



**Rapport du groupe de travail
« Alimentation infantile et modification
de la flore intestinale »**

-Juin 2003-

Membres du groupe de travail

■ Membres du comité d'experts spécialisé « Nutrition humaine »

Mme C. Cherbut (Présidente)
M. B. Beaufrère
M. J. Ghisolfi
M. D. Turck
M. M. Vidailhet

■ Autres experts

M. J.-P. Chouraqui (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble)
M. G. Corthier (INRA de Jouy-en-Josas)
M. J. Doré (INRA de Jouy-en-Josas)
M. P. Marteau (Hôpital européen Georges Pompidou)

■ Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

M. J.-L. Berta
Mme C. Danan
Mme L. Razanamahefa
Mme I. Vanrullen

■ Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

Mme D. Baelde
M. G. Cousyn

■ Représentants de l'industrie auditionnés :

M. C. Gontier (Société Blédina)
Mme. F. Rochat (Société Nestlé)
M. P. Van Dael (Groupe Numico)

Sommaire

I-	INTRODUCTION.....	5
	a. Saisine	5
	b. Cadre général de la réflexion et objectifs du groupe de travail.....	5
	c. Méthodologie de travail.....	6
II-	DEFINITIONS	6
	a. Santé.....	6
	b. Probiotiques.....	6
	c. Prébiotiques.....	7
	d. Symbiotiques.....	7
	e. Micro-organismes tués.....	7
	f. Notions de souches, d'espèces, de genres bactériens.....	8
	g. Colonisation, implantation, prolifération, survie.....	8
	h. Notions de dominance et sous-dominance.....	8
III-	EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET AUTRES INGREDIENTS DESTINES A MODIFIER LA FLORE INTESTINALE CHEZ LE NOURRISSON ET LE JEUNE ENFANT.....	9
	a. La flore intestinale du nouveau-né et du jeune enfant.....	9
	i. Méthodes de caractérisation.....	9
	ii. Composition.....	10
	b. Les activités bactériennes coliques chez le nouveau-né et le jeune enfant.....	12
	i. La fermentation des glucides.....	12
	ii. Activités enzymatiques non fermentaires.....	13
	c. Digestion du lactose.....	14
	d. Balance hydrique et absorption des minéraux.....	14
	e. Transit intestinal, nombre et caractéristiques des selles.....	15
	f. Barrière épithéliale intestinale: facteurs non immunologiques.....	15
	g. Immunité systémique et intestinale.....	16
IV-	EFFETS CLINIQUES "PREVENTIFS" ET CURATIFS DES PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET AUTRES INGREDIENTS DESTINES A MODIFIER LA FLORE INTESTINALE CHEZ LE NOURRISSON ET LE JEUNE ENFANT.....	18
	a. Allergies.....	18
	b. Diarrhées infectieuses.....	19
	c. Autres infections.....	20
	d. Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	21
	e. Entérocolite nécrosante	21
V-	INTERET DE L'UTILISATION DES PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET AUTRES INGREDIENTS DESTINES A MODIFIER LA FLORE INTESTINALE CHEZ LE NOURRISSON ET LE JEUNE ENFANT EN BONNE SANTE.....	21
VI-	SECURITE D'EMPLOI DES PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET AUTRES INGREDIENTS DESTINES A MODIFIER LA FLORE INTESTINALE DANS L'ALIMENTATION DU NOURRISSON ET DU JEUNE ENFANT.....	22
	a. Les problèmes rencontrés ou possibles.....	22
	i. Allergie.....	22
	ii. Résistance aux antibiotiques.....	22
	iii. Infections.....	23
	iv. Diarrhée osmotique.....	23
	v. Douleurs abdominales.....	24
	b. Les groupes potentiellement à risque.....	24
	c. Les tests préconisés	24

d.	La mise en place d'une veille.....	24
VII-	LIGNES DIRECTRICES POUR L'UTILISATION DE PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET AUTRES INGREDIENTS DESTINES A MODIFIER LA FLORE INTESTINALE, DANS DES PREPARATIONS POUR NOURRISSONS ET DE SUITE.....	25
a.	Sélection, classification et identification des souches probiotiques.....	25
b.	Procédés d'obtention et caractérisation des prébiotiques.....	25
c.	Sécurité d'emploi	25
d.	Conservation des préparations et recommandations d'utilisation.....	26
e.	Démonstration des effets physiologiques et cliniques.....	26
	i. Groupes ciblés, environnement, nombre d'enfants à inclure.....	26
	ii. Protocole de l'étude.....	26
	iii. Doses et mode d'administration.....	26
	iv. Choix des critères principaux et des biomarqueurs.....	27
	v. Nombre d'études indépendantes.....	27
	vi. Recherche des mécanismes d'action.....	27
	vii. Présentation des résultats.....	27
f.	Etiquetage.....	27
g.	Communication sur les produits.....	27
h.	Suivi après la mise sur le marché.....	28
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	29
	ANNEXES.....	37

a. Saisine

Devant le constat de la mise sur le marché d'un nombre croissant de préparations lactées pour nourrissons et de préparations de suite contenant des ingrédients à visée prébiotique et probiotique, dans l'objectif de se rapprocher des propriétés fonctionnelles du lait maternel, la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) d'une demande d'appui technique relative à « *l'impact sur la santé des nourrissons et des jeunes enfants du développement de l'incorporation de prébiotiques et de probiotiques dans les aliments lactés diététiques qui leur sont spécifiquement destinés* ».

Par ailleurs, la Commission européenne, dans le cadre des travaux de révision de la directive 91/321/CEE du 14 mai 1991, concernant les préparations pour nourrissons et de suite, a saisi le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH) pour recueillir son avis sur les nouvelles données scientifiques qui seraient de nature à modifier le contenu de cette directive.

b. Cadre de la réflexion et objectifs du groupe de travail

La question posée par la DGCCRF concerne les éventuelles conséquences cliniques, à court terme et à long terme, liées à l'utilisation de prébiotiques et probiotiques dans les préparations pour nourrissons et de suite. Cette question se décline en plusieurs questions spécifiques. On peut citer comme exemples :

- Quels sont les intérêts de modifier la flore chez les nourrissons ? Avec quels risques et donc dans quelles limites ?
- Quel profil de flore faut-il favoriser ? Peut-on modifier sélectivement une ou quelques populations bactériennes ? Quelles sont les conséquences sur les populations indésirables ?
- Quels sont les agents alimentaires (les antibiotiques sont exclus de la réflexion) capables de modifier la composition et l'activité de la flore ? Comment doivent-ils être consommés pour agir sur la flore ?
- Ces agents ont-ils tous les mêmes effets ?
- Quels sont les effets de ces agents sur d'autres fonctions que celles de la flore intestinale ?
- Quels bénéfices pour le bien-être ou la santé des nourrissons et des enfants peuvent être revendiqués ? Comment et à qui doivent-ils être communiqués ?

Le groupe de travail s'est donc fixé les objectifs suivants :

1- Faire l'état des connaissances sur les questions posées par la modification de la flore intestinale chez les jeunes enfants, en examinant tous les aspects liés à l'utilisation des ingrédients modifiant la flore intestinale dans les préparations pour nourrissons et de suite.

2- Elaborer des lignes directrices pour la constitution de dossiers industriels spécifiques à ces types de produits.

Il est apparu aux membres du groupe de travail que les questions posées par l'emploi de ces ingrédients en nutrition infantile concernaient essentiellement les préparations pour nourrissons et les préparations de suite. La réflexion s'est donc limitée à ce type de préparations destinées à de jeunes enfants nés à terme, en bonne santé, de la naissance à un an. Cependant, pour des raisons de logique nutritionnelle, les questions liées à la présence de ces ingrédients dans des préparations pour enfants en bas âge, destinés à des enfants en bonne santé de un à trois ans, ont été également considérées.

Ont été exclues de la réflexion les questions relatives :

- A l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées
- Aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales, tels que définis par l'arrêté du 20 septembre 2000.

c. Méthodologie de travail

Le groupe a décidé de procéder à une revue et analyse critique de la bibliographie parue avant 2003. Il a limité son champ d'analyse aux articles publiés dans des journaux à comité de lecture, rapportant en priorité des études réalisées chez l'enfant. Lorsque aucune donnée n'était disponible chez l'enfant, l'analyse s'est étendue aux données obtenues chez l'adulte, et si jugé utile chez l'animal. Une liste des aspects à considérer a été alors établie et les différents domaines à analyser ont été répartis entre les experts scientifiques du groupe de travail. Le résultat de l'analyse de chacun des experts a été exposé à l'ensemble du groupe puis discuté de façon collective.

Le groupe étant conscient que, dans ce domaine nouveau et compétitif de recherche et d'innovation pour l'industrie, toutes les données disponibles ne sont probablement pas publiées, il a décidé de consulter des experts scientifiques de l'industrie, connus pour leur implication dans cette recherche. Un courrier précisant les objectifs de la consultation a été envoyé à trois experts industriels désignés par leur société (Annexe). Chacun d'entre eux a été entendu lors d'une réunion du groupe et les différentes questions abordées par le groupe ont été discutées avec chacun des experts industriels.

a. Santé

Selon l'OMS, la santé est un état de bien-être physique, mental et social. Le groupe de travail a convenu que la réflexion devait donc inclure à la fois les effets physiologiques et psychologiques, et les effets cliniques. Les effets physiologiques comprennent par exemple les modifications de la flore fécale, la modulation du système immunitaire, ou les modifications de marqueurs métaboliques. Les effets cliniques concernent la prévention et/ou le traitement des pathologies (infections, allergies, etc.), ou même l'impact sur des indices de qualité de vie (pleurs, ballonnements, etc.).

b. Probiotiques

La FAO (Food and Agriculture Organization) des Nations Unies et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont établi récemment des lignes directrices pour l'utilisation du terme « probiotiques » dans les aliments (FAO/WHO, 2001). La définition du comité d'experts réunis par la FAO et le WHO en 2001 est la suivante : « **micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte** ». Elle impose que le terme « probiotique » s'applique uniquement à des microbes vivants ayant un effet bénéfique démontré. Cela pose la question des micro-organismes vivants au moment de leur ingestion, qui ont un effet physiologique bénéfique démontré, mais qui ne survivent pas au cours du transit digestif. La conférence FAO/WHO recommande que seuls les microorganismes qui survivent à leur passage dans le tube digestif soient considérés comme probiotiques. Elle va même plus loin dans l'exigence puisqu'elle recommande que non seulement les probiotiques doivent survivre mais également avoir la capacité de proliférer dans le tube digestif. Le groupe de travail n'a pas retenu ces exigences et a considéré que tous les micro-organismes vivants au moment de leur ingestion et exerçant un effet bénéfique sur la santé du nourrisson et de l'enfant en bas-âge étaient des probiotiques.

La définition de la FAO et de l'OMS inclut également des microbes vivants utilisés comme vecteurs de composés physiologiquement bénéfiques, comme, par exemple, des souches transformées de *L. lactis* produisant de l'interleukine-10. Le groupe a exclu cette catégorie de probiotiques (génétiquement modifiés) de sa réflexion.

