

**Lignes directrices sur
l'utilisation des probiotiques
dans les compléments alimentaires**



synadiet

Lignes directrices sur l'utilisation des probiotiques dans les compléments alimentaires (CA)

Introduction

Le présent document a pour objectif de définir les lignes directrices permettant une mise en œuvre efficace, fiable et sécuritaire des probiotiques dans les compléments alimentaires. Il fournit des recommandations sur la sélection et la caractérisation des souches, l'innocuité, la stabilité, les bonnes pratiques de fabrication et l'étiquetage des CA contenant des probiotiques.

Il a été établi par Synadiet, le syndicat national français des compléments alimentaires et présenté à la DGCCRF. Il n'a pas de caractère légal mais consiste en un guide de recommandations à l'usage des opérateurs du secteur des CA (fournisseurs de souches, fabricants, distributeurs, etc..) visant à maîtriser leurs formulations et les conditions de fabrication de leurs produits.

Définitions

Compléments alimentaires : « les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés »¹

Probiotiques : Définition telle que recommandée par FAO/OMS (2001/2002)² : « Microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. ».

Classification et dénomination : Les probiotiques étant des microorganismes, ils sont classés en taxons selon le Code international de nomenclature. Leur classification se fait par genre puis par espèce et parfois sous-espèce (subsp).

Ex :

Bifidobacterium animalis subsp *lactis*

Lactobacillus paracasei subsp *paracasei*

Bifidobacterium longum subsp *infantis*.

Pour désigner toutes les espèces d'un genre, le nom du genre est suivi de spp.

Une souche est la variante génétique d'une espèce. Les propriétés d'un probiotique sont portées par une souche

donnée, non pas par l'espèce et encore moins par le genre. Les souches sont identifiées par une référence propre au fabricant de souche.

L'appartenance d'une souche isolée à un genre, sans précision de l'espèce, est notée du nom du genre suivi de sp. (species) tant que l'isolat n'est pas identifié à une espèce.

Les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection de cultures reconnue à l'échelon international ayant le statut d'autorité de dépôt internationale selon le traité de Budapest du 28 avril 1977.

Les définitions suivantes ne sont pas exclusives, une entreprise peut être uniquement l'un de ces acteurs ou plusieurs ou assurer l'ensemble des étapes.

Producteur de souche(s) : entreprise qui réalise la production de souches de probiotiques depuis la culture des souches jusqu'à leur broyage. L'ingrédient obtenu contenant des souches (seules ou en mélange) est prêt à être mis en œuvre par le Fabricant de CA.

Fabricant de CA : entreprise qui réalise la fabrication industrielle du complément alimentaire.

Responsable de la mise sur le marché : Entreprise qui appose son nom sur l'étiquetage et qui est responsable de la déclaration du complément alimentaire sous TéléIcare.

Distributeur : entreprise qui va distribuer le complément alimentaire.

1) Sélection des souches

Les principaux probiotiques utilisés dans les CA appartiennent aux espèces ou sous-espèces suivantes (liste non exhaustive):

* **Bactéries à gram positif ne formant pas de spores :**

- **Genre *Lactobacillus*^a** : *L. acidophilus*, *L. brevis lactobacillus*, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*,

- **Genre *Lactococcus*** : *L. lactis*

- **Genre *Bifidobacterium*** : *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. animalis* subsp *lactis*, *B. longum*.

- **Genre *Streptococcus*** : *S. thermophilus*

^a Evolution de la taxonomie du genre *Lactobacillus*, se référer à l'annexe 1.

- Genre *Pediococcus* : *P. acidilactici*

- Genre *Propionibacterium* : *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*

* Bactéries à gram positif sporulées :

- Genre *Bacillus* : *B. subtilis*, *B. coagulans*,

* Levures :

- Genre *Saccharomyces* : *S. Cerevisiae*, *S. Cerevisiae* var. *bouardii*

- Genre *Kluyveromyces* : *K. lactis*

• Autorisation d'emploi

Les probiotiques peuvent être autorisés dans les compléments alimentaires en tant qu'ingrédients ayant un effet nutritionnel ou physiologique.

