem.* 1998 Mar;46(3):335-43.

Bassotti G, Betti C, Fusaro C, Morelli A. Colonic high amplitude propagated contractions (mass movements): repeated 24-h manometric studies in healthy volunteers. *J Gastrointest Motil.* 1992 Sept; 4:187–191.

Bayless TM, Rothfeld B, Massa C, Wise L, Paige D, Bedline MS. Lactose and milk intolerance: clinical implications. *N Engl J Med.* 1975 May; 292: 1156–9.

Beards E, Tuohy K, Gibson G. Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food ingredients following in vitro fermentation by human colonic microbiota. *Anaerobe*. 2010 Aug;16(4):420-5.

Berggren AM, Nyman EM, Björck IM, Eggum BO. Formation of short-chain fatty acids from different dietary fibre sources in the rat caecum. *Eur J Clin Nutr*. 1995 Oct;49 Suppl 3:S233-4.

Beyerlein L, Pohl D, Delco F, Stutz B, Fried M, Tutuian R. Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50 g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Apr;27(8):659-65.

Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*. 2010 May 17;5(5):e10667.

Blottiere HM, Cherbut C, Boujtita N, Galmiche J-P. Effect of short-chain fatty acids on primary culture of colonic and ileal smooth muscle cell. *Eur Symp GI Motil*. 1994 ;6:155.

Bodé S, Gudmand-Høyer E. Incidence and clinical significance of lactose malabsorption in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 1988 May;23(4):484-8.

Borgstrom B, Dahlqvist A, Hambreus L. Recommendations on the performance of lactose tolerance tests. *Intestinal enzyme deficiencies and their nutritional implications*. Uppsala: Almqvist & Wiksell, 1973: 149.

Briet F, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Arrigoni E, Rambaud JC. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut*. 1997 Nov;41(5):632-5.

Bruley des Varannes S, Cherbut C, Schnee M, Delort-Laval J, Galmiche JP. Effects of lactulose on fasting small intestine myoelectrical activity in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1992;4:539-545.

## C

Campbell JM, Fahey GC Jr, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr.* 1997 Jan;127(1):130-6.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008 Jun;57(6):1470-81.

Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007 Nov;10(6):729-34.

Cani PD, Delzenne NM. The role of gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(13):1546-58.

Cardoso RR, Santos RM, Cardoso CR, Carvalho MO. Consumption of camel's milk by patients intolerant to lactose. A preliminary study. *Rev Alerg Mex.* 2010 Jan-Feb;57(1):26-32.

Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Ringel Y. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2012 Jun;24(6):521-30.

Casellas F, Aparici A, Casaus M, Rodríguez P, Malagelada JR. Subjective perception of lactose intolerance does not always indicate lactose malabsorption. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010 Jul;8(7):581-6.

Casellas F, Varela E, Aparici A, Casaus M, Rodríguez P. Development, validation, and applicability of a symptoms questionnaire for lactose malabsorption screening. *Dig Dis Sci.* 2009 May;54(5):1059-65.

Cayot P, Fairise JF, Colas B, Lorient D, Brulé G. Improvement of rheological properties of firm acid gels by skim milk heating is conserved after stirring. *J Dairy Res.* 2003 Nov;70(4):423-31.

Chassard C, Dapoigny M, Scott KP, Crouzet L, Del'homme C, Marquet P, Martin JC, Pickering G, Ardid D, Eschalier A, Dubray C, Flint HJ, Bernalier-Donadille A. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Apr;35(7):828-38.

Chassard C, Scott KP, Marquet P, Martin JC, Del'homme C, Dapoigny M, Flint HJ, Bernalier-Donadille A. Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008 Dec;66(3):496-504.

Chen W, Chen H, Xia Y, Zhao J, Tian F, Zhang H. Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *J Dairy Sci.* 2008 May;91(5):1751-8.

Christl SU, Gibson GR, Cummings JH. Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine. *Gut.* 1992 Sep;33(9):1234-8.

Clausen MR, Mortensen PB. Kinetic studies on the metabolism of short-chain fatty acids and glucose by isolated rat colonocytes. *Gastroenterol.* 1994 Feb;106(2):423-32.

Collares EF, Rossi MA, Macedo Ada S. Experimental dilatation of the cecum and colon in rats. II. Reversion after induction by the continuous administration of lactose. *Arq Gastroenterol.* 1985 Oct-Dec;22(4):192-5.

Conway de Macario E, Macario AJ. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol.* 2009 Feb;299(2):99-108.

Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998 Jun;12(6):499-507.

Cummings JH, Hill MJ, Jenkins DJ, Pearson JR, Wiggins HS. Changes in fecal composition and colonic function due to cereal fiber. *Am J Clin Nutr.* 1976 Dec;29(12):1468-73.

Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 1987 Oct;28(10):1221-7.

## **D**

Da Costa Pinto EA, Collares EF. Chronic lactose intake modifies the gastric emptying of monosaccharides but not of disaccharides in weanling rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Jun;30(6):723-6.

Dahlqvist A. Assay of intestinal disaccharidases. *Scand J Clin Lab Invest.* 1984 Apr;44(2):169-72.

Dahlqvist A, Lindberg T, Meeuwisse G, Akerman M. Intestinal dipeptidases and disaccharidases in children with malabsorption. *Acta Paediatr Scand.* 1970 Nov;59:621-630.

David C, Poiffait A, Frangne R, Adrian J. Effect of prolonged consumption of lactose or hydrolyzed lactose in rats--nutritive efficiency and anatomical changes. *Int J Vitam Nutr Res.* 1980;50(2):193-9.

Dawson DJ, Lobley RW, Burrows PC, Miller V, Holmes R. Lactose digestion by human jejunal biopsies: the relationship between hydrolysis and absorption. *Gut.* 1986 May;27(5):521-7.

DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc.* 2008 Apr;83(4):460-9.

DiPalma JA, Collins MS. Enzyme replacement for lactose malabsorption using a beta-D-galactosidase. *J Clin Gastroenterol.* 1989 Jun;11(3):290-3.

Di Stefano M. Visceral hypersensitivity and intolerance symptoms in lactose malabsorption. *Neurogastroenterol Motil.* 2007 Nov;19, 887–895.

Di Stefano M, Terulla V, Tana P, Mazzocchi S, Romero E, Corazza GR. Genetic test for lactase non-persistence and hydrogen breath test: is genotype better than phenotype to diagnose lactose malabsorption? *Dig Liver Dis.* 2009 Jul;41(7):474-9.

Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Strocchi A, Corazza GR. Lactose malabsorption and intolerance in the elderly. *Scand J Gastroenterol.* 2001 Dec;36(12):1274-8.

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 29;107(26):11971-5.

Drake HL, Küsel, K, Matthies C. Acetogenic Prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.) *The Prokaryotes*, Vol. 2, 354-420, 2006 New York, Springer.

Ducrotté P. Microbiota and irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010 Sep;34 Suppl 1:S52-6.

## **E**

Eadala P, Matthews SB, Waud JP, Green JT, Campbell AK. Association of lactose sensitivity with inflammatory bowel disease - demonstrated by analysis of genetic polymorphism, breath gases and symptoms. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Oct;34(7):735-46.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005 Jun 10;308(5728):1635-8.

Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. Archaea and their potential role in human disease. *Infect Immun.* 2003 Feb;71(2):591-6.

Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil IF, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi SQ, Groop L, Vestergaard EM, Imtiaz F, Rashed MS, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet.* 2008 Jan;82(1):57-72.

Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet.* 2002 Feb;30(2):233-7.

Enattah NS, Trudeau A, Pimenoff V, Maiuri L, Auricchio S, Greco L, Rossi M, Lentze M, Seo JK, Rahgozar S, Khalil I, Alifrangis M, Natah S, Groop L, Shaat N, Kozlov A, Verschubskaya G, Comas D, Bulayeva K, Mehdi SQ, Terwilliger JD, Sahi T, Savilahti E, Perola M, Sajantila A, Järvelä I, Peltonen L. Evidence of still ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. *Am J Hum Genet.* 2007 Sep;81(3):615-25.

Englyst HN, Hay S, Macfarlane GT: Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology Lett.* 1987 Jun;45(3):163-171.

Escribano Subias J, Sanz Manrique N, Villa Elizaga I, Tormo Carnicé R. Relationship between primary lactose malabsorption and consumption of dairy products. *An Esp Pediatr.* 1993 Feb;38(2):107-12.

## **F**

Farup PG, Monsbakken KW, Vandvik PO. Lactose malabsorption in a population with irritable bowel syndrome: prevalence and symptoms. A case-control study. *Scand J Gastroenterol.* 2004 Jul;39(7):645-9.

Flatz G, Rothauwe HW. Lactose nutrition and natural selection. *Lancet*. 1973 Jul 14;2(7820):76-7.

Fleming SE, Arce DS. Volatile fatty acids: Their production, absorption, utilisation, and roles in human health. *Clin Gastroenterol*. 1986 Oct;15:787-814.

Florent C, Flourie B, Leblond A, Rautureau M, Bernier JJ, Rambaud JC. Influence of chronic lactulose ingestion on the colonic metabolism of lactulose in man (an in vivo study). *J Clin Invest*. 1985 Feb;75(2):608-13.

Flourié B, Etanchaud F, Florent C, Pellier P, Bouhnik Y, Rambaud JC. Comparative study of hydrogen and methane production in the human colon using caecal and faecal homogenates. *Gut*. 1990 Jun;31(6):684-5.

Flourié B, Pellier P, Florent C, Marteau P, Pochart P, Rambaud JC. Site and substrates for methane production in human colon. *Am J Physiol*. 1991 May;260(5 Pt 1):G752-7.

Frangne R, Rabache M, Adrian J. Consequences in the rat of prolonged consumption of lactose or hydrolyzed lactose. Composition of the liver. *Int J Vitam Nutr Res*. 1983 Feb;53(3):345-8.

Freund JN, Duluc I, Raul F. Lactase expression is controlled differently in the jejunum and ileum during development in rats. *Gastroenterology*. 1991 Feb;100(2):388-94.

Freund JN, Jost B, Duluc I, Morel G. Ultrastructural study of intestinal lactase gene expression. *Biol Cell*. 1995;83(2-3):211-7.

## **G**

Ganapathy V, Thangaraju M, Gopal E, Martin PM, Itagaki S, Miyauchi S, Prasad PD. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J*. 2008 Apr;10(1):193-9.

García-Garibay M, Gómez-Ruiz L. Uses of microbial beta-galactosidases to reduce lactose content in milk and dairy products. *Rev Invest Clin*. 1996 Nov;48 Suppl:51-61.

Gerbault P, Moret C, Currat M, Sanchez-Mazas A. Impact of selection and demography on the diffusion of lactase persistence. *PLoS One*. 2009 Jul 24;4(7):e6369.

Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT. Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J Appl Bacteriol*. 1988 Sep;65(3):241-7.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995 Jun;125(6):1401-12.

Gilat T, Russo S, Gelman-Malachi E, Aldor TA. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. *Gastroenterol*. 1972 Jun;62(6):1125-7.

Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R, Van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*. 2010 Dec;23(2):366-84.

Grand RJ, Montgomery RK. Lactose malabsorption. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2008 Feb;11(1):19-25.