Bien que des bactéries non vivantes puissent induire un effet physiologique bénéfique, elles ne sont pas considérées comme probiotiques dans cette définition, et d'autres termes devront être proposés. Les termes suivants ont été proposés dans la littérature : abiotique, agent biothérapeutique, etc. Le groupe n'avait pas pour mission de statuer sur ce lexique.

L'analyse du groupe de travail a porté sur les principaux organismes utilisés en alimentation infantile comme probiotiques, qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

La nomenclature des bactéries probiotiques doit se conformer aux noms courants, scientifiquement reconnus. L'utilisation d'anciennes nomenclatures ou de noms pouvant créer des confusions dans l'esprit du consommateur, par exemple *Lactobacillus plantarum serenitas*, n'est pas acceptable. L'hybridation ADN-ADN est la méthode de référence pour spécifier l'appartenance d'une souche à une espèce. La caractérisation de la souche doit ensuite être réalisée avec une méthode génétique reconnue telle que l'électrophorèse en champ pulsé (Rapport de l'AFSSA, 2002). Enfin, toutes les souches devraient être déposées dans une collection internationale reconnue.

c. Prébiotiques

Un prébiotique est défini comme une **substance non-digestible qui induit un effet physiologique bénéfique à l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le côlon** (Gibson & Roberfroid, 1995). Cette définition ne met pas l'accent sur une population bactérienne en particulier. On admet de façon courante qu'un prébiotique augmente le nombre des bifidobactéries et des bactéries productrices d'acide lactique, car ces groupes bactériens pourraient être bénéfiques pour l'hôte. Néanmoins, il pourrait exister des prébiotiques stimulant la prolifération et/ou l'activité d'autres groupes bactériens de la flore intestinale. Parmi les nombreux candidats prébiotiques, les plus connus et étudiés sont les fructanes (FOS : fructo-oligosaccharides, oligofructose, et inuline) et d'autres oligosides de galactose et transgalactose (GOS et TOS). Le lactose qui échappe à la digestion dans l'intestin grêle de l'enfant est également un prébiotique (Schulze & Zunft, 1991), et plusieurs travaux ont montré que du lactose pouvait parvenir dans le côlon chez le nourrisson (Kien, 1996). De

nombreux autres glucides pourraient revendiquer l'appellation de prébiotiques (xylooligosaccharides, isomaltooligosaccharides, glucooligosaccharides, etc.). Certains amidons résistants et des sucres alcools pourraient aussi avoir des propriétés prébiotiques. Le lactulose est également un prébiotique. Néanmoins, le groupe a limité son analyse aux seuls produits déjà utilisés en alimentation infantile, à l'exclusion des autres ingrédients réservés soit à d'autres usages (pharmacie), soit encore insuffisamment caractérisés pour leurs propriétés prébiotiques chez l'enfant.

L'ingrédient prébiotique doit être parfaitement caractérisé. Les produits ou organismes à l'origine de l'ingrédient doivent être connus et caractérisés, qu'il s'agisse d'un ingrédient isolé d'un produit végétal, animal ou microbien, ou d'un ingrédient produit par synthèse chimique ou microbienne. Les procédés d'obtention doivent être décrits. De plus, les ingrédients prébiotiques étant souvent composés d'un mélange de molécules, les molécules actives doivent être identifiées et caractérisées, et leur concentration dans le produit doit être précisée. Enfin, les microorganismes ciblés par l'ingrédient prébiotique et ses mécanismes d'action devraient aussi avoir été recherchés et précisés autant que possible.

d. Symbiotiques

Un symbiotique est défini comme un produit qui contient à la fois un (des) probiotique(s) et un (des) prébiotique(s). Cette définition indique que la démonstration d'un effet synergique des pré- et probiotiques n'est pas requise, et chaque composant du symbiotique peut avoir des effets indépendants. Toutefois, il est possible que le prébiotique soit ajouté afin de favoriser la survie et l'activité du probiotique dans le tube digestif. Si une telle relation entre les ingrédients est indiquée, elle doit être scientifiquement démontrée. Par ailleurs, et d'une façon générale pour tous les symbiotiques, les mêmes considérations de caractérisation, sécurité d'emploi et démonstration d'effets bénéfiques que celles utilisées pour les probiotiques et les prébiotiques doivent être appliquées.

e. Micro-organismes tués

D'autres produits contenant des micro-organismes non vivants sont ou pourraient être introduits dans les préparations pour nourrissons et de suite, dans le but de modifier la flore intestinale et d'induire des effets bénéfiques pour la santé de l'enfant. Ces produits peuvent être composés de micro-organismes seuls, ou de produits fermentés (provenant des céréales, du lait, etc.) ne contenant plus de micro-organismes vivants. Ces produits ne sont ni des probiotiques, ni des symbiotiques, les micro-organismes n'étant pas vivants. Ils pourraient être considérés comme des prébiotiques si leur non digestibilité dans l'intestin grêle était prouvée et si leurs effets sur la flore intestinale étaient démontrés. Le groupe n'a toutefois pas souhaité les considérer en tant que prébiotiques pour trois raisons :

- leur indigestibilité dans l'intestin grêle des enfants n'est pas clairement démontrée ;
- il existe très peu de données dans la bibliographie concernant leurs effets physiologiques, et ces ingrédients sont moins bien caractérisés et moins étudiés que les prébiotiques usuels ;
- il est probable que leurs mécanismes d'action diffèrent en partie de ceux des prébiotiques qui ne contiennent pas de cellules ou fractions cellulaires bactériennes.

A la connaissance du groupe, il existe principalement deux types de préparations lactées contenant des micro-organismes tués. Ces produits sont issus de la fermentation d'un lait soit avec une souche de *Lactococcus lactis*, soit avec un mélange de deux bactéries lactiques : *Streptococcus thermophilus* et une souche de *Bifidobacterium breve*. Les bactéries ont été tuées après la fermentation par traitement thermique, puis séchage ou stérilisation.

Comme pour les probiotiques et les prébiotiques, les procédés d'obtention des produits, la sécurité des souches microbiennes utilisées, la caractérisation des principes actifs, la sécurité d'emploi des produits finis, les cibles physiologiques visées et la démonstration des bénéfices pour la santé des enfants doivent être documentées pour ces produits contenant des micro-organismes tués.

f. Notions de souches, d'espèces et de genres bactériens

- Une souche bactérienne correspond à l'ensemble des micro-organismes issus d'une seule cellule (isolée). La souche est conservée en collection. A chaque souche est attribué un code choisi par le laboratoire ou la collection.

- Une espèce bactérienne est définie par un ensemble de souches considérées comme semblables. On s'appuie sur le concept d'espèce phylogénétique. Pour chaque espèce, une souche type est arbitrairement désignée parmi les premières souches isolées. Néanmoins, les critères de similitude sont basés sur des paramètres pouvant varier d'une espèce à l'autre. La définition de l'espèce est donc fragile et peut être modifiée lorsque des critères plus discriminants sont identifiés. L'accès aux génomes a conduit à définir une valeur seuil de similarité globale entre deux génomes pour que les souches correspondantes appartiennent à la même espèce : au moins 70% de similarité sont nécessaires. A cette valeur correspond une similarité de séquences des gènes codant pour les ARN ribosomiaux d'environ 98%.

- Un genre bactérien correspond à une entité bien définissable, clairement séparée des autres genres. Il n'y a cependant pas un consensus complet sur la définition des genres et des redéfinitions sont occasionnellement proposées. Les espèces d'un même genre ont des génomes dont le degré de similarité est compris entre 30 et 70%. Pour la classification, une espèce type fait référence pour chaque genre bactérien.

- Par convention, le nom d'espèce est écrit en minuscules et il est toujours associé au nom de genre correspondant portant une majuscule. Les noms latins sont écrits en italique et le nom de genre peut être abrégé par la majuscule initiale. Ainsi dans *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Bifidobacterium* est le nom du genre, *lactis* le nom de l'espèce et Bb-12 l'identifiant de la souche.

- Des effets bénéfiques ou néfastes d'une bactérie sont attribuables à une souche et ne peuvent pas être étendus à une autre souche. De la même façon, l'extension à l'espèce est hasardeuse et doit être prohibée.

g. Notions de colonisation, implantation, prolifération, survie

- La colonisation de l'écosystème digestif par une souche, une espèce ou un genre bactérien se caractérise par une population microbienne de niveau constant au cours du temps et n'exigeant pas de ré-inoculation périodique. Cela suppose que les bactéries ayant colonisé une niche donnée s'y multiplient à un taux égal au taux d'élimination pour cette niche. D'une façon générale, un micro-organisme dit autochtone ou indigène colonise naturellement un habitat du tube digestif. Autochtone pour un habitat donné, le micro-organisme peut être allochtone pour d'autres habitats où il transite après élimination de son habitat d'origine.

- Implantation est un terme synonyme de colonisation et les auteurs utilisent indifféremment l'un ou l'autre terme. Il est quelquefois utilisé dans un sens plus spécifique pour désigner la multiplication bactérienne qui précède la colonisation.

- La prolifération bactérienne correspond à une forte multiplication dans la niche écologique considérée. Si elle concerne des bactéries pathogènes (salmonelles, shigelles), elle conduit souvent à une pathologie. Pour les bactéries autochtones, la prolifération permet la colonisation. Pour les bactéries en transit qui ne colonisent pas, deux situations sont possibles : la survie ou la mort.

- La survie est exprimée en pourcentage du nombre de micro-organismes ingérés, ou en concentrations atteintes en différents sites intestinaux. Durant le transit, le micro-organisme qui survit peut être inactif (cas des spores ne germant pas) ou développer une activité en fonction de l'environnement digestif (cas des probiotiques). Enfin, même en l'absence de survie, la lyse bactérienne dans la lumière intestinale peut libérer des composés biologiquement actifs.

h. Notions de dominance et sous-dominance

La flore dominante chez l'homme adulte correspond à des populations bactériennes représentant plus de 1% de la microflore totale. En termes de bactéries cultivables, une population dominante comprend entre 10^{10} et 10^{11} Unités Formant Colonies (UFC) par gramme de selles. A 10^9 et en dessous, on parle de flore sous-dominante. Il faut cependant distinguer 2 types de niveau de population. Les populations représentant entre 1 et 0,1% de la microflore totale sont sous-dominantes mais de légères fluctuations de l'aliment ou de la physiologie de l'hôte peuvent les conduire à devenir dominantes. De plus elles représentent une masse bactérienne non négligeable pouvant avoir un effet sur l'hôte. Le niveau de population à partir duquel une bactérie (non pathogène) peut influencer la physiologie de l'hôte dépend de la bactérie et de l'effet. C'est pourquoi les points de vue divergent sur l'estimation de ce niveau. Il semblerait néanmoins qu'en dessous de 10^8 UFC/g les effets métaboliques soient minimales. Les bactéries dont les niveaux de population sont en dessous de 10^5 UFC/g sont réprimées par la microflore et ne pourront jouer un rôle que si leurs niveaux de populations augmentent au moins de 1000 fois.