Il n'existe pas à ce jour, dans les réglementations française et européenne, de liste positive d'espèces ou de souches autorisées.

Il est de la responsabilité du responsable de la mise sur le marché de justifier l'autorisation d'emploi des souches employées afin de garantir au consommateur un produit sûr et sain.

L'autorisation d'emploi d'une souche probiotique doit être justifiée par :

(1) la caractérisation des souches employées

(2) leur innocuité

(3) le caractère non *Novel food* (micro-organismes justifiant d'un historique de consommation antérieur au 15 mai 1997) ou une autorisation *Novel food* selon le règlement UE 2015/2283³.

Compte tenu des aspects de confidentialité et de propriété des données, le metteur sur le marché n'est pas dans l'obligation de détenir toutes les informations mais, le cas échéant, il doit obtenir l'engagement des producteurs de souches de détenir ces justifications et de mettre ces informations à disposition des autorités en cas de besoin.

• Caractérisation taxonomique de l'espèce et de la souche

Les souches doivent être caractérisées au niveau phénotypique et génotypique dans le but de justifier leur identification.

Caractérisation phénotypique:

Exemples de méthodes d'identification phénotypique :

- Observation de la morphologie des colonies et de la morphologie cellulaire par microscopie
- Coloration Gram
- Tests biochimiques : profil d'activités enzymatiques, profil glucidique de fermentation...

Caractérisation génotypique :

Le séquençage et l'annotation complète du génome sont indispensables à la caractérisation.

Une combinaison de différentes méthodes d'analyse phénotypique et génotypique pourra être utilisée pour confirmer la caractérisation :

Exemples d'autres tests d'identification génotypiques :

- Séquençage et annotation complète du génome
- PCR spécifique à l'espèce (insuffisant seul)
- Rep-PCR
- RAPD-PCR
- MLST (séquençage multi-locus)
- Hybridation ADN-ADN
- Séquençage de l'ARN ribosomique 16S
- ARDRA (Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomique amplifié)
- PFGE (Electrophorèse en champ pulsé)
- AFLP (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)

• Innocuité de la souche

Chaque producteur de souche probiotique doit être capable de garantir que celle-ci ne présente aucun risque de toxicité pour le consommateur.

En 2007, l'EFSA a mis à disposition des industriels de l'alimentation humaine et animale une liste d'espèces de microorganismes basée sur le concept de présomption d'innocuité reconnue : « *Qualified Presumption of Safety / QPS* »^{4,5}. Les espèces listées sont reconnues pour leur sécurité d'emploi dans l'alimentation humaine sur la base d'une caractérisation poussée des souches et d'un historique d'utilisation chez l'homme.

L'approche *Qualified Presumption of Safety* (QPS) évalue l'innocuité d'un groupe taxonomique défini (genre

ou espèce, par exemple) sur la base de l'identification, l'état des connaissances (caractéristiques, physiologie, génétique, habitat, historique d'utilisation), la pathogénicité (problèmes de sécurité avérés, facteurs de virulence, maîtrise de la pathogénicité, absence de transfert de résistance et/ou résistance non-naturelle aux antibiotiques) et l'usage final prévu. Cette liste QPS répertorie des espèces sans danger pour la consommation humaine et spécifie que toute souche dont l'identité pourrait être établie sans ambiguïté et assignée à un groupe QPS sont exemptées d'évaluation de sécurité et présumées sûres pour la consommation humaine. Un antibiogramme doit cependant être réalisé pour démontrer l'absence de résistance aux antibiotiques :

- S'il n'y a pas de résistance atypique, la souche est considérée comme sûre.
- S'il existe une résistance atypique, il faut alors démontrer l'absence de transférabilité du ou des gènes responsables de cette résistance.

En cas d'utilisation de souches qui n'ont pas le statut QPS, une évaluation complète de la sécurité doit alors être préalablement effectuée sur la base des critères d'évaluation QPS.