## **H**

Habte D, Sterky G, Hjalmarsson B. Lactose malabsorption in Ethiopian children. *Acta Paediatr Scand*. 1973 Nov;62(6):649-54.

Hakansson A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*. 2011 Jun;3(6):637-82.

Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Jan 15;27(2):104-19.

Harrington LK, Mayberry JF. A re-appraisal of lactose intolerance. *Int J Clin Pract.* 2008 Oct; 62:1541-1546.

Harvey CB, Fox MF, Jeggo PA, Mantei N, Povey S, Swallow DM. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. *Ann Hum Genet.* 1993 Jul;57(Pt 3):179-85.

Harvey CB, Hollox EJ, Poulter M, Wang Y, Rossi M, Auricchio S, Iqbal TH, Cooper BT, Barton R, Sarner M, Korpela R, Swallow DM. Lactase haplotype frequencies in Caucasians: association with the lactase persistence/non-persistence polymorphism. *Ann Hum Genet.* 1998 May;62(Pt 3):215-23.

He M, Antoine JM, Yang Y, Yang J, Men J, Han H. Influence of live flora on lactose digestion in male adult lactose-malabsorbers after dairy products intake. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2004 Sep;33(5):603-5.

He T, Priebe MG, Harmsen HJ, Stellaard F, Sun X, Welling GW, Vonk RJ. Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1):58-63.

He T, Priebe MG, Vonk RJ, Welling GW. Identification of bacteria with beta-galactosidase activity in faeces from lactase non-persistent subjects. *FEMS Microbiol Ecol.* 2005 Nov 1;54(3):463-9.

He T, Priebe MG, Welling GW, Vonk RJ. Effect of lactose on oro-cecal transit in lactose digesters and maldigesters. *Eur J Clin Invest.* 2006 Oct;36(10):737-42.

He T, Priebe MG, Zhong Y, Huang C, Harmsen HJ, Raangs GC, Antoine JM, Welling GW, Vonk RJ. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol.* 2008 Feb;104(2):595-604.

He T, Venema K, Priebe MG, Welling GW, Brummer RJ, Vonk RJ. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *Eur J Clin Invest.* 2008 Aug;38(8):541-7.

Hedderich R and Whitman WB. Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea, *The Prokaryotes*, Vol. 2, 1050–1079, 2006. New York, Springer.

Hermans MM, Brummer RJ, Ruijgers AM, Stockbrugger RW. The relationship between lactose tolerance test results and symptoms of lactose intolerance. *Am J Gastroenterol.* 1997 June; 92: 981–4.

Hermida C, Corrales G, Martínez-Costa OH, Fernández-Mayoralas A, Aragón JJ. Noninvasive evaluation of intestinal lactase with 4-galactosylxylose: comparison with 3- and 2-galactosylxylose and optimization of the method in rats. *Clin Chem.* 2006 Feb;52(2):270-7.

Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc.* 2003 May;103(5):582-7.

Hertzler SR, Huynh BC, Savaiano DA. How much lactose is low lactose? *J Am Diet Assoc.* 1996 Mar;96(3):243-6.

Hertzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr.* 1996 Aug;64(2):232-6.

Hiele M, Ghos Y, Rutgeerts P, Vantrappen G, Carchon H, Eggermont E. <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> breath test using naturally <sup>13</sup>C-enriched lactose for detection of lactase deficiency in patients with gastrointestinal symptoms. *J Lab Clin Med.* 1988 Aug;112:193-200.

Humblot C, Bruneau A, Sutren M, Lhoste EF, Doré J, Andrieux C, Rabot S. Brussels sprouts, inulin and fermented milk alter the faecal microbiota of human microbiota-associated rats as shown by PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis using universal,

Lactobacillus and Bifidobacterium 16S rRNA gene primers. *Br J Nutr.* 2005 May;93(5):677-84.

Holtug K, Clausen MR, Hove H, Christiansen J, Mortensen PB. The colon in carbohydrate malabsorption: Short-chain fatty acids, pH, and osmotic diarrhea. *Scand J Gastroenterol.* 1992 Jul; 27:545- 552.

Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis.* 2002 Sep;34 Suppl 2:S12-8.

Hovde Ø, Farup PG. A comparison of diagnostic tests for lactose malabsorption--which one is the best? *BMC Gastroenterol.* 2009 Oct 31;9:82.

## **I**

Ingram CJ, Raga TO, Tarekegn A, Browning SL, Elamin MF, Bekele E, Thomas MG, Weale ME, Bradman N, Swallow DM. Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: several different lactase persistence-associated alleles in a single ethnic group. *J Mol Evol.* 2009 Dec;69(6):579-88.

Islam J, Cohen J, Rajkumar C, Llewelyn MJ. Probiotics for the prevention and treatment of *Clostridium difficile* in older patients. *Age Ageing.* 2012 Jun 19 (ahead of print).

## **J**

Jacob R, Peters K, Naim HY. The prosequence of human lactase-phlorizin hydrolase modulates the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):8217-25.

Jagoda CA, Rillema JA. Temporal effect of prolactin on the activities of lactose synthetase, alpha-lactalbumin, and galactosyl transferase in mouse mammary gland explants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991 Sep;197(4):431-4.

Järvelä I, Enattah NS, Kokkonen J, Varilo T, Savilahti E, Peltonen L. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am J Hum Genet.* 1998 Oct;63(4):1078-85.

Järvelä I, Torniainen S, Kolho KL. Molecular genetics of human lactase deficiencies. *Ann Med.* 2009;41(8):568-75.

Jellema P, Schellevis FG, van der Windt DA, Kneepkens CM, van der Horst HE. Lactose malabsorption and intolerance: a systematic review on the diagnostic value of gastrointestinal symptoms and self-reported milk intolerance. *QJM.* 2010 Aug;103(8):555-72.