III- Effets physiologiques des probiotiques, prébiotiques et autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale chez le nourrisson et le jeune enfant

a. La flore intestinale du nouveau-né et du jeune enfant

i. **Méthodes de caractérisation**

Les connaissances actuelles des microflores digestives sont basées sur des méthodes en pleine mutation, qui incluent la microscopie, la culture sur milieux spécifiques et les analyses moléculaires directes. La culture sur milieux spécifiques a plusieurs limites. De nombreuses espèces bactériennes de la flore intestinale ou fécale ne sont pas cultivables dans les conditions habituelles. Les milieux de culture ne sont pas suffisamment spécifiques. Des méthodes alternatives, indépendantes de la culture, ont donc été mises au point pour améliorer la détection et l'identification des micro-organismes. Elles sont basées sur la détection moléculaire de l'ARNr 16S ou de son gène codant. L'amplification par polymérase chain reaction (PCR) du gène ARNr 16S directement à partir des colonies cultivées sur gel d'agar, suivie d'une analyse de la séquence, permettait déjà une caractérisation phylogénétique précise de la souche correspondante. L'application d'une telle méthode, mais directement à un ADN fécal total, a permis après clonage d'inventorier la diversité d'espèces dominantes d'un échantillon intestinal sans passer par aucune étape de culture. De plus, la variabilité des séquences d'ADNr ainsi obtenues a été mise à profit pour développer des sondes spécifiques pour détecter différents groupes de bactéries (grands assemblages, genres, espèces) directement dans les échantillons fécaux par PCR quantitative ou par hybridation quantitative soit sur des acides nucléiques, soit sur des cellules bactériennes fixées par hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Ces méthodes ne nécessitant pas de culture, ont été validées pour de nombreux groupes bactériens, genres et espèces. Néanmoins, les méthodes moléculaires ont leurs limites :

- Elles sont peu sensibles : si elles permettent d'avoir une vision plus exacte des bactéries présentes, elles ne s'appliquent qu'aux populations les plus représentées dans les échantillons étudiés. Par exemple dans les selles où les bactéries atteignent des niveaux de populations de 10^{11} bactéries par gramme, les techniques d'hybridation renseignent sur la composition des populations présentes à 10^9 bactéries par gramme ou plus et les techniques basées sur des PCR spécifiques peuvent renseigner sur des espèces présentes à 10^6 bactéries par grammes ou plus.
- Elles sont sujettes à des biais : les étapes d'extraction d'acides nucléiques, d'amplification de gènes par PCR ou de fixation des cellules pour l'hybridation sont autant d'étapes qui peuvent biaiser les populations.
- Les mesures sont le plus souvent exprimées en valeur relative (pourcentage d'ARN ou pourcentage de bactéries totales) alors que les techniques classiques donnent une mesure absolue du nombre de micro-organismes ou d'unités formant colonies par gramme.
- Elles n'informent pas sur le rôle des micro-organismes *in situ*. L'utilisation de l'ARNr comme cible moléculaire informe sur l'identité phylogénétique des micro-organismes mais pas sur leur physiologie probable dans le contexte digestif.

Il en découle que les méthodes moléculaires ne remplacent pas l'approche classique basée sur la culture pour l'identification des micro-organismes et la description formelle d'espèces nouvelles. Cela souligne l'intérêt de coupler les approches moléculaire et classique. Enfin la quantification des populations microbiennes totales passe idéalement par un dénombrement en microscopie des bactéries que l'on peut marquer par hybridation fluorescente à l'aide d'une sonde universelle ciblant l'ARNr.

Les principaux groupes à analyser chez l'enfant sont les groupes typiquement dominants dans la microflore fécale de l'homme sain adulte (*Bacteroides* et genres apparentés, *Clostridium leptum* et espèces apparentées, *Clostridium coccoïdes* et espèces apparentées) ainsi que des groupes que l'on retrouvera fréquemment et en proportions potentiellement plus élevées chez le nouveau-né mais moins prévalents chez l'adulte (bifidobactéries, *Atopobium* et apparentés, entérobactéries, lactobacilles, streptocoques et entérocoques). Les sondes d'hybridation sont disponibles pour tous ces groupes tandis que les milieux sélectifs ne sont pas toujours disponibles ou satisfaisants.

D'autre part, dans le cas où des probiotiques sont administrés, la mise en place et l'application d'outils de suivi de la souche ou de l'espèce correspondant au probiotique utilisé est essentielle. De plus, l'analyse de l'impact sur la diversité d'espèces au sein des bactéries lactiques (lactobacilles,

streptocoques,..) et des bifidobactéries serait à encourager lors de l'utilisation des ingrédients destinés à modifier la flore intestinale.

Conclusions :

- La caractérisation de la microflore fécale des nourrissons et des enfants en bas-âge peut être faite par les techniques classiques de culture bactérienne et par des méthodes moléculaires, indépendantes de la culture. Ces dernières, donnant une vision plus proche de la réalité malgré leurs limites, sont recommandées.
- Le niveau de population des groupes bactériens de la flore dominante de l'adulte, ainsi que les bifidobactéries, le genre *Atopobium*, les lactobacilles, streptocoques, entérocoques et entérobactéries devrait être caractérisé dans la microflore fécale des nourrissons et enfants en bas-âge, lors de l'emploi d'ingrédients alimentaires destinés à modifier la flore intestinale
- Le nombre de ces différentes bactéries est à rapporter à la quantité totale de bactéries de la microflore. Cette quantité devrait être mesurée préférentiellement par le dénombrement des bactéries dont on peut détecter l'ARN ribosomal à l'aide d'une sonde fluorescente universelle.
- La diversité d'espèces donne un reflet intéressant bien qu'incomplet de l'impact de l'aliment. Son analyse devrait être effectuée de façon systématique pour les bactéries lactiques et les bifidobactéries, lors de l'emploi d'ingrédients destinés à modifier la flore intestinale chez les nourrissons et les enfants en bas-âge.

ii. Composition

In utero, l'intestin est stérile. Il est néanmoins rapidement colonisé par une communauté microbienne provenant de la mère (flores vaginale, fécale, buccale) et de l'environnement (bactéries véhiculées par le personnel soignant, l'entourage, etc.). C'est pourquoi le mode d'accouchement influence le développement de la flore intestinale du nouveau-né. Un accouchement de durée prolongée favorise la présence de bactéries viables dans l'estomac et la cavité buccale du nouveau-né. Une naissance par césarienne favorise l'exposition à des germes de l'environnement et de l'entourage. Les principales populations cultivables de la flore fécale du nouveau-né entre 0 et 3 jours incluent des entérobactéries (dont *E. coli*), des streptocoques ainsi que des staphylocoques transitoirement dominants, et quelquefois mais pas systématiquement des bifidobactéries et des lactobacilles (Stark & Lee, 1982 ; Hudault, 1996). La microflore intestinale du nouveau-né, composée de seulement quelques genres bactériens pendant les premiers jours, évolue fortement et rapidement jusqu'à la diversification alimentaire en fonction de l'environnement, de l'alimentation et d'une éventuelle antibiothérapie. Après la diversification alimentaire, le profil de la flore dominante se diversifie puis se stabilise.

Deux périodes apparaissent donc critiques pour la colonisation de l'intestin : la période allant de la naissance à la diversification alimentaire et la période se situant autour de la diversification alimentaire. L'intérêt du groupe de travail s'est principalement focalisé sur la première période. Pendant celle-ci, le nourrisson peut être allaité exclusivement au sein ou alimenté exclusivement avec des préparations lactées, une troisième possibilité étant une alimentation mixte dans laquelle la préparation lactée remplace progressivement le lait maternel. La composition de la flore fécale des nourrissons a été analysée dans les deux premières situations ; en revanche, les conséquences de la troisième situation sur le profil bactérien de la flore sont quasiment inconnues.

Plusieurs études, utilisant des techniques de culture conventionnelles, ont montré que la flore des enfants nourris exclusivement au sein était dominée par des bifidobactéries, alors que la flore des enfants nourris avec des préparations lactées contenait plus de *Bacteroides*, de clostridies et d'entérobactéries (Starck & Lee, 1982 ; Yoshioka et al, 1983 ; Balmer & Wharton, 1989 ; Hall et al, 1990 ; Kleesen et al, 1995 ; Mackie et al, 1999). Toutefois, certaines études n'ont pas confirmé la présence de cette différence (Lundequist et al, 1985). Une analyse de Tannock (1994) a montré que les populations de clostridies étaient toujours plus faibles chez les nouveau-nés nourris au lait maternel en comparaison avec les enfants nourris avec une préparation lactée. Cependant, la présence de ce groupe bactérien n'est pas liée à un risque pathologique.

L'analyse de la microflore intestinale du nourrisson avec les méthodes moléculaires a confirmé les données ci-dessus. Ainsi Harmsen et al (2000) ont analysé la composition de la flore de 12 nourrissons, nés à terme, entre 1 et 20 jours. Six enfants étaient nourris au sein et les six autres recevaient une préparation lactée classique. Chez les enfants allaités au sein, le pourcentage moyen de bifidobactéries était inférieur à 40% à la naissance, les *Bacteroides* étaient compris entre 0 et 80% et *E. coli* entre 0 et 30%. Dès le 4ème jour, la flore de tous les enfants nourris au sein était dominée par des bifidobactéries qui représentaient entre 60 et 91% de la flore. Les autres genres bactériens

occupaient une position sous-dominante dans le même temps. Chez les enfants nourris avec une préparation, la composition initiale de la flore était comparable à celle des nourrissons au sein. En revanche, l'évolution était différente. Chez certains enfants (3/6), les bifidobactéries ne devenaient pas dominantes. Elles représentaient entre 28 et 75%, avec une moyenne d'environ 50%. Chez un des enfants, les bifidobactéries n'étaient pas détectables. Chez la majorité des enfants, les *Bacteroides* diminuaient à partir du 4ème jour, mais augmentaient à nouveau vers le 20ème jour, atteignant un niveau compris entre 35 et 61%.

D'autres études ont mis l'accent sur la diversité des espèces de bifidobactéries dans la flore intestinale des enfants nourris au sein ou avec une préparation lactée. Trois espèces de bifidobactéries sont fréquemment trouvées dans la flore des nourrissons nourris au sein : *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* (Matsuki et al, 1999). Néanmoins, une étude récente n'a pas observé de différence dans la distribution des espèces de bifidobactéries et de lactobacilles entre les flores d'enfants au sein et d'enfants recevant une préparation lactée, à l'âge de 1 mois et à l'âge de 7 mois, c'est-à-dire avant et après la diversification alimentaire (Satokari et al, 2002). Dans cette étude, les représentants les plus fréquemment mesurés étaient *B. infantis* pour les bifidobactéries et les espèces appartenant au groupe *L. acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*) pour les lactobacilles. Les populations dominantes de ces deux genres étaient composées de seulement une ou deux espèces dans la majorité des enfants. Un autre résultat intéressant de cette étude était l'absence de différences de composition des populations bactériennes dominantes de la flore intestinale établie à 1 mois entre les nourrissons au sein et ceux recevant une préparation lactée.