● Viabilité des souches

Les microorganismes probiotiques étant très sensibles, la production des souches doit mettre en œuvre une méthode de préparation adéquate. La protection pourra également être augmentée par différents procédés comme la micro-encapsulation. La viabilité de souches doit être assurée tout au long de leur durée de vie.

Les procédés de préparation mis en œuvre doivent permettre à une quantité significative de souches probiotiques de survivre et d'atteindre leur site d'action après ingestion. La capacité de survie des probiotiques au cours du transit dépend du microorganisme (genre, espèce, souche), du vecteur galénique avec lequel le microorganisme est ingéré et des facteurs liés à l'hôte.

Pour justifier cela, des données de tests *in vitro* (résistance à l'acidité gastrique et aux acides biliaires, adhérence au mucus et/ou à des cellules épithéliales humaines) sont acceptables. Les méthodes de dénombrement des cellules probiotiques varient bien évidemment selon les espèces.

● Caractérisation fonctionnelle

Selon FAO/OMS (2001/2002)^{6,2}, les microorganismes sont considérés comme probiotiques s'ils sont

scientifiquement documentés. Le niveau de documentation scientifique, au niveau de l'espèce ou de la souche, dépendra de la représentation souhaitée du produit et des implications réglementaires résultantes.

Une étude bibliographique des espèces utilisées et idéalement des souches employées viendra appuyer leurs effets nutritionnels et physiologiques.

Des tests directement liés au bénéfice ciblé pourront compléter le dossier.

2) Formulation des CA à base de probiotiques

● Dosage

Comme pour tout ingrédient à but nutritionnel ou physiologique, des justifications sont attendues par les autorités sur le choix des doses de souches probiotiques au regard des données disponibles concernant leurs effets nutritionnels ou physiologiques.

Considérant les données scientifiques communément admises^{7, 8, 9}, il est recommandé qu'un complément alimentaire apporte un minimum de 10^7 à 10^9 cellules vivantes d'une souche par jour, de manière à permettre à une quantité significative de souches vivantes d'atteindre le tractus gastro-intestinal.

En revanche, toute dose inférieure sera soutenue par des données scientifiques, y compris cliniques.

Le surdosage est souvent nécessaire selon la forme galénique pour garantir la quantité de probiotiques étiquetée à la date de durabilité minimale indiquée. Il n'y a pas, à notre connaissance, de limite déterminée pour le surdosage, ni de tolérances définies par les autorités françaises sur les quantités étiquetées. Il est important de noter que le surdosage, aussi élevé soit-il, n'entraîne pas de risque additionnel lié à la sécurité, et est nécessaire pour rencontrer la quantité étiquetée. A titre tout à fait indicatif, l'autorité de santé italienne a fixé une tolérance de +/- 0,5 log pour l'incertitude de mesure⁷ et les autorités canadiennes acceptent une tolérance de 20% en moins à la date de durabilité minimale par rapport à la quantité étiquetée^{9, 10}.

● Vérification de la stabilité des souches au sein de la formulation.

Il est important de s'assurer que la ou les souches entrant dans la composition du complément alimentaire n'interagissent pas avec les autres ingrédients, le cas échéant. Pour cela, des tests de contacts peuvent être réalisés afin de vérifier que l'ajout d'ingrédient n'a pas d'effet sur la viabilité du/des probiotique(s). Il s'agit de mettre en contact la souche avec le mélange et au besoin avec des ingrédients individuellement, à titre d'exemple :

en faisant vieillir au minimum 7 jours à température ambiante dans le conditionnement primaire prévu pour le produit et en vérifiant si l'ajout de l'ingrédient ou du mélange d'ingrédients a un effet sur la quantité de souche. Cela sera vérifié par dénombrement en comparaison à un témoin sans ajout d'ingrédient(s).