Jeppesen PB, Mortensen PB. Colonic digestion and absorption of energy from carbohydrates and medium-chain fat in small bowel failure. *J Parenter Enteral Nutr.* 1999 Sept-Oct;23:S101-105.

Jiang T, Savaiano DA. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Dig Dis Sci.* 1997 Nov;42(11):2370-7.

Johnson AO, Semanya JG, Buchowski MS, Enwonwu CO, Scrimshaw NS. Adaptation of lactose maldigesters to continued milk intakes. *Am J Clin Nutr.* 1993 Dec;58(6):879-81.

Jones DV, Latham MC, Kosikowski FV, Woodward G. Symptom response to lactose-reduced milk in lactose-intolerant adults. *Am J Clin Nutr.* 1976 Jun;29(6):633-8.

Jones VA, McLaughlan P, Shorthouse M, Workman E, Hunter JO. Food intolerance: a major factor in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Lancet.* 1982 Nov 20;2(8308):1115-7.

Jouët P, Coffin B, Cuillerier E, Soulé JC, Flourié B, Lémann M. Colonic motility in humans. Recent physiological, pathophysiological and pharmacological data. *Gastroenterol Clin Biol.* 2000 Mar;24(3):284-98.

Jussila J. Milk intolerance and lactose malabsorption in hospital patients and young servicemen in Finland. *Ann Clin Res.* 1969 Nov;1(3):199-207.

## **K**

Karlin DA, Mastromarino AJ, Jones RD, Stroehlein JR, Lorentz O. Fecal skatole and indole and breath methane and hydrogen in patients with large bowel polyps or cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1985 Jan;109(2):135-41.

Keith JN, Nicholls J, Reed A, Kafer K, Miller GD. The prevalence of self-reported lactose intolerance and the consumption of dairy foods among African American adults are less than expected. *J Natl Med Assoc.* 2011 Jan;103(1):36-45.

Kim KI, Benevenga NJ, Grummer RH. Estimation of the fraction of the lactose in a high lactose diet available for fermentation in the cecum and colon of the rat. *J Nutr.* 1978 Jan;108(1):79-89.

King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet.* 1998 Oct 10;352(9135):1187-9.

Klein PD, Schoeller DA, Niu HC. <sup>13</sup>C breath tests. Components, technology and comparative costs. *Gastroenterol.* 1979;76:1171.

Krasinski SD, Van Wering HM, Tannemaat MR, Grand RJ. Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jul;281(1):G69-84.

Krause J, Kaltbeitzler I, Erckenbrecht JF. Lactose malabsorption produces more symptoms in women than in men. *Gastroenterol.* 1996;110 (Suppl):A339.

Kruse TA, Bolund L, Grzeschik KH, Ropers HH, Sjöström H, Norén O, Mantei N, Semenza G. The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *FEBS Lett.* 1988 Nov 21;240(1-2):123-6.

Kuokkanen M, Butzow R, Rasinperä H, Järvelä I. Lactase persistence and ovarian carcinoma risk in Finland, Poland and Sweden. *Int J Cancer.* 2005 Oct 20;117(1):90-4.

Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, Järvelä I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut.* 2003 May;52(5):647-52.

Kuokkanen M, Myllyniemi M, Vauhkonen M, Helske T, Kääriäinen I, Karesvuori S, Linnala A, Härkönen M, Järvelä I, Sipponen P. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy.* 2006 Jul;38:708-712.

## **L**

Laaksonen MM, Impivaara O, Sievänen H. Associations of genetic lactase non-persistence and sex with bone loss in young adulthood. *Bone.* 2009 May;44(5):1003-9.

Labayen I, Forga L, González A, Lenoir-Wijnkoop I, Nutr R, Martínez JA. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Apr;15(4):543-9.

Ladas S, Papanikos J, Arapakis G. Lactose malabsorption in Greek adults: correlation of small bowel transit time with the severity of lactose intolerance. *Gut.* 1982 Nov;23(11):968-73.

Lakhdari O, Cultrone A, Tap J, Gloux K, Bernard F, Ehrlich SD, Lefèvre F, Doré J, Blottière HM. Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF- $\kappa$ B modulation in the human gut. *PLoS One.* 2010 Sep 30;5(9).

Lami F, Callegari C, Tatali M, Graziano L, Guidetti C, Miglioli M, Barbara L. Efficacy of addition of exogenous lactase to milk in adult lactase deficiency. *Am J Gastroenterol.* 1988 Oct;83(10):1145-9.

Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science.* 2010 Dec 24;330(6012):1768-73.

Lemann M, Flourie B, Picon L, Coffin B, Jian R, Rambaud J-C. Motor activity recorded in the unprepared colon of healthy humans. *Gut.* 1995 Nov;37:649-653.

Lember M, Torniainen S, Kull M, Kallikorm R, Saadla P, Rajasalu T, Komu H, Järvelä I. Lactase non-persistence and milk consumption in Estonia. *World J Gastroenterol.* 2006 Dec 7;12(45):7329-31.

Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottière HM, Raes J, Ehrlich D, Doré J. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut.* 2012 Apr 23 (ahead of print).

Lerebours E, N'Djitoyap Ndam C, Lavoine A, Hellot MF, Antoine JM, Colin R. Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effects of short-term and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity in lactase-deficient subjects. *Am J Clin Nutr.* 1989 May;49(5):823-7.

Leung Ki EL, Roduit J, Delarive J, Guyot J, Michetti P, Dorta G. Small intestine bacterial overgrowth. *Rev Med Suisse.* 2010 Jan 27;6(233):186-8,190-1.