La seconde période critique après la naissance pour le développement de la flore intestinale est la période de la diversification alimentaire, pendant laquelle des aliments non lactés vont être ajoutés progressivement au régime de l'enfant. Ces aliments vont exposer la flore des enfants à des glucides complexes différents. Par ailleurs, l'intestin continue de se développer pendant la première année de vie. Il est donc important de préciser si les changements de flore observés à cette période sont causés par l'introduction d'aliments nouveaux ou s'ils lui sont simplement associés dans le temps mais dus en fait à d'autres facteurs (génétiques, immunitaires, etc.). Les résultats préliminaires d'une étude longitudinale suggèrent que la flore bactérienne se diversifie avec une plus grande dominance de *Bacteroides* et de clostridies avant même l'introduction d'aliments non lactés, tant chez les enfants nourris au sein que chez ceux nourris avec une préparation lactée (Martin et al, 2000). Une autre étude indique que les communautés de bifidobactéries restent stables pendant la période de la diversification alimentaire et que la transition vers les espèces de bifidobactéries trouvées chez l'adulte n'apparaît pas directement en réponse à l'introduction d'aliments solides dans le régime (Satokari et al, 2002). Cette étude montre également que les changements du profil bactérien observés à la période de la diversification alimentaire sont comparables chez les enfants auparavant nourris au sein et chez ceux ayant reçu une préparation.

Un des objectifs de l'introduction de probiotiques, micro-organismes tués ou prébiotiques dans les préparations pour nourrissons préparations de suite et préparations pour enfants en bas-âge est de favoriser un profil bactérien de la flore fécale proche de celui observé chez les nourrissons ayant été allaités au sein. L'enrichissement de la flore fécale en bifidobactéries est en particulier recherché. Les produits actuellement sur le marché ont démontré cet effet dans certains groupes de nourrissons. On peut néanmoins regretter que la persistance de l'effet après une période de plusieurs mois d'alimentation n'ait jamais été étudiée et que l'analyse microbiologique ait été restreinte à quelques espèces dominantes. De plus, l'effet n'a pas été documenté à tous les âges et il manque en particulier des données sur les premiers jours d'alimentation, ainsi que lors de la diversification alimentaire. La connaissance de l'impact des probiotiques, prébiotiques et micro-organismes tués sur la composition bactérienne de la flore fécale chez l'enfant doit donc être améliorée et la recherche poursuivie.

Conclusions :

- Le passage en dominance des bifidobactéries au cours de la première semaine suivant la naissance semble bien établi chez les nourrissons allaités au sein.
- Une flore plus complexe pourrait s'établir chez les nourrissons recevant une préparation lactée. Néanmoins, il n'a pas été établi de façon indiscutable de différence de profil bactérien entre les deux groupes d'enfants.
- Quel que soit le mode d'allaitement, les nouveau-nés dont la flore ne contient pas de bifidobactéries dominantes ont des quantités élevées de *Bacteroides*, clostridies et entérobactéries.
- La diversité des populations bactériennes fécales augmente pendant la période de la diversification alimentaire. Elle est caractérisée par une plus grande dominance de *Bacteroides* et de clostridies. Les déterminants de la diversification bactérienne pendant cette période sont inconnus. La responsabilité directe de l'introduction d'aliments non lactés n'est pas établie.

- En comparaison à une préparation lactée, l'impact précis de l'allaitement maternel sur la mise en place et les caractéristiques de la diversification bactérienne au moment de l'introduction d'aliments solides n'a pas été établi de façon indiscutable.
- L'introduction de probiotiques ou prébiotiques dans les préparations pour nourrissons et de suite augmente la concentration fécale de bifidobactéries. Néanmoins, il manque encore de nombreuses connaissances sur l'impact de ces produits sur la composition de la flore intestinale. Les principales données manquantes concernent la variation éventuelle de cet effet en fonction de l'âge, sa persistance au cours du temps et lors de la diversification alimentaire, et l'impact sur d'autres bactéries intestinales que les bifidobactéries.

b. Les activités bactériennes coliques chez le nouveau-né et le jeune enfant

i. La fermentation des glucides

La fermentation des glucides est une fonction majeure de la flore bactérienne colique. Les acides gras à chaîne courte (AGCC) produits par les bactéries fournissent de l'énergie aux colonocytes, le butyrate étant même la principale source d'énergie du colonocyte chez l'adulte ; les AGCC stimulent l'absorption d'eau par le côlon, et pourraient participer à l'inhibition du développement des germes pathogènes. Le profil des AGCC dans les fèces des enfants diffère de celui des adultes. Dans les premiers jours, la concentration d'AGCC est très basse, puis elle augmente progressivement. Elle reste néanmoins basse pendant toute la première année et atteint le niveau trouvé chez l'adulte seulement au cours de la seconde année (Ogawa et al, 1992 ; Midtvedt & Midtvedt, 1992). La proportion molaire des AGCC individuels est aussi très différente. Chez l'adulte, les principaux AGCC sont l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique dans les proportions moyennes de 57, 22 et 21 % (Cummings et al, 1987), et l'acide lactique s'accumule peu dans les conditions usuelles d'alimentation. Chez les nourrissons, l'acide acétique et l'acide lactique dominent pendant le 1^{er} mois de vie, alors que les acides propionique et butyrique sont très peu présents. La concentration de ces deux acides augmente progressivement avec l'âge. L'acide propionique est présent chez tous les enfants à l'âge de 6 mois, et l'acide butyrique à l'âge de 9 mois (Midtvedt & Midtvedt, 1992). L'alimentation influence ces profils d'AGCC. Le lait maternel induit un profil dominé par les acides acétique et lactique, et un pH des selles bas (5,2 – 6) (Edwards et al, 1994 ; Flickinger et al, 2002). La concentration des acides propionique et butyrique augmente tardivement, après 6 mois, chez ces nourrissons. Chez les enfants nourris avec une préparation lactée, la concentration d'AGCC totale est plus élevée les 3 premiers mois, et le profil des différents AGCC est plus complexe que celui des enfants au sein. L'acide acétique reste dominant, mais les acides propionique et butyrique sont présents à des concentrations supérieures à celles trouvées chez les enfants au sein. En revanche, le taux d'acide lactique est bas. Le pH des selles est plus élevé et proche de la neutralité (Okawaga et al, 1992).

Chez les enfants nourris de façon mixte, l'acide acétique reste dominant, l'acide propionique apparaît assez rapidement, mais l'apparition de l'acide butyrique pourrait être retardé. Le pH fécal est moins acide que chez les enfants exclusivement au sein, mais plus bas que chez les nourrissons recevant uniquement une préparation lactée (Bullen et al, 1977). Néanmoins, pour ce groupe d'enfants, il existe encore trop peu de données pour pouvoir conclure de façon définitive.

La faible diversité de la flore intestinale du nourrisson (avant la diversification alimentaire) limite sa capacité fermentaire pour des glucides complexes. Cette capacité a été comparée *in vitro* à celle de la flore fécale d'adultes (Parrett & Edwards, 1997). Les résultats ont confirmé que la flore des nourrissons utilise très peu les glucides trop complexes, mais est capable de dégrader des sucres et des oligosaccharides à courte chaîne (fructo-oligosaccharides). La quantité totale d'AGCC produits n'a pas été affectée par le type d'alimentation des enfants (lait maternel ou préparation lactée), mais les proportions des AGCC individuels reflétaient les profils trouvés dans les selles des enfants, avec plus d'acétate et de lactate produits par la flore des nourrissons au sein, et des taux plus élevés de propionate et de butyrate produits par la flore des enfants recevant une préparation lactée. A la connaissance du groupe, l'impact de l'introduction de probiotiques ou de prébiotiques dans les préparations pour nourrisson et de suite sur la fermentation et production d'AGCC n'a pas été caractérisé, à l'exception d'une acidification du pH des selles des nourrissons recevant ce type de préparation.

Au moment de la diversification alimentaire, les enfants sont exposés pour la première fois à plusieurs glucides complexes différents. Une proportion importante d'amidon peut échapper à la digestion dans l'intestin grêle à cette période, en raison de l'inaptitude de l'enfant à mâcher ses

aliments et de l'imaturité de la fonction exocrine pancréatique. Cet amidon parvient dans le côlon avec d'autres glucides provenant des parois cellulaires végétales. Des quantités significatives d'amidon ont été détectées dans les selles d'enfants jusqu'à l'âge de 3 ans (Verity & Edwards, 1994).

Les concentrations et les profils des AGCC dans les selles changent au cours de la diversification alimentaire. La vitesse du changement est liée à l'alimentation avant cette période. Chez les enfants nourris au sein, il y a une diminution graduelle de l'acide lactique et une augmentation des acides acétique et propionique, puis plus tardivement l'installation d'acide butyrique. Chez les enfants nourris avec une préparation lactée, le changement est moins net, puisque les acides propionique et butyrique étaient déjà présents avant l'introduction des aliments non lactés. Toutefois, la proportion d'acide propionique diminue tandis que celle d'acide butyrique augmente.

La capacité de la flore colique à fermenter des glucides complexes semble se développer plus lentement chez les enfants nourris au sein que chez ceux nourris avec une préparation lactée. Cela est cohérent avec la plus grande diversité d'espèces bactériennes observée chez les seconds. Dans une étude *in vitro*, il a été observé, qu'un mois après la diversification alimentaire, la flore des enfants au sein pouvait utiliser des sucres et des oligosides de petite taille, mais pas des glucides plus complexes. Ceux-ci n'étaient bien dégradés qu'après au moins 7 mois d'alimentation diversifiée. En revanche, la capacité fermentaire pour des glucides complexes était établie dès le début de la diversification alimentaire chez les enfants préalablement nourris avec une préparation lactée (Parrett et al, 1997).

L'impact de l'alimentation au moment de la diversification alimentaire pourrait persister à l'âge adulte. La quantité et le type de fibres alimentaires consommées dans le régime de sevrage de rats a influencé la capacité fermentaire de leur flore intestinale pour ces fibres à l'âge adulte (Armstrong et al, 1992). Plus d'AGCC étaient présents dans les fèces des rats adultes nourris pendant un mois avec des pectines, si ces rats avaient reçu ces pectines lors de leur sevrage. Si ces rats avaient reçu d'autres fibres que des pectines au moment du sevrage, l'augmentation des AGCC induit par les pectines à l'âge adulte n'était pas retrouvé. En outre, les rats produisaient plus d'AGCC à l'âge adulte même avec un régime pauvre en fibres lorsqu'ils avaient reçu des fibres au moment du sevrage. Dans une étude réalisée en Afrique du Sud, les bactéries fécales d'enfants noirs de moins de 3 ans de Soweto produisaient plus d'acide butyrique à partir de différents glucides *in vitro* que les bactéries d'enfants du même âge de la ville voisine de Potchefstroom, dont la population est composée de sud-africains blancs. Les auteurs suggèrent que cet effet pourrait résulter de la plus grande quantité d'amidon résistant consommé par les enfants de Soweto au moment de la diversification alimentaire (Edwards et al, 1998). Ce résultat est particulièrement intéressant car la prévalence des cancers du côlon est beaucoup plus faible chez les adultes noirs que chez les adultes blancs, même lorsque les Africains noirs ont un mode de vie et une alimentation similaire à l'âge adulte à celle des Africains blancs. Néanmoins, les données ne permettent pas de conclure à une relation de cause à effet.