● Choix de galénique et conditionnement

Le choix de la forme galénique du CA, du type de conditionnement et des matériaux d'emballage doit être adapté pour contribuer à protéger, stabiliser et conserver la/les souche(s) au regard des conditions de stockage et des conditions de conservation préconisées sur l'emballage.

3) Bonnes Pratiques de Fabrication

Dans le but de garantir la qualité du produit fini, tout fabricant de CA doit apporter la preuve de la maîtrise du procédé de fabrication jusqu'au produit fini. Outre les bonnes pratiques de fabrication des CA selon la Charte Qualité Synadiet¹¹, la fabrication de CA à base de probiotiques nécessite l'application des mesures suivantes :

● Maîtrise des conditions de température et d'humidité

Les probiotiques sont sensibles à l'humidité ainsi qu'à la température et plus particulièrement aux variations des conditions externes. Ils se revivifient dès qu'ils ont un peu d'eau disponible mais meurent en l'absence de nutriments. C'est pourquoi, les fabricants de CA à base de probiotiques doivent respecter les conditions de stockage propres aux souches utilisées (spécifiées par les producteurs de souches), évaluer et maîtriser les conditions de température et d'humidité adaptées à la formulation depuis la mise en œuvre des souches jusqu'à la livraison du produit fini au client, afin de garantir la quantité de souches figurant sur l'étiquetage du produit fini jusqu'à la fin de la date de durabilité minimale. Certains probiotiques et/ou formes galéniques peuvent être plus sensibles. C'est la responsabilité du fabricant de déterminer les mesures de suivi et/ou de contrôles selon le besoin.

A cet effet, un plan contrôle des produits finis à base de probiotiques doit être mis en place et inclure des analyses en fin de production pour vérifier que le produit rencontre les spécifications approuvées. Des mesures de vérifications en cours de production peuvent aussi compléter les analyses de libération du lot. Le

fabricant de CA devra définir une fréquence pertinente pour ces autocontrôles.

Des recommandations de conservation devront également être établies et des mentions particulières liées au respect des conditions de conservation devront figurer sur les fiches techniques du CA, sur les documents de livraison et sur les étiquettes et packs produits de façon à ce que les points de vente et les consommateurs soient informés et respectent ces conditions de conservation.

● Détermination de la durée et des conditions de conservation

La durée et les conditions de conservation du CA à base de probiotiques peuvent être, dans un premier temps, présumées sur la base (1) des données de stabilité disponibles pour les souches, (2) des données de stabilité disponibles pour des produits finis similaires, (3) des résultats des tests de contacts (4) du surdosage éventuellement appliqué. Cela peut être suffisant pour la mise sur le marché.

Il est recommandé de lancer en parallèle des tests de stabilité en temps réel. Ces tests doivent être réalisés dans les conditions de conservation qui figurent - ou figureront - sur l'étiquetage du CA et dans le conditionnement final prévu. Ces conditions de conservation peuvent être déterminées selon les lignes directrices ICH¹² :

- Cas général : température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 60% d'humidité relative $\pm 5\%$ ou température de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 65% d'humidité relative $\pm 5\%$
- Produits à conserver au réfrigérateur : température de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

Les résultats des tests de stabilité doivent conclure à une stabilité de 100% (\pm l'incertitude de mesure) des quantités de probiotiques étiquetées à la fin de durée de conservation.

● Méthode d'analyse

A ce jour il n'y a pas de méthodes de références pour la quantification des probiotiques. Celles classiquement utilisées sont :

- le dénombrement des colonies suite à une mise en culture sur milieux sélectifs spécifiques aux probiotiques employés
- la cytométrie de flux,
- la q-PCR

En routine, le dénombrement sur milieu sélectif reste la technique la plus employée.

