

Maisons-Alfort, le 23 janvier 2004

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des justificatifs scientifiques concernant les allégations présentes sur l'étiquetage d'un lait fermenté contenant notamment du *Lactobacillus casei* DN-114 001

Par courrier reçu le 12 juin 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 5 juin 2003 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'évaluation des justificatifs scientifiques concernant les allégations présentes sur l'étiquetage d'un lait fermenté contenant notamment du *Lactobacillus casei* DN-114 001.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine » le 20 novembre 2003, l'Afssa rend l'avis suivant :

Considérant que la demande concerne l'évaluation des justifications scientifiques de 10 allégations relatives à un lait fermenté contenant du *Lactobacillus casei* DN-114 001, regroupées ci-dessous en 4 ensembles :

1. aide à renforcer les défenses naturelles
aide votre barrière intestinale à se renforcer
2. aide à la régulation du système immunitaire
contribue au bon fonctionnement du système immunitaire
aide à renforcer le système immunitaire intestinal
3. aide le corps à bien se défendre
contribue à rendre le corps plus résistant
aide à protéger votre corps
4. aide votre intestin à repousser certaines bactéries indésirables
aide votre corps à lutter contre certaines agressions du quotidien ;

Considérant les données générales et sanitaires du produit

Considérant que le produit est obtenu par fermentation du lait par les deux souches bactériennes utilisées dans la fabrication des yaourts : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, auxquelles est ajoutée une autre souche bactérienne originale : *Lactobacillus casei* DN-114 001 ; que les souches utilisées ont toutes le statut de GRAS (Generally Recognised As Safe) ; que le produit est présenté dans des bouteilles de 93,7 mL, soit un poids de 100 g, sous les formes allégée (aux édulcorants), sucrée ou aromatisée à l'orange ; que ce produit présente les exigences réglementaires de sécurité sanitaire ;

Considérant le devenir de *Lactobacillus casei* DN-114 001 dans l'intestin

Considérant que dans une première étude menée chez 4 sujets sains, consistant en une consommation journalière de 300 mL d'un lait fermenté identique contenant un variant de *Lactobacillus casei* DN-114 001 résistant à la rifampicine, un taux de survie de $6,5 \pm 3,5$ % a été observé au niveau idéal ; que dans une deuxième étude réalisée sur 12 volontaires adultes ayant consommé pendant 10 jours 3 bouteilles du produit, *Lactobacillus casei* DN-114 001 est retrouvé dans les fèces des volontaires à des taux stables après 4 jours de consommation jusqu'à la fin de

la période de consommation ; que le taux de survie fécal est estimé à $26,5 \pm 9,5$ % ; que cette différence de taux de survie pourrait s'expliquer soit par des biais méthodologiques de dénombrement au niveau de l'iléon avec sous estimation, soit par une croissance modérée de la bactérie probiotique dans la partie distale de l'intestin ; que ces deux études montrent que l'ingestion de 10^{10} UFC de *Lactobacillus casei* DN-114 001 permet de retrouver une population de 10^6 à 10^7 UFC/g dans le tractus intestinal ; que de telles concentrations permettent de garantir une action métabolique de *Lactobacillus casei* DN-114 001 au niveau de l'intestin grêle et du côlon ; qu'en revanche, ces deux études montrent que les populations de *Lactobacillus casei* DN-114 001 ne sont plus retrouvées quelques jours après l'arrêt de la consommation du produit ; qu'ainsi, *Lactobacillus casei* DN-114 001 est une bactérie de transit qui ne colonise pas le tractus digestif ;

Considérant le référentiel d'évaluation des allégations

Considérant que le pétitionnaire présente un ensemble d'études *in vitro* (modèles cellulaires), *in vivo* (chez le rat et la souris) ; que les résultats d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* constituent des axes de recherche permettant d'avancer des hypothèses sur les propriétés et les mécanismes d'action du produit testé ; que, malgré leur prise en compte dans l'évaluation scientifique, ces résultats ne sont en aucun cas suffisants pour la justification scientifique des allégations se rapportant à l'homme ;

Considérant que le pétitionnaire apporte également des études cliniques menées sur des nourrissons et enfants en bas âge, des étudiants, des sportifs et des personnes âgées ; que seules ces études cliniques pourront être réellement utilisées comme preuves permettant de confirmer ou d'infirmer les allégations proposées, à condition d'être réalisées sur un nombre suffisant de sujets et dans des conditions proches des recommandations de consommation proposées par le pétitionnaire ;

Considérant l'analyse des études et des allégations proposées par le pétitionnaire

Considérant que l'administration chez des rats à flore humaine, de lait (L), de yaourt (Y), de lait fermenté par *Lactobacillus casei* DN-114 001 seul (LFLc) ou d'un lait fermenté par *Lactobacillus casei* DN-114 001 et des cultures de yaourt (LFLcY), montre une augmentation significative des acides gras à courtes chaînes (AGCC) (acétate et propionate) dans le groupe LFLcY, ainsi qu'une augmentation significative de la flore bifide dans le groupe LFLc ;