Conclusions :

- La capacité fermentaire, la quantité et le profil des AGCC dépendent de l'âge et de l'alimentation des nourrissons jusqu'au début de la diversification alimentaire.
- Entre la naissance et l'âge de 1 mois, l'acide acétique et l'acide lactique sont dominants, et les acides propionique et butyrique sont quasiment absents. L'acide propionique augmente progressivement après 1 mois, alors que l'acide butyrique apparaît plus tardivement.
- L'allaitement maternel induit un profil d'AGCC dominé par les acides acétique et lactique, ainsi qu'un pH bas des selles, pendant toute la durée de l'allaitement.
- L'alimentation avec une préparation lactée favorise l'augmentation des concentrations d'acide propionique puis d'acide butyrique. La proportion d'acide lactique est basse. Le pH des selles est proche de la neutralité.
- Au moment de la diversification alimentaire, la maturation de la capacité fermentaire de la flore est plus rapide chez les enfants nourris avec une préparation lactée que chez les enfants nourris au sein.
- L'impact sur la fermentation colique de l'introduction de probiotiques ou prébiotiques dans les préparations pour nourrisson et de suite n'est pas connu, en dehors d'une diminution du pH des selles.

ii. Autres activités enzymatiques non fermentaires

La plupart des activités enzymatiques non fermentaires de la flore intestinale ne sont pas développées chez l'enfant avant la seconde année et il existe très peu de données sur l'impact de l'alimentation du nourrisson et de l'enfant en bas-âge sur ces activités. Néanmoins, quelques études se sont focalisées sur certaines activités enzymatiques pendant les premiers mois de la vie. Midtvedt

et al (1988) ont ainsi rapporté que la capacité de la flore à dégrader les mucines n'était pas établie avant l'âge de 3 mois. En revanche, cette capacité a été observée chez la majorité des enfants de plus d'un an et chez tous les enfants de plus de 2 ans (Midtvedt et al, 1994). La capacité à déconjuguer les acides biliaires serait déjà présente à l'âge de 1 mois (Johnsson et al, 1995), alors que la capacité de conversion du cholestérol en coprostanol se développerait après 6 mois et serait retardée par l'alimentation au sein (Midtvedt & Midtvedt, 1993). Les métabolites de la dégradation des protéines tels que l'ammoniaque, le crésol et paracrésol ont été associés à des effets néfastes sur la muqueuse colique et au niveau systémique après leur absorption. Il a été observé qu'avant la diversification alimentaire, les enfants nourris avec des préparations lactées avaient une activité uréase et une concentration d'ammoniaque dans les selles plus élevée que celle des enfants allaités au sein (Gronlund et al, 1999). Les taux de phénol et crésol étaient également plus élevés (Heavey et al, 2000).

Il a été suggéré que les enzymes β -glucuronidase et β -glucosidase pourraient être impliquées dans l'activation de carcinogènes et d'autres toxines dans le côlon. Le niveau d'activité de ces enzymes était bas chez les enfants nourris au sein avant le sevrage, mais il était plus élevé chez les enfants recevant une préparation, ce qui reflète probablement la plus grande diversité de la flore chez ces enfants (Gronlund et al, 1999 ; Heavey et al, 2000). Le niveau de toutes ces activités enzymatiques bactériennes augmente fortement après l'introduction d'aliments solides lorsque la flore est plus variée (Heavey et al, 2000).

Conclusions :

- Une flore plus complexe possède des activités enzymatiques plus variées. Certaines de ces activités ont été associées à des effets néfastes. Néanmoins, il n'existe pas actuellement d'éléments démontrant de façon convaincante l'implication de ces activités dans l'apparition de maladies.

c. Digestion du lactose

Il est établi que certaines souches probiotiques augmentent la digestion du lactose dans l'intestin grêle chez l'adulte, grâce à l'action de leur lactase dans la lumière intestinale. Cet effet est renforcé lorsque le lait est gélifié et vidangé plus lentement que le lait liquide (de Vrese et al, 2001). L'intérêt de l'addition de ces souches à une préparation lactée pour cet objectif est plus discutable. Des auteurs ont estimé que chez le nouveau-né environ 35% du lactose pourrait être métabolisé dans le côlon, en particulier chez les enfants prématurés (Kien et al, 1996). Toutefois, l'activité lactasique est présente à un niveau élevé dans l'intestin grêle de la majorité des enfants nés à terme, aussi la digestion du lactose est-elle presque totale (MacLean et al, 1983 ; Suarez et al, 1995, Naim 2001). La diminution de l'activité lactasique survient plus tard chez l'enfant (Scrimshaw and Murray 1988) et des coliques peuvent chez l'enfant être une manifestation de l'intolérance au lactose. L'intérêt éventuel d'une amélioration de la digestion du lactose chez les enfants en bas-âge n'est donc pas connu, et il semble qu'aucune donnée n'a été publiée montrant un bénéfice de l'addition d'un prébiotique ou d'un probiotique sur la digestion du lactose chez le nourrisson et le jeune enfant.

Conclusion :

- Chez le nourrisson sans intolérance au lactose, l'intérêt d'améliorer l'hydrolyse du lactose dans l'intestin grêle n'est pas démontré.
- Chez le nourrisson intolérant au lactose, il n'est pas exclu que l'addition de certains probiotiques dans l'alimentation puisse être bénéfique. Toutefois, aucune donnée clinique démontrant ce bénéfice n'est actuellement disponible.

d. Balance hydrique et absorption des minéraux

Certains prébiotiques augmentent, d'une façon modérée, la teneur en eau des selles chez l'adulte. Cet effet est dû à deux mécanismes : le premier est lié à l'augmentation de l'excrétion de biomasse, elle-même riche en eau, le second est lié au pouvoir osmotique de ces prébiotiques. L'effet sur l'excrétion d'eau dépend donc principalement de la taille moléculaire des glucides prébiotiques et de la dose consommée. A l'inverse, la stimulation de la production d'AGCC par ces prébiotiques augmente l'absorption d'eau par le côlon, ce qui pourrait limiter le risque de déshydratation au cours de la diarrhée (Ramakrishna & Mathan, 1993).

Chez le nourrisson, le risque d'un éventuel déséquilibre de la balance hydrominérale induit par ces prébiotiques a été soulevé par le CSAH. Les études réalisées chez des nourrissons recevant une

préparation lactée contenant un mélange d'oligosaccharides de fructose(FOS) et de galactose (GOS), à la dose de 0,8 g/100 ml de produit reconstitué montrent que les selles sont plus molles, suggérant ainsi une augmentation de l'excrétion d'eau (Moro et al, 2002). Néanmoins, cet effet est modéré et à la dose considérée, il est peu probable qu'il induise une perte d'eau susceptible d'avoir un effet négatif sur la balance hydrique des nourrissons.

Dans un 1^{er} avis en date du 26 septembre 2001, le CSAH concluait qu'il n'y avait pas assez de données pour établir l'innocuité des FOS et des GOS comme ingrédients dans les préparations pour nourrissons et appelait à de nouvelles études sur les effets indésirables potentiels de ces ingrédients, en particulier sur la balance hydrique et la biodisponibilité des micronutriments. Le CSAH estimait que le risque était beaucoup moindre pour les préparations de suite, qui ne représentent qu'une partie de l'alimentation des nourrissons à l'inverse des préparations pour nourrissons. Il acceptait l'ajout de FOS et de GOS dans les préparations de suite à une concentration maximale de 0,8 gramme pour 100 mL de produit prêt à l'emploi. Dans un 2^{ème} avis en date du 13 décembre 2001, le CSAH affirmait, au vu de 4 études cliniques dont les résultats étaient disponibles depuis la date du 1^{er} avis, qu'il n'y avait pas d'indication d'effets indésirables avec des préparations pour nourrissons et de suite contenant jusqu'à 0,8 gramme/100 mL de produit prêt à l'emploi d'un mélange FOS-GOS dans une proportion de 10%-90%.

Des études réalisées chez l'adolescent et chez l'adulte suggèrent que certains prébiotiques (les fructanes en particulier) augmentent l'absorption du calcium et du magnésium dans le côlon (van den Heuvel et al, 1999 ; Scholz-Ahrens et al, 2001). L'effet serait principalement dû à la diminution du pH colique induit par la fermentation de ces prébiotiques, qui faciliterait la solubilisation des minéraux du contenu luminal et augmenterait ainsi leur absorption par la muqueuse colique. Néanmoins, les conséquences éventuelles sur la balance minérale et sur la densité osseuse des sujets ainsi supplémentés ne sont pas clairement établies. De plus, ces effets semblent significatifs uniquement avec de fortes doses de prébiotiques. Il n'existe aucune donnée chez le nourrisson.

Conclusions :

- Les prébiotiques augmentent l'excrétion fécale d'eau. Les effets dépendent de la dose et de la taille moléculaire des substances prébiotiques.
- La dose de prébiotiques, si ceux-ci sont osmotiquement actifs, doit être limitée et ne pas représenter de risque pour la balance hydrique des nourrissons. Fixation en l'état actuel des connaissances par le CSAH d'une concentration maximale de 0,8 gramme pour 100 mL de produit prêt à l'emploi d'un mélange 10% FOS-90% GOS pour les préparations pour nourrissons et les préparations de suite (avis du 13 décembre 2001).
- Les effets des prébiotiques sur l'absorption des minéraux (calcium, magnésium) ne sont pas connus chez le nourrisson. Chez l'adulte, une augmentation de l'absorption de ces minéraux dans le côlon a été observée avec de fortes doses de prébiotiques. Le bénéfice éventuel de cette augmentation sur le statut minéral et la densité osseuse n'est pas démontré.

e. Transit intestinal, nombre et caractéristiques des selles

Certains probiotiques et prébiotiques améliorent le transit et l'excrétion fécale chez des adultes légèrement constipés. Chez l'enfant, il existe très peu de données sur un effet éventuellement favorable des prébiotiques et probiotiques. Pourtant, il est vraisemblable que les mécanismes conduisant à une réduction de la constipation légère chez l'adulte soient identiques chez l'enfant. Ces mécanismes dépendent essentiellement de l'accroissement de la biomasse excrétée dans les selles sous l'effet de la fermentation des prébiotiques, et peut-être d'un effet spécifique de certains probiotiques sur le transit intestinal. Ces effets laxatifs restent néanmoins très modérés chez l'adulte et dépendent de la dose ingérée.

Chez des nourrissons nés à terme, la fréquence des selles était augmentée et leur consistance améliorée lors de l'ingestion d'une préparation contenant un mélange de FOS et GOS en comparaison à une préparation classique. L'effet dépendait de la dose de prébiotique ; son amplitude restait cependant faible et insuffisante pour atteindre la signification statistique (Moro et al, 2002). Le même mélange a aussi augmenté la fréquence des selles chez des nouveau-nés prématurés (Boehm et al, 2002). De plus, alors que les selles devenaient plus dures dans le groupe témoin, leur consistance ne variait pas dans le groupe prébiotique. Aucun effet sur la fréquence et la consistance des selles n'a été en revanche observé chez des enfants plus âgés (Firmansyah et al, 2001 ; Saavedra & Tschernia, 2002).