● Etiquetage

Sans préjudice du Règlement (UE) 1169/2011¹³, de la Directive 2002/46/CE¹ et du Décret de transposition n°2006-352¹⁴, il convient d'appliquer les spécificités d'étiquetage suivantes pour les CA à base de probiotiques :

- Nom de catégorie: Si ces lignes directrices sont respectées, le nom de catégorie « probiotiques » peut être apposé sur l'étiquetage du produit fini afin d'éclairer le consommateur.*

** Attention ce point est en cours de négociation auprès des autorités. A date, le terme probiotiques est considéré par les autorités françaises comme une allégation de santé non autorisées. Synadiet a transmis les guidelines à la DGCCRF et est en cours de discussions afin d'obtenir l'autorisation de ce terme sur l'étiquetage.*

- Liste des ingrédients : La désignation du genre et de l'espèce est mentionnée en italique dans la liste des ingrédients. La référence de la souche peut y être également précisée.

- Quantité de microorganismes :

- La quantité de microorganismes est exprimée en unités formant colonie (UFC) par dose journalière recommandée.
- La quantité étiquetée correspond à la quantité garantie à la date de durabilité minimale indiquée.

L'indication de la quantité de microorganismes peut représenter la quantité totale de probiotiques, toutes souches confondues, avec les souches listées par ordre décroissant selon le ratio déterminé au moment de formulation, et/ou les quantités de souche individuellement, si applicable.

En l'absence d'information de la part des autorités européennes d'une tolérance appliquée aux quantités étiquetées et considérant la spécificité des probiotiques, nous préconisons l'application d'une tolérance en moins de 20% à la date de durabilité minimale par rapport à la quantité étiquetée⁹. Au vu de la nécessité de surdosage souche dépendante, il n'y a pas lieu de fixer une limite maximale de tolérance.

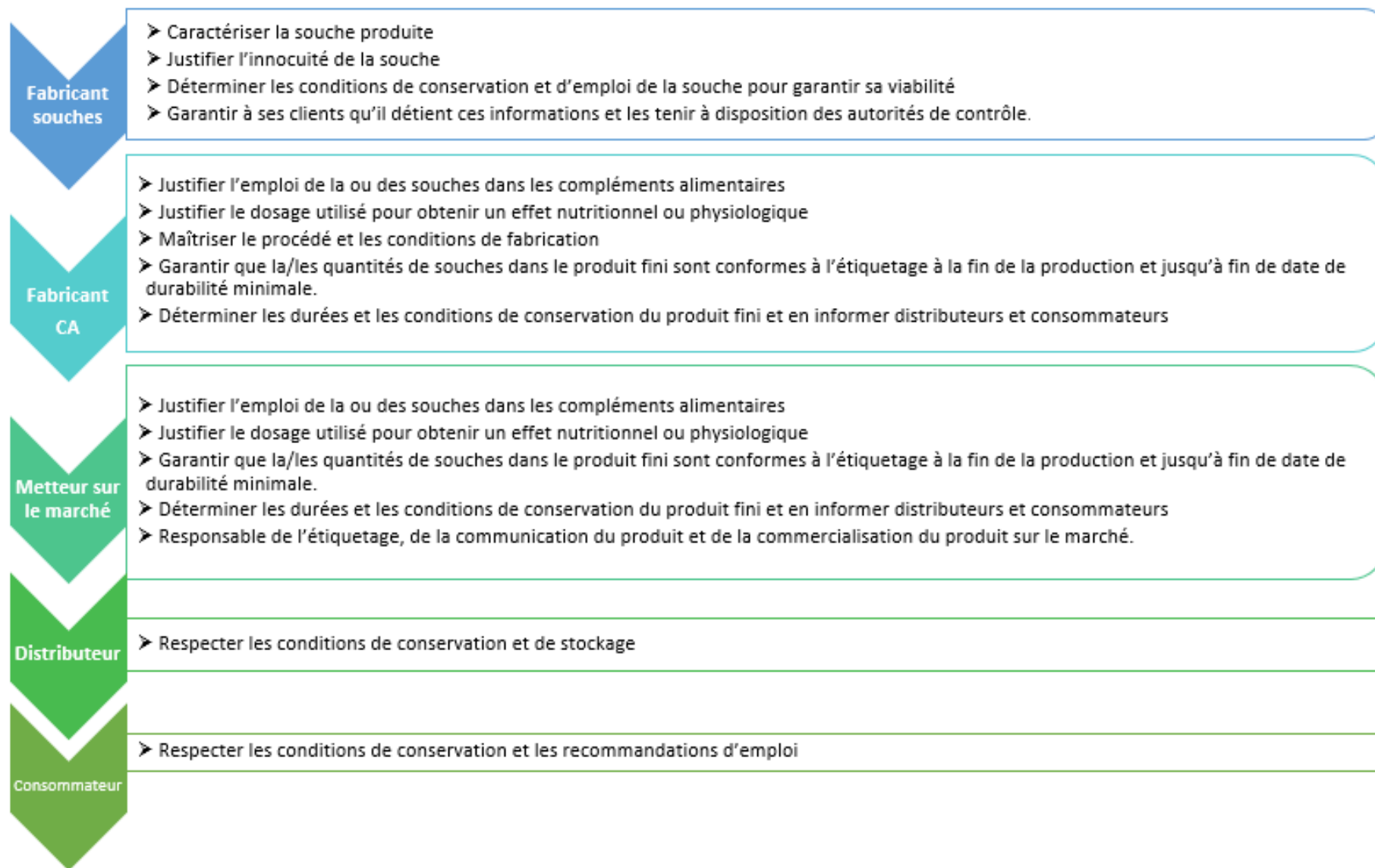
- Recommandations de conservation : Elles doivent absolument figurer sur l'étiquetage afin de permettre une bonne conservation du produit par la chaîne de distribution et le consommateur.