Levitt MD, Donaldson RM. Use of respiratory hydrogen (H<sub>2</sub>) excretion to detect carbohydrate malabsorption. *J Lab Clin Med.* 1970 Jun;1975(6); 937-945.

Levitt MD, Furne J, Aeolus MR, Suarez FL. Evaluation of an extremely flatulent patient: case report and proposed diagnostic and therapeutic approach. *Am J Gastroenterol.* 1998 Nov;93(11):2276-81.

Levri KM, Ketvertis K, Deramo M, Merenstein JH, D'Amico F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract.* 2005 Jul;54(7):613-20.

Lewis SJ, Heaton KW. Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut.* 1997 Aug;41(2):245-51.

Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* 2010 Jan;26(1):5-11.

Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology.* 2006 Apr;130(5):1480-91.

Lybeck Sørensen K, Vergara Meersohn M, Sonne J, Larsen L, Edelsten D, Gudmand-Høyer E. A new type of low-lactose milk. Tolerance by lactose malabsorbers and evaluation of protein nutritional value. *Scand J Gastroenterol.* 1983 Nov;18(8):1063-8.

## **M**

Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int.* 2012 Jan-Feb;95(1):50-60.

Manguet P. Adult intolerance to lactose - Nutritional and therapeutic problems. *Acta Endoscopica.* 2000; 30(3).

Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Oct;9(10):599-608.

Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P, Roca J, Dore J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut.* 2006 Feb;55(2):205-11.

Manokas T, Fromkes JJ, Sundaram U. Crypt-villus distribution and effects on chronic inflammation on ileal SCFA/ HCO<sub>3</sub> exchange. *Gastroenterol.* 1998; 114:A394.

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 2009 Jun 9;9:123

Mark A Cuff, Daniel W Lambert, and Soraya P Shirazi-Beechey. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol.* 2002 March 1; 539(Pt 2): 361–371.

Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Apr;21(2):149-56.

Marteau P, Flourié B. Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *Br J Nutr.* 2001 Mar;85 Suppl 1:S17-21.

Martini MC, Bollweg GL, Levitt MD, Savaiano DA. Lactose digestion by yogurt beta-galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr.* 1987 Feb;45(2):432-6.

Mateo C, Monti R, Pessela BC, Fuentes M, Torres R, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnol Prog.* 2004 Jul-Aug;20(4):1259-62.

Matlik L, Savaiano D, McCabe G, VanLoan M, Blue CL, Boushey CJ. Perceived milk intolerance is related to bone mineral content in 10- to 13-year-old female adolescents. *Pediatrics.* 2007 Sep;120(3):e669-77.

Matthews SB, Campbell AK. Neuromuscular symptoms associated with lactose intolerance. *Lancet* 2000;356:511.

Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J.* 2005 Mar;81(953):167-73.

McCracken RD. Origins and implications of the distribution of adult lactase deficiency in human populations. *J Trop Pediatr Environ Child Health*. 1971 Mar;17(1):7-10.

Metz G, Jenkins DJ, Peters TJ, Newman A, Blendis LM. Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet*. 1975 May 24;1(7917):1155-7.

Mones RL, Yankah A, Duelfer D, Bustami R, Mercer G. Disaccharidase deficiency in pediatric patients with celiac disease and intact villi. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Dec;46(12):1429-34.

Montgomery<sup>1</sup> RK, Kothe<sup>1</sup> C, Büller HA, Grand RJ. Lactase mRNA appears in fetal rat intestine simultaneously with development of columnar epithelial cells. *Pediatric Research*. 1990; 27, 541–541.

Montalto M, Nucera G, Santoro L, Curigliano V, Vastola M, Covino M, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini A and Gasbarrini G. Effect of exogenous beta-galactosidase in patients with lactose malabsorption and intolerance: a crossover double-blind placebo-controlled study. *Eur J Clin Nutr*. 2005 Apr;59:489-493

Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996;216:132-148.

Morr CV, Brandon SC. Membrane fractionation processes for removing 90% to 95% of the lactose and sodium from skim milk and for preparing lactose and sodium-reduced skim milk. *J Food Sci*. 2008 Nov;73(9):C639-47.

Motohashi Y, Fukushima A, Kondo T, Sakuma K. Lactase decline in weaning rats is regulated at the transcriptional level and not caused by termination of milk ingestion. *J Nutr*. 1997 Sep;127(9):1737-43.

## N

Naim HY. The pro-region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase is enzymatically inactive towards lactose. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995 Apr;376(4):255-8.

Naim HY, Jacob R, Naim H, Sambrook JF, Gething MJ. The pro region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem*. 1994 Oct 28;269(43):26933-43.

Naim HY, Sterchi EE, Lentze MJ. Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells. *Biochem J*. 1987 Jan 15;241(2):427-34.

Nanda R, James R, Smith H, Dudley CR, Jewell DP. Food intolerance and the irritable bowel syndrome. *Gut*. 1989 Aug;30(8):1099-104.

Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med*. 1975 Dec 11;293(24):1232-6.

## O

Ojetti V, Nucera G, Migneco A, Gabrielli M, Lauritano C, Danese S, Zocco MA, Nista EC, Cammarota G, De Lorenzo A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. *Digestion*. 2005;71(2):106-10.

El Oufir L, Flourié B, Bruley des Varannes S, Barry JL, Cloarec D, Bornet F, Galmiche JP. Relations between transit time, fermentation products and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut*. 1996 Jun;38(6):870-7.

Owira PM, Winter TA. Colonic energy salvage in chronic pancreatic exocrine insufficiency. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2008 Jan-Feb;32(1):63-71.