A la connaissance du groupe, une seule étude publiée a montré qu'un probiotique, *B. lactis* Bb12 (10⁸ UFC/g), ajouté à une préparation classique diminuait le pourcentage d'enfants ayant des selles dures et augmentait celui des enfants ayant des selles molles (Saavedra et al, 1999).

Conclusion:

• Un effet favorable des prébiotiques et de certains probiotiques sur la fréquence et la consistance des selles chez les nourrissons et les enfants en bas-âge n'est pas exclu. Il existe néanmoins actuellement trop peu de données pour que cet effet soit établi.

f. Barrière épithéliale intestinale : facteurs non immunologiques

Les effets éventuels de l'adjonction de probiotiques ou de prébiotiques aux préparations lactées sur la trophicité et les fonctions enzymatiques, endocrines et détoxifiantes de l'épithélium intestinal ne semblent pas avoir été étudié chez les enfants. Les données chez l'animal sont également très rares. Une étude, réalisée chez des porcelets nouveau-nés, a montré que l'addition de fructo-oligosaccharides (3 g/l) augmentait la densité cellulaire et l'index de prolifération de l'épithélium du tractus caecocolique des animaux (Howard et al, 1995). La même équipe n'a pas retrouvé ces effets chez des rats dont les aliments de sevrage contenaient différents glucides indigestibles (30 g/l) dont des prébiotiques (Howard et al, 1995). Chez la souris adulte, l'ingestion d'un aliment contenant 30% d'un lait fermenté avec une souche de *L. casei*, pendant 3 et 15 jours, a augmenté la prolifération cellulaire et la surface villositaire dans l'intestin grêle après 3 jours ; néanmoins l'effet n'était plus significatif à 15 jours, suggérant que le probiotique n'affectait pas de manière pérenne la régulation de la prolifération cellulaire. De la même façon, les activités enzymatiques (lactase, amyloglucosidase, maltase et phosphatase alcaline) étaient augmentées après 3 jours du régime contenant le probiotique, mais l'effet disparaissait après 15 jours malgré la poursuite de l'administration de *L. casei* (Thoreux et al, 1998).

Le mucus est un facteur qui contribue à l'intégrité de la barrière intestinale. Actuellement, il n'existe pas de données *in vivo* indiquant si des probiotiques ou des prébiotiques influencent la synthèse, la sécrétion et/ou la glycosylation des mucines intestinales. Une stimulation de l'expression de certains gènes des mucines par des souches probiotiques a cependant été observée *in vitro* (Mack et al, 1999). Il a été démontré que chez le souriceau, la colonisation par la flore était nécessaire pour que la fucosylation des glycoprotéines de la membrane des entérocytes soit complète (Bry et al, 1996). L'inoculation d'une flore conventionnelle chez la souris axénique adulte rétablit un programme complet de fucosylation. Néanmoins, seules certaines bactéries semblent agir sur ce processus, et l'action des souches probiotiques les plus couramment utilisées n'a pas été étudiée. Une grande majorité de probiotiques a été sélectionnée pour leur capacité d'adhésion au mucus intestinal, dont celui des nourrissons, l'hypothèse étant que cette propriété est nécessaire à la compétition avec les micro-organismes pathogènes (Juntunen et al, 2001), ainsi qu'à l'interaction avec les cellules épithéliales et/ou immunocompétentes de l'intestin (He et al, 2001). Enfin, d'autres études ont recherché si des probiotiques dégradent le mucus, en émettant l'hypothèse étant que l'absence de dégradation du mucus par les souches probiotiques serait un gage de sécurité d'emploi (Ruseler van Embden et al, 1995).

La translocation est le passage de bactéries de l'intestin dans les ganglions mésentériques, le foie, la rate puis le sang périphérique. Les données obtenues chez l'animal suggèrent qu'il pourrait exister un certain degré de translocation naturelle chez le nourrisson dont la barrière intestinale n'est pas mature ; certains auteurs suggèrent même que cette translocation modérée serait nécessaire à la mise en place des défenses immunitaires. Néanmoins, la translocation de micro-organismes pathogènes peut être la cause d'infections sévères et de mortalité. Une étude récente indique que le degré de translocation des bactéries intestinales est moindre chez des rats allaités par leur mère que chez des rats nourris avec une préparation lactée (Yajima et al, 2001). Plusieurs travaux ont démontré que certains probiotiques diminuent les risques de translocation de bactéries pathogènes dans des modèles animaux (Suzuki et al, 1997). Néanmoins, l'effet de probiotiques ou de prébiotiques contenus dans des préparations pour nourrissons n'est pas connu.

La capacité de certains probiotiques à inverser l'augmentation de la perméabilité intestinale lors d'une inflammation de la muqueuse intestinale a été rapportée chez l'animal (Isolauri et al, 1993 ; Madsen et al, 1991 ; Schultz et al, 2002). Une étude non contrôlée chez 4 jeunes adolescents ayant une maladie de Crohn a montré que l'ingestion de *Lactobacillus* GG pendant 6 mois diminuait l'activité inflammatoire et réduisait la perméabilité intestinale (Gutpa et al, 2000). Chez des nourrissons atopiques, un traitement *par L. GG* a été suivi d'une diminution de la perméabilité intestinale dont témoignait la réduction de l'excrétion fécale d' α 1-antitrypsine (Majamaa & Isolauri, 1997).

Conclusions :

- Les effets éventuels des prébiotiques et des probiotiques sur la trophicité et l'adaptation fonctionnelle de l'épithélium intestinal ne sont pas connus chez le nourrisson. Quelques données chez l'animal suggèrent que ces effets pourraient être favorables.
- Les interactions entre les probiotiques ou les prébiotiques et les glycoprotéines intestinales, dont les mucines, sont inconnues à l'heure actuelle.
- Les probiotiques diminuent la translocation bactérienne dans différents modèles animaux. Leurs effets chez les nourrissons sont inconnus, de même que ceux des prébiotiques.
- Quelques données expérimentales suggèrent que certains probiotiques pourraient stabiliser la barrière épithéliale en modulant la perméabilité intestinale. Le niveau de preuve est encore très faible et quasiment inexistant chez l'enfant en bas âge.

g. Immunité systémique et intestinale

Les différents effecteurs de l'immunité non spécifique et spécifique se développent progressivement durant la vie intra-utérine. Cependant, ils n'ont pas acquis une maturation complète à la naissance ; ceci explique la susceptibilité particulière du nouveau-né et particulièrement du prématuré aux infections bactériennes et virales. Les diverses stimulations antigéniques et les coopérations cellulaires T/B vont permettre la maturation complète du système immunitaire spécifique au cours des premières années de vie (Durandy, 2001). La réponse immune spécifique qui prend place dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphoïdes) met en jeu les lymphocytes T responsables de l'immunité cellulaire (cytotoxicité, activation des macrophages et des lymphocytes B), et les lymphocytes B responsables de l'immunité humorale (production d'anticorps). Cette réponse, spécifique de l'antigène, nécessite une éducation préalable des lymphocytes T et B. Elle requiert également une cellule capable de présenter l'antigène (cellule mononucléée/dendritique) aux cellules T effectrices.

Les lymphocytes T du nouveau-né sont des lymphocytes naïfs et non mémoire (Bofill et al, 1994). Leur réponse à l'antigène est de type primaire, et ils expriment en majorité le récepteur CD45RA caractéristique des lymphocytes naïfs. L'acquisition du marqueur CD45RO, caractéristique des lymphocytes T mémoire, se produit progressivement dans les premières années de vie : les valeurs observées chez l'adulte sont acquises après la première décennie (Durandy, 2001). La réponse primaire des lymphocytes T naïfs se traduit par une production faible de cytokines de type Th1 (IL-2 et IFN γ) et Th2 (IL-4, IL-10, IL-13...) (Lewis et al, 1991 ; Watson et al, 1991). A ce défaut de production s'ajoute un défaut d'interaction cellulaire (Durandy et al, 1995). Enfin, les lymphocytes T naïfs ont une capacité de réponse cytotoxique moindre que celle des lymphocytes T mémoire. L'ensemble de ces caractéristiques peut expliquer un certain degré d'immaturité immunologique chez le nouveau-né. Par ailleurs, à la naissance, les lymphocytes B produisent essentiellement de l'IgM et ont une capacité réduite de commutation isotopique (c'est-à-dire de produire des IgG et IgA) comparativement aux lymphocytes B de l'adulte. Les diverses stimulations antigéniques et la coopération avec les lymphocytes T vont permettre la génération de lymphocytes B mémoire, exprimant le marqueur CD27, capables de réponse secondaire et de production d'IgG et d'IgA. Un pourcentage identique à celui de l'adulte de lymphocytes B CD27+ est atteint au cours de la première année de vie. A la naissance, le taux d'immunoglobulines synthétisées par l'enfant est très faible. La production augmente progressivement pour atteindre les taux de l'adulte après la quatrième année (Durandy, 2001).

La colonisation de l'intestin par la flore microbienne est probablement impliquée dans la maturation et l'orientation fine des réponses immunitaires. Cette hypothèse a été bien documentée chez le modèle animal. Par exemple, la flore intestinale semble freiner l'activité cellulaire de type Th2 et favoriserait ainsi la tolérance orale chez la souris (Sudo et al, 1997). De plus, la période à laquelle survient le stimulus microbien semblerait importante. Des souriceaux axéniques peuvent être rendus tolérants aux antigènes alimentaires seulement si la flore intestinale est présente pendant la période néonatale, alors que l'implantation plus tardive de la flore ne permet pas d'induire cette tolérance orale (Sudo et al, 1997). Les études chez l'enfant se sont focalisées principalement sur les effets de la colonisation sur l'immunité humorale spécifique contre les bactéries colonisatrices. Ainsi plusieurs études ont montré une augmentation de la sécrétion d'IgA et d'IgM spécifiques dans la salive et dans les selles de nourrissons et jeunes enfants après l'administration de différentes souches non pathogènes d'*E. coli* (Mellander et al, 1984 ; Lonodova et al, 1991). En revanche, une seule étude explorant les relations entre la colonisation microbienne intestinale chez les enfants de moins de 6 mois et la maturation du système immunitaire a été publiée à ce jour. Les auteurs se sont attachés à

relier la composition bactérienne fécale à différents facteurs de l'immunité humorale non-spécifique chez des enfants âgés de 0 à 6 mois (Gronlund et al, 2000). Ils ont observé que les enfants recevant une préparation lactée avant 2 mois avaient une concentration fécale de *Bacteroides* (du type *B. fragilis*) plus élevée aux âges de 2 et 6 mois en comparaison aux enfants nourris exclusivement au sein pendant plus de 2 mois. Les autres genres bactériens n'étaient pas notablement affectés par le type d'alimentation. La présence plus élevée de *B. fragilis* était significativement corrélée avec un plus grand nombre de cellules sécrétrices d'IgA et de cellules sécrétrices d'IgM dans le sang périphérique, et cela à tous les âges étudiés et quelle que soit l'alimentation. Le nombre de cellules sécrétrices d'IgG n'était pas associé à la colonisation par les bactéries du type *B. fragilis*. Seul ce genre bactérien (parmi ceux étudiés dans ce travail) était associé aux modifications de l'immunité humorale non-spécifique. En revanche, ni le pourcentage, ni la concentration fécale de *Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp. n'étaient corrélés au nombre de cellules sécrétrices d'immunoglobulines.