Considérant qu'une étude menée sur 265 nourrissons et enfants en bas âge d'âge moyen $18,9 \pm 6$ mois consommant, 5 jours par semaine, durant 6 périodes d'une durée de 1 mois, 125 g ou 250 g (selon l'âge) ou du lait gélifié (JM), ou du yaourt (Y) ou du yaourt additionné de *Lactobacillus casei* DN-114 001 (YLc) ; que pendant l'étude, 69 enfants ont présenté des épisodes de diarrhée ; qu'aucune différence significative du nombre d'enfants atteints n'a été observée entre les 3 groupes ; qu'en revanche, la durée des épisodes de diarrhée (observée sur 6 mois) est significativement plus courte chez le groupe YLc par rapport au groupe JM et que la durée moyenne d'un épisode de diarrhée est significativement plus courte chez les groupes Y et YLc ; qu'un autre travail effectué sur une population de 928 nourrissons et enfants en bas âge, âgés de 6 à 24 mois, répartis en 2 groupes consommant 2 fois par jour 100 g de yaourt (Y) ou de yaourt additionné de *Lactobacillus casei* DN-114 001 (YLc), sur une période de 12 semaines ; que 148 enfants ont présenté un épisode de diarrhée ; que le nombre d'enfants diarrhéiques a été significativement plus faible dans le groupe YLc (15,9 %) que dans le groupe Y (22 %) pendant la période de supplémentation ; que cette différence n'est plus significative après la période de consommation des produits ; que cette étude ne montre pas de différence significative en ce qui concerne la durée des épisodes de diarrhée ; que ces deux études ne donnent pas de résultats concordants : pour la première on observe une diminution de la sévérité des épisodes de diarrhée non retrouvée dans la deuxième et pour la seconde, on constate une diminution de l'incidence des diarrhées pendant la période de supplémentation, baisse non significative pour la première étude ; que cependant ces résultats combinés à l'augmentation de la flore bifide et des AGCC chez le rat à flore humaine, suite à l'administration du produit ou d'un yaourt fermenté contenant *Lactobacillus casei* DN-114 001, sont un ensemble d'éléments susceptibles de participer au renforcement des défenses naturelles de l'organisme ;

Considérant la revendication de l'allégation « aide votre barrière intestinale à se renforcer » ; que le pétitionnaire définit les fonctions liées au concept de barrière intestinale comme étant « l'équilibre (composition, métabolisme) de la flore intestinale endogène, l'intégrité et la trophicité de l'épithélium intestinal et du mucus et la régulation du système immunitaire muqueux et systémique » ; que l'insuffisance des données cliniques présentées par le pétitionnaire ne permet pas de justifier l'allégation ;

Considérant :

- que 3 études réalisées *in vitro* sur des cellules intestinales prélevées sur des muqueuses de sujets atteints de la maladie de Crohn ou enflammées par une agression bactérienne montrent que leur co-culture avec *Lactobacillus casei* DN-114 001 entraîne une diminution significative de la production de TNF α , d'IL8 et IL10 (cytokines impliquées dans les mécanismes de l'inflammation), du taux des lymphocytes CD4, et dans une moindre mesure des lymphocytes CD3 et CD25 ; qu'en outre, une substance (non identifiée) produite par *Lactobacillus casei* DN-114 001 diminue dans des cellules épithéliales infectées par *Shigella flexneri* la réaction inflammatoire par inhibition de la voie NF- κ B ;

- que l'administration intragastrique du produit à des souris hypersensibilisées par application de DNFB (dinitrofluorobenzène) a montré une inhibition de 50 % de l'intensité de la réaction inflammatoire ; que cette inhibition de la réponse inflammatoire serait due aux lymphocytes T CD8+ par action du produit sur les cellules T CD4+ régulatrices ; que chez des souris infectées par *Salmonella Typhimurium* consommant le produit, le taux de mortalité passe de 100 % à 20 % ;

- que la consommation quotidienne de 500 mL du produit pendant 30 jours par 99 sportifs entraîne une diminution moindre des cellules immunitaires non spécifiques NK (Natural Killer) circulantes ; que la consommation journalière de 200 mL du produit par 75 étudiants (contre 63 consommant du lait) en période d'examens universitaires est source d'une augmentation du nombre de lymphocytes totaux et d'une dépression moindre du nombre de cellules NK exprimant l'antigène de différenciation CD56 ;

que les études *in vitro* semblent montrer que *Lactobacillus casei* DN-114 001 régule la production de marqueurs de l'inflammation intestinale ; que d'après les études menées sur la souris, la souche *Lactobacillus casei* DN-114 001 paraît exercer un effet immunomodulateur ; qu'en revanche, la moindre diminution des cellules NK dans des populations soumises à un stress physique (sportifs) ou psychologique (étudiants) induit par la consommation du produit, ne permet pas de conclure que le produit module le système immunitaire intestinal ou systémique ; qu'en effet, la variation du nombre de cellules NK ne peut être, au mieux, qu'un marqueur parmi d'autres de l'état du système immunitaire d'un organisme ; qu'il n'est alors pas possible d'interpréter les variations de ces cellules comme ayant un rôle bénéfique dans la réponse immunitaire de l'organisme à un stress ; que malgré les données expérimentales convaincantes relatives aux propriétés de *Lactobacillus casei* DN-114 001 sur la modulation et la régulation de certains paramètres de la réponse immunitaire, les résultats cliniques sont parcellaires et insuffisants pour démontrer l'effet du produit sur le système immunitaire ; qu'en conséquence, les allégations « aide à la régulation du système immunitaire », « contribue au bon fonctionnement du système immunitaire » et « aide à renforcer le système immunitaire intestinal » sont en l'état inacceptables ;