## P

Pachikian BD, Neyrinck AM, Deldicque L, De Backer FC, Catry E, Dewulf EM, Sohet FM, Bindels LB, Everard A, Francaux M, Guiot Y, Cani PD, Delzenne NM. Changes in intestinal bifidobacteria levels are associated with the inflammatory response in magnesium-deficient mice. *J Nutr.* 2010 Mar;140(3):509-14.

Papillon E, Bonaz B, Fournet J. Short chain fatty acids: effects on gastrointestinal function and therapeutic potential in gastroenterology. *Gastroenterol Clin Biol.* 1999 Jun-Jul;23(6-7):761-9.

Pascual S, Martínez J, Pérez-Mateo M. The intestinal barrier: functional disorders in digestive and non-digestive diseases. *Gastroenterol Hepatol.* 2001 May;24(5):256-67.

Peuhkuri K, Hukkanen M, Beale R, Polak JM, Vapaatalo H, Korpela R. Age and continuous lactose challenge modify lactase protein expression and enzyme activity in gut epithelium in the rat. *J Physiol Pharmacol.* 1997 Dec;48(4):719-29.

Peuhkuri K, Vapaatalo H, Nevala R, Korpela R. Influence of the pharmacological modification of gastric emptying on lactose digestion and gastrointestinal symptoms. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999 Jan;13(1):81-6.

Pimentel M, Kong Y, Park S. Breath testing to evaluate lactose intolerance in irritable bowel syndrome correlates with lactulose testing and may not reflect true lactose malabsorption. *Am J Gastroenterol.* 2003 Dec;98:2700-4.

Piqué JM, Pallarés M, Cusó E, Vilar-Bonet J, Gassull MA. Methane production and colon cancer. *Gastroenterol.* 1984 Sep;87(3):601-5.

Plugge CM, Zhang W, Scholten JC, Stams AJ. Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Front Microbiol.* 2011;2:81.

Pochart P, Lémann F, Flourié B, Pellier P, Goderel I, Rambaud JC. Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology*. 1993 Nov;105(5):1281-5.

Poiffait A, David C, Adrian J. Effect of prolonged consumption of lactose or hydrolyzed lactose in the rat. 2. Digestibility, retention and utilization of lactose components. *Int J Vitam Nutr Res*. 1982;52(1):96-101

Portincasa P, Di Ciaula A, Vacca M, Montelli R, Wang DQ, Palasciano G. Beneficial effects of oral tilactase on patients with hypolactasia. *Eur J Clin Invest*. 2008 Nov;38(11):835-44.

Priebe MG, Wachters-Hagedoorn RE, Landman K, Heimweg J, Elzinga H, Vonk RJ. Influence of a subsequent meal on the oro-cecal transit time of a solid test meal. *Eur J Clin Invest*. 2006 Feb;36(2):123-6.

## **R**

Rajilić-Stojanović M, Smidt H, de Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol*. 2007 Sep;9(9):2125-36.

Rampengan NH, Manoppo J, Warouw SM. Comparison of efficacies between live and killed probiotics in children with lactose malabsorption. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010 Mar;41(2):474-81.

Rampton DS, McNeil NI, Sarner M. Food intolerance, prostaglandins, and irritable bowel syndrome. *Lancet*. 1983 Jan 15;1(8316):123-4.

Rasinperä H, Forsblom C, Järvelä I. The C/C-13910 genotype of adult-type hypolactasia is associated with an increased risk of colorectal cancer in the Finnish population. *Gut*. 2005 May;54(5):643-7.

Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, Järvelä I, Kolho KL. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1571-6.

Rey FE, Faith JJ, Bain J, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Newgard CB, Gordon JL. Dissecting the in vivo metabolic potential of two human gut acetogens. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22082-90.

Reynolds DA, Rajendran VM, Binder HJ. Bicarbonate-stimulated [<sup>14</sup>C]butyrate uptake in basolateral membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterol*. 1993 Sep;105(3):725-32.

Ridefelt P, Håkansson LD. Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Jul;40(7):822-6.

Rings EH, de Boer PA, Moorman AF, van Beers EH, Dekker J, Montgomery RK, Grand RJ, Büller HA. Lactase gene expression during early development of rat small intestine. *Gastroenterology*. 1992 Oct;103(4):1154-61.

Rings EH, Büller HA, de Boer PA, Grand RJ, Montgomery RK, Lamers WH, Charles R, Moorman AF. Messenger RNA sorting in enterocytes. Co-localization with encoded proteins. *FEBS Lett*. 1992 Mar 30;300(2):183-7.

Rings EH, Krasinski SD, van Beers EH, Moorman AF, Dekker J, Montgomery RK, Grand RJ. Restriction of lactase gene expression along the proximal-to-distal axis of rat small intestine occurs during postnatal development. *Gastroenterology*. 1994 May;106(5):1223-32.

Robayo-Torres CC, Nichols BL. Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia. *Nutr Rev*. 2007 Feb;65(2):95-8.

Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr*. 2007 Nov;137(11 Suppl):2493S-2502S.

Roediger WE. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterol.* 1982 Aug;83:424-9.

Rosado JL, Solomons NW. Sensitivity and specificity of the hydrogen breath-analysis test for detecting malabsorption of physiological doses of lactose. *Clin Chem.* 1983 Mar;29:545-548.

Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG, Jr. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterol.* 1980 Jun;78: 1500-17.

## S

Sadre M, Karbasi K. Lactose intolerance in Iran. *Am J Clin Nutr.* 1979 Sep;32(9):1948-54.

Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1994;202:7-20.

Sakuma K, Watanabe Y, Kurahashi Y. Dietary control of lactase expression in the weaning rat. *Biomed Environ Sci.* 1996 Sep;9(2-3):181-4.

Sebastio G, Villa M, Sartorio R, Guzzetta V, Poggi V, Auricchio S, Boll W, Mantei N, Semenza G. Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet.* 1989 Oct;45(4):489-97.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010 Jul;90(3):859-904.