Le bon respect de ces lignes directrices permettra d'assurer la qualité, l'efficacité et la sécurité des CA à base de probiotiques.

La responsabilité est partagée entre les différents intervenants considérant leur spécialité et leur niveau d'intervention, selon le schéma récapitulatif suivant :

Conclusion

UTILISATION DES PROBIOTIQUES DANS LES COMPLEMENTS ALIMENTAIRES



Références

1. Directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires
2. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
3. Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatif aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 1852/2001 de la Commission
4. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. Opinion of the Scientific Committee. EFSA Journal (2007) 587, 1-16
5. EFSA. The 2019 updated list of QPS status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments. EFSA Journal 2020;18(2):5966
6. FAO/OMS Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001.
7. Linee Guida Su Probiotici e Prebiotici. Ministero della Salute Revisione marzo 2018
8. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. AFSSA Février 2005
9. Natural Health Product Probiotics. Santé Canada 25 mars 2019
10. Quality of Natural Health Products Guide. Health Canada, May 1, 2015.
11. Charte de qualité et Référentiel qualité relatifs aux compléments alimentaires. Synadiet Avril 2015
12. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2) 6 Current Step 4 version february 2003
13. Règlement (UE) 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) no 1924/2006 et (CE) no 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) no 608/2004 de la Commission.
14. Décret n°2006-352 du 20 mars 2006 relatif aux compléments alimentaires.
15. Règlement (CE) 1924/2006 du Parlement européen et du Conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires

Annexe 1 : Evolution de la taxonomie du genre *Lactobacillus*

Suite à l'évolution de la taxonomie du genre *Lactobacillus*, qui a été divisé en 25 nouveaux genres (Zheng *et al.*, 2020)^b, l'EFSA a précisé, dans leur révision de la liste QPS pour les microorganismes^c, que : « pour maintenir la continuité au sein de la liste QPS, toutes les souches appartenant à une espèce de *Lactobacillus* seront transférées à la nouvelle espèce. Les anciens et nouveaux noms seront conservés. »

Le tableau suivant établit la correspondance entre les anciennes et les nouvelles désignations des espèces listées à titre d'exemple dans la section 1. *Sélection des souches* (Liste non-exhaustive).

Ancienne dénomination	Nouvelle dénomination
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii subps bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subps bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>

^b Zheng *et al.* 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

^c EFSA. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. EFSA Journal 2020;18(7):6174