Différents effets sur le système immunitaire ont été observés lors de l'administration de différentes souches de bactéries probiotiques (*Lactobacillus* sp. et *Bifidobacterium* sp.), seules ou dans un lait fermenté, dans plusieurs modèles animaux et chez l'adulte sain. Ainsi, chez l'adulte sain, il a été montré que la consommation de certaines souches de lactobacilles et/ou de bifidobactéries stimulait la phagocytose par les cellules mononucléées du sang périphérique (Blum et al, 2002), et augmentait la réponse IgA totale et spécifique après la vaccination par une souche de *S. Typhi* à activité atténuée (Link-Amster et al, 1994 ; Fang et al, 2000). Chez le nouveau-né et l'enfant en bas âge, la plupart des données suggérant que certains probiotiques influencent le système immunitaire proviennent des études sur les allergies et les infections. Ainsi, l'administration de *L. GG* vivant (en comparaison à *L. GG* tué) chez des enfants (21 mois) ayant une diarrhée à *Rotavirus* a augmenté le nombre de cellules sécrétrices d'IgA anti-*Rotavirus* (Kaila et al, 1995). Le même probiotique a aussi augmenté le nombre de cellules sécrétrices d'IgM spécifiques du *Rotavirus*, 8 jours après vaccination orale, chez des enfants de 2 à 5 mois (Isolauri et al, 1995). Chez des enfants de 21 mois souffrant d'un eczéma atopique, l'ingestion de *L. GG* pendant 4 semaines a augmenté la concentration sérique d'IL-10 en comparaison avec les taux circulants mesurés avant puis au début du traitement (Pessi et al, 2000). Les autres paramètres mesurés (taux sériques d'IL-6, IL-12, TNF α et IFN gamma ; concentrations fécales d'IgA et de TNF α) n'ont pas été modifiés par *L. GG* dans cette étude. Chez des enfants sains âgés de 15 à 31 mois, une préparation lactée contenant des bifidobactéries vivantes (*B. lactis* Bb12), consommée pendant 21 jours, a augmenté le taux d'IgA total dans les selles ainsi que le taux circulant d'IgA spécifique anti-poliovirus (Fukushima et al, 1998). Le même probiotique a diminué la concentration de CD4 soluble et de TGF- β 1 dans le sang d'enfants (5 mois) présentant un eczéma atopique (Isolauri et al, 2000). Enfin, une étude récente a indiqué que l'administration de *L. GG* pendant 7 mois a diminué le nombre d'enfants souffrant d'infections respiratoires et l'utilisation d'antibiotiques chez des enfants finlandais de 1 à 6 ans ; au total les enfants ayant reçu ce probiotique avaient été moins absents de la garderie pour des raisons de maladies (Hatakka et al, 2001). Toutefois, aucun paramètre immunitaire n'a été mesuré dans cette étude.

Une étude contrôlée, réalisée chez une vingtaine d'enfants à la sortie de la maternité, recevant une préparation standard ou une préparation contenant un lait fermenté par des bactéries lactiques (*S. thermophilus* et *B. breve*), ces bactéries étant tuées dans la préparation finale, a montré une élévation significative de la réponse en IgA sécrétoire anti-poliovirus après le 2^e rappel de vaccin Pentacoq (Romond et al, 2001). Seul un résumé de cette étude est actuellement publié.

Les effets éventuels des prébiotiques sur le système immunitaire du jeune enfant sont mal connus. Des enfants de 11-12 mois ont reçu une préparation contenant ou non des fructo-oligosaccharides pendant 6 mois (n > 60 dans chaque groupe). Les enfants ayant reçu le prébiotique ont présenté moins fréquemment des symptômes de fièvre et d'épisodes de rhinorrhée ; ils ont reçu moins d'antibiotiques et ont été moins absents de la crèche pour raison de maladies (Saavedra and Tschernia, 2002), ce qui suggère que les capacités de défense contre diverses infections étaient augmentées chez ces enfants. Toutefois, cette étude n'est pas publiée en totalité et la modification éventuelle de différents marqueurs du fonctionnement du système immunitaire n'est pas connue. Une autre étude contrôlée a montré qu'une préparation à base de céréales contenant un mélange d'inuline et de FOS (la consommation quotidienne du mélange prébiotique a été d'environ 0,2 g/kg de poids) était bien tolérée par des enfants de 7-9 mois, n'avait pas d'impact négatif sur la croissance, mais augmentait le taux d'IgG vaccinal 10 semaines après l'immunisation des enfants contre la rougeole (Firmansyah et al, 2001). Le taux de positivité avec une réponse IgG adéquate était de 96% chez les enfants ayant reçu le prébiotique contre 88% chez les enfants témoins. Les niveaux d'IgM anti-rougeole n'étaient pas différents. Seul un résumé de l'étude est pour l'instant disponible.

Conclusions :

- Le système immunitaire n'est pas complètement mature chez les nouveau-nés à terme et continue son développement pendant les premières années de vie.
- La colonisation de l'intestin par des bactéries est un stimulus essentiel du développement de l'immunité. Cependant, la nature exacte des relations entre la maturation du système immunitaire et la colonisation par les différentes populations bactériennes est très mal connue chez l'enfant.
- Plusieurs travaux montrent que certains probiotiques (*Lactobacillus* GG, *Bifidobacterium* Bb12) augmentent la réponse post-vaccinale d'IgA sécrétoires.
- Des résultats préliminaires indiquent que des préparations contenant *Bifidobacterium* C50 inactivé après fermentation pourraient avoir le même effet. Néanmoins, les effets sont encore insuffisamment caractérisés.
- Des résultats préliminaires suggèrent que certains prébiotiques (fructanes) pourraient influencer le système immunitaire des enfants en bas-âge. D'autres études sont nécessaires pour établir cet effet.

IV- Effets cliniques “préventifs” et curatifs des probiotiques, prébiotiques et autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale chez le nourrisson et le jeune enfant

a. Allergies

Plusieurs études épidémiologiques ont indiqué que la survenue d'infection (au sens large) chez les jeunes enfants était susceptible de diminuer le risque de développement ultérieur de phénomènes atopiques (Langhendries, 2001). D'autres études suggèrent que l'antibiothérapie dans la première enfance, et d'une façon plus générale l'amélioration de l'hygiène, pourraient favoriser l'atopie en modifiant l'environnement microbien intestinal (Alm et al, 1999 ; Brabäck et al, 1998). Parallèlement, la comparaison de la prévalence des allergies en Estonie et en Suède suggère que la dominance de bactéries acido-lactiques dans la flore intestinale des enfants pourrait protéger contre le développement de l'allergie (Björkstén et al, 1998 ; Björkstén et al, 1999). Plus récemment, une étude a analysé le profil bactérien d'enfants à risque atopique, à l'âge de 3 semaines et à l'âge de 3 mois, et a associé ce profil à la survenue d'une réaction atopique à l'âge de 1 an. La proportion de clostridies était plus élevée et celle des bifidobactéries tendait à être plus basse, conduisant à une diminution significative du rapport bifidobactéries/clostridies chez les enfants atopiques en comparaison aux non-atopiques (Kalliomaki et al, 2001). La même équipe a observé que la concentration sérique d'IgE était corrélée au nombre d'*E. coli* et de *Bacteroides* chez des enfants atopiques, intolérants à une préparation aux protéines lactées hydrolysées, et que la supplémentation de l'aliment avec *Bifidobacterium lactis* Bb-12 diminuait le nombre d'*E. coli* et ralentissait le développement des *Bacteroides* lors de la diversification alimentaire (Kirjavainen et al, 2002).

Basées sur l'hypothèse épidémiologique que le profil bactérien de la flore intestinale est déterminant dans le développement des allergies, en particulier de l'atopie, quatre études cliniques, publiées à ce jour, ont cherché à démontrer le bénéfice de l'ingestion de probiotiques pour prévenir ou traiter l'eczéma atopique. Ces études ont toutes été réalisées par la même équipe finlandaise, de l'université de Turku. La première étude montre que la prise orale de *Lactobacillus rhamnosus* GG, à la dose de 5.10^8 cfu/mg d'aliment pendant un mois, chez des nourrissons de 2 à 16 mois déjà allergiques au lait de vache, a amélioré les symptômes cliniques et diminué l'inflammation intestinale (Majamaa & Isolauri, 1997). Les mêmes auteurs ont confirmé ces résultats dans une seconde étude contrôlée chez 27 nourrissons d'environ 5 mois, allaités au sein et souffrant d'eczéma atopique (Isolauri et al, 2000). Le sevrage de ces nourrissons avec une préparation hydrolysée additionnée avec une souche de *Lactobacillus* GG (3.10^8 cfu/g) ou une souche de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (10^9 cfu/g) diminuait significativement le SCORAD moyen et améliorait l'état de la peau après 2 mois. La concentration sérique de CD4 et le taux de protéine éosinophile X urinaire étaient également réduits. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux probiotiques. Dans chacune de ces études, les probiotiques ont été ingérés sous forme de supplément non inclus dans l'aliment. Cette équipe s'est ensuite intéressée à la prévention de l'atopie. Dans une étude contrôlée, randomisée en double aveugle, les auteurs ont donné un supplément contenant 10^{10} cfu de *Lactobacillus* GG, pendant 2 à 4 semaines avant l'accouchement, à des mères dont un des proches de premier degré ou le partenaire était allergique. Ils ont ensuite poursuivi la supplémentation chez la mère allaitant ou chez le nouveau-né, pendant 6 mois à la même dose. La fréquence de l'eczéma atopique au cours des deux premières années a été diminuée de moitié dans le groupe ayant reçu le probiotique (Kalliomaki et al, 2001). Toutefois, chez les enfants allergiques, ni le SCORAD ni la concentration sérique d'IgE n'étaient modifiés par la supplémentation. Ces résultats ont été confirmés par les mêmes auteurs qui ont récemment montré que l'administration de *L. GG* (2.10^{10} cfu/j) à des mères pendant la gestation puis la lactation réduisait très significativement le risque d'eczéma atopique chez l'enfant pendant les deux premières années (RR= 0,32) et augmentait la teneur du lait en TGF- β 2 (Rautava et al, 2002). Ces résultats apparaissent très prometteurs. Il faut néanmoins souligner qu'ils ont été obtenus par une seule équipe à ce jour et demandent donc à être confirmés par d'autres chercheurs dans d'autres pays et dans d'autres conditions génétiques et sanitaires. Dans un éditorial très critique, Matricardi (2002) souligne les points faibles de ces études : absence de comparaison du profil bactérien de la flore fécale des enfants témoins et supplémentés ; absence de différence des valeurs médianes du SCORAD dans les deux groupes de l'étude de Majamaa & Isolauri (1997) ; pas de différence d'IgE et de SCORAD entre les deux groupes d'enfants atopiques dans l'étude de Kalliomaki et al (2001) ; etc.