Seppo L, Tuure T, Korpela R, Järvelä I, Rasinperä H, Sahi T. Can primary hypolactasia manifest itself after the age of 20 years? A two-decade follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(9):1082-7.

Schink B, Stams AJM. Syntrophism among Prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds.) *The Prokaryotes*, Vol 2, 309-335, 2006, New York, Springer.

Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):190-5.

Scrimshaw NS, Murray EB. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *Am J Clin Nutr*. 1988 Oct;48 (suppl 4):1083-1159.

Simoons FJ. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: a problem in biological and cultural interrelations. I. Review of the medical research. *Am J Dig Dis*. 1969 Dec;14(12):819-36.

Soeparto P, Stobo EA, Walker-Smith JA. Role of chemical examination of the stools in diagnosis of sugar malabsorption in children. *Arch Dis Child*. 1972 Feb;47:56-61.

Soergel KH. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Investig*. 1994 Oct;72(10):742-8.

Solomons NW, Garcia-Ibanez R, Viteri FE. Hydrogen breath test of lactose absorption in adults: The application of physiological doses and whole cow's milk sources. *Am J Clin Nutr*. 1980 Mar;33, 545-554.

Squires PE, Rumsey RDE, Edwards CA, Read NW: Effect of short-chain fatty acids on contractile activity and fluid flow in rat colon in vitro. *Am J Physiol* 262:G813–G817, 1992.

Stewart JA, Chadwick VS, Murray A. Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Lett Appl Microbiol*. 2006 Jul;43(1):58-63.

Suarez FL, Savaiano D, Arbisi P, Levitt MD. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. *Am J Clin Nutr*. 1997 May;65(5):1502-6.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Nov;65(11):4799-807.

Szilagyi A. Redefining lactose as a conditional prebiotic. *Can J Gastroenterol.* 2004 Mar;18(3):163-7.

Szilagyi A. Review article: lactose, a potential prebiotic. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002 Sep;16(9):1591-602.

Szilagyi A, Cohen A, Vinokuroff C, Ahmad D, Nathwani U, Yesovitch S. Deadaption and readaptation with lactose, but no cross-adaptation to lactulose: a case of occult colonic bacterial adaptation. *Can J Gastroenterol.* 2004 Nov;18(11):677-80.

Szilagyi A, Rivard J, Fokeeff K. Improved parameters of lactose maldigestion using lactulose. *Dig Dis Sci.* 2001 Jul;46(7):1509-19.

Szilagyi A, Salomon R, Martin M, Fokeeff K, Seidman E. Lactose handling by women with lactose malabsorption is improved during pregnancy. *Clin Invest Med.* 1996 Dec;19(6):416-26.

Szilagyi A, Shrier I, Chong G, Je JS, Park S, Heilpern D, Lalonde C, Cote LF, Lee B. Lack of effect of lactose digestion status on baseline fecal microflora. *Can J Gastroenterol.* 2009 Nov;23(11):753-9.

Szilagyi A, Shrier I, Heilpern D, Je J, Park S, Chong G, Lalonde C, Cote LF, Lee B. Differential impact of lactose/lactase phenotype on colonic microflora. *Can J Gastroenterol.* 2010 Jun;24(6):373-9.

Szilagyi A, Torchinsky A, Calacone A. Possible therapeutic use of loperamide for symptoms of lactose intolerance. *Can J Gastroenterol.* 2000 Jul-Aug;14(7):581-7.

Suarez FL, Savaiano DA, Levitt MD. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *N Engl J Med.* 1995 Jul; 333: 1–4.

## T

Tasse L, Bercovici J, Pizzut-Serin S, Robe P, Tap J, Klopp C, Cantarel BL, Coutinho PM, Henrissat B, Leclerc M, Doré J, Monsan P, Remaud-Simeon M, Potocki-Veronese G. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Res.* 2010 Nov;20(11):1605-12.

Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van der Meer R. Dietary fructooligosaccharides increase intestinal permeability in rats. *J Nutr.* 2005 Apr;135(4):837-42.

Ten Bruggencate SJ, Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Katan MB, van der Meer R. Dietary fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in healthy men. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1):70-4.

Terry L. Miller, M.J. Wolin. Methanogens in human and animal intestinal Tracts. *Syst Appl Microbiol.* 1986 May;7(3):223-229.

Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev.* 2010 Apr;9(2):107-16.

Tomba C, Baldassarri A, Coletta M, Cesana BM, Basilisco G. Is the subjective perception of lactose intolerance influenced by the psychological profile? *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Oct;36(7):660-9.

Tormo R, Bertaccini A, Conde M, Infante D, Cura I. Methane and hydrogen exhalation in normal children and in lactose malabsorption. *Early Hum Dev.* 2001 Nov;65 Suppl:S165-72.

Torniainen S, Savilahti E, Järvelä I. Congenital lactase deficiency--a more common disease than previously thought?. *Duodecim*. 2009;125(7):766-70.

Treem WR, Ahsan N, Kastoff G, Hyams JS. Fecal short-chain fatty acids in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: In vitro studies of carbohydrate fermentation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996 Oct;23:280-286.

Turkington RW, Brew K, Vanaman TC, Hill RL. The hormonal control of lactose synthetase in the developing mouse mammary gland. *J Biol Chem*. 1968 Jun 25;243(12):3382-7.

Turkington RW, Hill RL. Lactose synthetase: progesterone inhibition of the induction of alpha-lactalbumin. *Science*. 1969 Mar 28; 163(874):1458-60.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 2009 Nov 11;1(6):6ra14.