Considérant que les allégations « aide le corps à bien se défendre », « contribue à rendre le corps plus résistant » et « aide à protéger votre corps » sont proposées par le pétitionnaire ; que le terme « corps », est utilisé au sein d'allégations qui font référence à des avantages d'ordre général et non spécifique ; que le caractère imprécis et global de ces allégations les rend invérifiables et injustifiables ;

Considérant qu'une étude a été réalisée chez 360 personnes âgées de plus de 60 ans, séparées en 2 groupes parallèles : l'un recevant quotidiennement 2 fois 100 mL de produit et l'autre ne recevant aucun produit, pendant 3 semaines ; que, pendant l'étude, 82 % des sujets étaient vaccinés contre la grippe ; que les résultats montrent qu'au sein de la population totale de l'étude, la consommation du produit a été associée à une durée des pathologies significativement inférieure de 20 % par rapport au groupe témoin ; qu'en revanche, l'effet significatif du produit sur la durée des pathologies disparaît lorsque l'on considère les sous-populations vaccinées et non

vaccinées ; que relativement aux études menées sur les nourrissons et enfants en bas âge, mentionnées ci-dessus, le pétitionnaire estime que l'implication de Rotavirus est « vraisemblable car le Rotavirus est un facteur étiologique important des diarrhées infantiles infectieuses » ; que le pétitionnaire n'a fourni aucun résultat d'analyse permettant de démontrer une éventuelle responsabilité du Rotavirus dans les diarrhées des nourrissons des 2 études ; que sur la base de ces études cliniques, celle réalisée sur les sportifs et les expérimentations *in vitro* et *in vivo*, le pétitionnaire souhaite revendiquer les allégations « aide votre intestin à repousser certaines bactéries indésirables » et « aide votre corps à lutter contre certaines agressions du quotidien » ; que l'imprécision des termes « certaines » et « agressions du quotidien » utilisés au sein des allégations est un obstacle à la bonne compréhension de ces messages ; qu'en outre, les effets suggérés reposent sur un rationnel scientifique parcellaire et insuffisant ; qu'en conséquence, ces deux allégations ne sont en l'état pas acceptables,

L'Afssa estime que :

- Le pétitionnaire présente un ensemble de résultats d'études *in vitro* et *in vivo* qui permet de montrer que la souche *Lactobacillus casei* DN-114 001 a des effets sur la flore intestinale, les cellules épithéliales et sur quelques paramètres du système immunitaire muqueux et intestinal ;
- Les résultats des études disponibles ne permettent pas de démontrer tous les effets allégués du produit chez l'homme. En effet, malgré un faisceau d'arguments apporté par les résultats parcellaires des études cliniques réalisées chez l'adulte et les personnes âgées et par les résultats relatifs à l'effet du produit sur la sévérité et l'incidence des diarrhées des nourrissons et enfants en bas âge, l'absence de concordance des conclusions de ces dernières études ne permet pas d'assurer que ces effets peuvent être aujourd'hui considérés comme vérifiés ;
- La quantité recommandée (100 mL/j) et les doses 2 à 5 fois supérieures (chez l'homme adulte ou l'enfant) proposées dans les études cliniques ne sont pas comparables ;
- Les 9 allégations « aide votre barrière intestinale à se renforcer », « aide à la régulation du système immunitaire », « contribue au bon fonctionnement du système immunitaire », « aide à renforcer le système immunitaire intestinal », « aide le corps à bien se défendre », « contribue à rendre le corps plus résistant », « aide à protéger votre corps », « aide votre intestin à repousser certaines bactéries indésirables », « aide votre corps à lutter contre certaines agressions du quotidien » sont soit imprécises, soit non justifiées scientifiquement ;
- L'allégation « participe à renforcer les défenses naturelles de l'organisme », remplaçant l'allégation « aide à renforcer les défenses naturelles », est justifiée.

L'Afssa souhaite également faire les recommandations suivantes :

- o Il conviendrait de mentionner sur l'étiquetage que « l'effet bénéfique attendu n'est scientifiquement prouvé que pendant la prise du produit et cesse très vite dès son arrêt » ;
- o Le pétitionnaire fait apparaître dans certains documents de présentation du produit que celui-ci « convient à partir de 3 ans » alors que les études cliniques effectuées sur les jeunes enfants concernent des enfants de moins de 3 ans. Si le pétitionnaire souhaite positionner son produit avant cet âge, des études complémentaires seront nécessaires ;
- o Il serait judicieux de définir, pour chaque catégorie de population, les doses optimales permettant d'observer les effets annoncés par l'allégation.

Martin HIRSCH