## V

Van den Abbeele P, Gérard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Kleerebezem M, Zoetendal EG, Smidt H, Verstraete W, Van de Wiele T, Possemiers S. Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ Microbiol*. 2011 Oct;13(10):2667-80.

Vantrappen G, Ghooos Y, Andriulli A. CO<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>-breath tests in the diagnosis of intestinal malabsorption. *Ital J Gastroenterol*. 1992 May;24:212-7.

Vernia P, Camillo MD, Marinaro V, Caprilli R. Effect of predominant methanogenic flora on the outcome of lactose breath test in irritable bowel syndrome patients. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Sep;57(9):1116-9.

Vernia P, Di Camillo M, Foglietta T, Avallone VE, De Carolis A. Diagnosis of lactose intolerance and the "nocebo" effect: the role of negative expectations. *Dig Liver Dis.* 2010 Sep;42(9):616-9.

Vernia P, Di Camillo M, Marinaro V. Lactose malabsorption, irritable bowel syndrome and self-reported milk intolerance. *Dig Liver Dis.* 2001 Apr;33(3):234-9.

Vernia P, Marinaro V, Argnani F, Di Camillo M, Caprilli R. Self-reported milk intolerance in irritable bowel syndrome: what should we believe? *Clin Nutr.* 2004 Oct;23(5):996-1000.

Vesa TH, Lember M, Korpela R. Milk fat does not affect the symptoms of lactose intolerance. *Eur J Clin Nutr.* 1997 Sep;51(9):633-6.

Vesa TH, Marteau PR, Briet FB, Boutron-Ruault MC, Rambaud JC. Raising milk energy content retards gastric emptying of lactose in lactose-intolerant humans with little effect on lactose digestion. *J Nutr.* 1997 Dec;127(12):2316-20.

Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr.* 2000 Apr;19(2 Suppl):165S-175S.

Vonk RJ, Lin Y, Koetse HA, Huang C, Zeng G, Elzinga H, Antoine J, Stellaard F. Lactose (mal)digestion evaluated by the <sup>13</sup>C-lactose digestion test. *Eur J Clin Invest.* 2000 Feb;30(2):140-6.

Vonk RJ, Priebe MG, Koetse HA, Stellaard F, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM, Zhong Y, Huang CY. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *Eur J Clin Invest.* 2003 Jan;33(1):70-5.

Vonk RJ, Stellaard F, Priebe MG, Koetse HA, Hagedoorn RE, De Bruijn S, Elzinga H, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM. The <sup>13</sup>C/<sup>2</sup>H-glucose test for determination of small intestinal lactase activity. *Eur J Clin Invest.* 2001 Mar;31(3):226-33.

Von Tirpitz C, Kohn C, Steinkamp M, Geerling I, Maier V, Möller P, Adler G, Reinshagen M. *J Clin Gastroenterol*. Lactose intolerance in active Crohn's disease: clinical value of duodenal lactase analysis. 2002 Jan;34(1):49-53.

## W

Waligora-Dupriet AJ, Campeotto F, Romero K, Mangin I, Rouzaud G, Ménard O, Suaud A, Soulaines P, Nicolis I, Kapel N, Dupont C, Butel MJ. Diversity of gut Bifidobacterium species is not altered between allergic and non-allergic French infants. *Anaerobe*. 2011 Jun;17(3):91-6.

Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*. 2011 Feb;5(2):220-30.

Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, Walker-Smith JA, Swallow DM. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology*. 1998 Jun;114(6):1230-6.

Wang S, Zhu H, Lu C, Kang Z, Luo Y, Feng L, Lu X. Fermented milk supplemented with probiotics and prebiotics can effectively alter the intestinal microbiota and immunity of host animals. *J Dairy Sci*. 2012 Sep;95(9):4813-22.

Waud JP, Matthews SB, Campbell AK. Measurement of breath hydrogen and methane, together with lactase genotype, defines the current best practice for investigation of lactose sensitivity. *Ann Clin Biochem*. 2008 Jan;45(Pt 1):50-8.

Weijers HA, van de Kamer JH, Dicke WK. Diarrhea caused by deficiency of sugar splitting enzymes. *Acta Paediatr*. 1961 Jan;50:55-71.

van Wering HM, Bosse T, Musters A, de Jong E, de Jong N, Hogen Esch CE, Boudreau F, Swain GP, Dowling LN, Montgomery RK, Grand RJ, Krasinski SD. Complex regulation of

the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Oct;287(4):G899-909.

## **Y**

Yang YJ, Sheu BS. Probiotics-containing yogurts suppress *Helicobacter pylori* load and modify immune response and intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori*-infected children. *Helicobacter.* 2012 Aug;17(4):297-304.

## **Z**

Zecca L, Mesonero JE, Stutz A, Poirée JC, Giudicelli J, Cursio R, Gloor SM, Semenza G. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Lett.* 1998 Sep 18;435(2-3):225-8.

Zhao J, Fox M, Cong Y, Chu H, Shang Y, Fried M, Dai N. Lactose intolerance in patients with chronic functional diarrhoea: the role of small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Apr;31(8):892-900.

Zhong Y, Huang CY, He T, Harmsen HM. Effect of probiotics and yogurt on colonic microflora in subjects with lactose intolerance. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2006 Sep;35(5):587-91.

Zhong Y, Priebe MG, Vonk RJ, Huang CY, Antoine JM, He T, Harmsen HJ, Welling GW. The role of colonic microbiota in lactose intolerance. *Dig Dis Sci.* 2004 Jan;49(1):78-83.

Zhong Y, Yin W, Huang C, Vonk RJ. Study on the expired gas of subjects with lactose intolerance by using H<sub>2</sub>/13CO<sub>2</sub> breath test. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2002 Jun;31(3):180-3.