Très peu d'études ont été publiées sur les effets des probiotiques sur d'autres maladies allergiques. La consommation de yaourts non thermisés pendant un an a diminué les symptômes d'allergies nasales et les taux sériques d'IgE chez des adultes (Trapp et al, 1993). Aucun effet n'a été

trouvé dans une autre étude contrôlée concernant des adultes avec un asthme modéré, ayant reçu du yaourt avec ou non des lactobacilles vivants pendant un mois (Wheeler et al, 1997). Enfin, une étude récente chez des enfants et jeunes adolescents souffrant d'une allergie au pollen de bouleau n'a pas montré d'amélioration des symptômes avec une supplémentation de *L. GG* (5.10^9 UFC/j) pendant 5 mois (Helin et al, 2002).

Par ailleurs, à la connaissance du groupe, aucune étude n'a été publiée concernant les effets éventuels des prébiotiques sur la prévention ou le traitement des allergies.

Conclusions :

- Une réduction des symptômes d'eczéma atopique a été montrée après l'administration de certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* Bb-12) chez l'enfant à risque.
- Le risque d'eczéma atopique semble être diminué par l'ingestion de certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG) par la mère avant l'accouchement et pendant la lactation. Ces effets ont été rapportés par une seule équipe et nécessitent confirmation par d'autres équipes dans d'autres pays.
- Les effets éventuels sur l'eczéma atopique d'autres souches probiotiques, ou des prébiotiques, ou d'ingrédients contenant des microorganismes tués, en traitement ou en prévention, ne sont pas connus.
- Les effets éventuels des probiotiques et prébiotiques sur d'autres types d'allergie ne sont pas établis.

b. Diarrhées infectieuses

Des études épidémiologiques ont indiqué que l'allaitement maternel (plus de 3 mois) diminuait le risque d'infections, en particulier gastro-intestinales, chez le jeune enfant (Duffy et al, 1986 ; Brown et al, 1989 ; Howie et al, 1990). D'autres études ont montré qu'en réalité l'allaitement maternel protégeait contre les infections pendant les premières années de vie et décalait le risque à un âge plus tardif, à un moment où la maturation de la barrière intestinale est plus avancée (Clemens et al, 1986 ; Clemens et al, 1993). L'allaitement au sein ayant été associé à une flore intestinale plus riche en bactéries acéto-lactiques, l'hypothèse a été faite que l'administration de probiotiques pourrait améliorer le traitement des diarrhées infectieuses du nourrisson et diminuer leur survenue.

Plusieurs études cliniques contrôlées ont démontré que l'administration de certains probiotiques diminuait la durée des diarrhées infectieuses. Une méta-analyse récente a repris l'ensemble des essais contrôlés, randomisés et réalisés en double aveugle, dans lesquels un traitement avec des lactobacilles avait été donné au cours de diarrhées aiguës chez des enfants de moins de 3 ans (Van Niel et al, 2002). Les résultats montrent que la durée de la diarrhée est réduite d'environ 0,7 jour [intervalles de confiance à 95% : 0,3 – 1,2 j], que la fréquence des selles est diminuée de 1,6 selles/j [0,7 – 2,6] à partir du second jour. L'effet thérapeutique semble dose-dépendant et efficace à partir de 10^{10} cfu/j. De plus, l'administration de probiotiques semblent bénéficier à tous les types de diarrhées infectieuses, même si l'effet pourrait être plus prononcé lors des diarrhées à *Rotavirus*. Une autre méta-analyse (Szajewska & Mrukowicz, 2001) a abouti à des conclusions proches. Même si ces méta-analyses ont des limites, reconnues par leurs auteurs eux-mêmes, elles suggèrent fortement que l'administration de souches probiotiques de lactobacilles améliorent les symptômes cliniques de diarrhée aiguë chez les jeunes enfants. Une nouvelle étude clinique récente (non inclus dans les méta-analyses), réalisée avec un mélange d'une souche de *L. rhamnosus* et une souche de *L. reuteri*, montre aussi que la durée de la diarrhée tendait à être réduite dans le groupe d'enfants traités (6 à 36 mois), et que l'effet devenait hautement significatif lorsque le traitement était appliqué dès le début de la diarrhée (Rosenfeldt et al, 2002). La durée de l'hospitalisation était diminuée de moitié dans le groupe traité. A la fin du traitement, l'antigène du *Rotavirus* était retrouvé chez 12% des patients traités et chez 46% des témoins.

D'autres études ont recherché l'existence d'un effet préventif des probiotiques sur la survenue de diarrhées infectieuses. Dans un large échantillon d'enfants péruviens sous-alimentés, âgés de 6 à 24 mois, l'administration de *Lactobacillus* GG pendant 15 mois a diminué l'incidence des épisodes de diarrhée en comparaison avec des enfants ayant reçu un placebo (Oberhelman et al, 1999). L'effet était plus prononcé entre 18 et 29 mois et se limitait aux enfants non nourris au sein. En revanche, la durée et les causes des diarrhées étaient similaires dans les deux groupes d'enfants. L'incidence de diarrhées a été réduite chez des enfants hospitalisés ayant reçu un traitement préventif de *L. GG* (Szajewska et al, 2001). En revanche, deux autres études réalisées avec le même probiotique n'ont pas trouvé d'effet (Vanderhoof & Young, 1998). D'autres probiotiques pourraient être efficaces. L'allaitement avec une préparation enrichie en *Bifidobacterium lactis* Bb-12 a diminué l'incidence des diarrhées et le portage de *Rotavirus* chez des nourrissons en hospitalisation de long séjour (Saavedra

et al, 1994). Ces résultats ont été confirmés en France chez des nourrissons sains en pouponnière (Chouraqui et al, 1998). Enfin, deux études ont montré que l'administration concomitante de *L. GG* avec une antibiothérapie tendait à réduire l'incidence de la diarrhée associée aux antibiotiques, ainsi que sa durée et le nombre de selles quotidiennes, chez des enfants d'âge moyen 4 ans (Arvola et al, 1999 ; Vanderhoof et al, 1999).

L'effet des préparations contenant des bactéries lactiques tuées a été évalué dans deux études contrôlées. Au Chili, deux groupes d'enfants de moins de 12 mois recrutés dans deux centres différents, ont reçu soit un lait contenant deux souches bactériennes tuées (*S. thermophilus* et *L. lactis*), soit un lait comparable sans les bactéries, pendant 6 mois. L'incidence et la durée des diarrhées bactériennes ou parasitaires a été moindre dans le groupe recevant le lait fermenté par les bactéries lactiques (Brunser et al, 1989). En France, la consommation d'un autre type de lait contenant des bactéries lactiques tuées (*S. thermophilus* et *B. breve*) a diminué la sévérité des épisodes de diarrhées chez des nourrissons en crèche (n> 900), âgés de 4 à 6 mois et suivis pendant 5 mois, en comparaison avec une préparation lactée standard. En revanche, ni l'incidence, ni la durée des épisodes de diarrhées n'étaient significativement différentes entre les deux laits (Goulet et al, 2001).

Conclusions :

- Certaines souches de *Lactobacillus* réduisent la durée et améliorent les symptômes des diarrhées infectieuses chez l'enfant. L'effet est modéré mais significatif. Il est toutefois à noter que ces probiotiques ont été administrés indépendamment de l'alimentation dans la majorité des études.
- L'importance de l'effet dépend de la dose de *Lactobacillus* et du type de diarrhée, l'effet semblant plus marqué lors des diarrhées à *Rotavirus*.
- Certains probiotiques (*Bifidobacterium lactis* Bb-12) ont un effet préventif. Les études sont néanmoins encore peu nombreuses, et ont été limitées à des populations de nourrissons vivants en centre de moyen ou long séjour.
- Des préparations à base de lait fermenté par des souches de bactéries lactiques ensuite tuées pourraient avoir des effets positifs sur l'incidence et la sévérité des diarrhées. Les études sont encore insuffisamment nombreuses.
- L'effet des prébiotiques n'est pas connu.

c. Autres infections

La consommation de certains probiotiques pourrait améliorer les symptômes d'infections non gastro-intestinales (urogénitales, respiratoires, etc.) chez l'adulte. De tels effets chez l'enfant n'ont pas encore été publiés. En revanche, une étude contrôlée, randomisée, en double aveugle, a été conduite chez des enfants, d'âge moyen 4 ans et demi, fréquentant une crèche d'Helsinki en Finlande (Hatakka et al, 2001). Environ un quart de litre de lait supplémenté ou non en *Lactobacillus GG* (10^6 cfu/ml) a été consommé quotidiennement par ces enfants pendant 7 mois en hiver. Le nombre de jours avec des symptômes respiratoires ou gastrointestinaux, le nombre de jours d'absence pour raisons de maladies, d'infections respiratoires diagnostiquées par un médecin, et le nombre de jours sous antibiothérapie ont été calculés. Les résultats démontrent que les enfants traités par *L. GG* ont été moins absents à cause de maladies, que le nombre d'enfants souffrant d'infections respiratoires a été diminué de 17% dans ce groupe, et que les traitements antibiotiques pour infection respiratoire ont été réduits de 19%. Une autre étude du même type et concernant des enfants américains en bonne santé, âgés de 4 à 24 mois, a conclu aussi à un bénéfice modeste mais réel de la supplémentation de l'alimentation avec des FOS (environ 1 g/j) sur le nombre d'épisodes de fièvre associés à des rhumes et sur l'utilisation d'antibiotiques lors d'infection respiratoire (Saavedra & Tschernia, 2002).

Conclusions :

- Certains probiotiques (*L. GG*) pourraient avoir un intérêt modeste mais néanmoins réel pour réduire le risque d'infections et l'utilisation d'antibiotiques chez le jeune enfant. Toutefois, les données actuellement publiées sont insuffisantes pour établir cet intérêt.
- Certains prébiotiques (FOS) pourraient avoir des effets similaires. Là encore, d'autres données sont indispensables.
- Les effets éventuels des micro-organismes tués ne sont pas connus.

d. Infection à *Helicobacter pylori*

Des données expérimentales *in vitro* et chez l'animal suggèrent que certaines bactéries lactiques pourraient inhiber la prolifération d'*H. pylori*. Les données chez l'homme sont encore peu nombreuses, mais encourageantes (Michetti et al, 1999 ; Felley et al, 2001). Le niveau de preuve est néanmoins considéré comme encore insuffisant pour toute recommandation nutritionnelle ou prescription médicale. A la connaissance du groupe de travail, il n'existe aucune donnée publiée chez l'enfant.

e. Entérocolite nécrosante

Le bénéfice de certains probiotiques dans le traitement ou la prévention des inflammations intestinales a été montré dans différents modèles animaux (Madsen et al, 1991 ; Schultz et al, 2002). Plus récemment, l'éventuel intérêt de certains prébiotiques a été également suggéré grâce à ces modèles animaux (Videla et al, 2001). Enfin, quelques études cliniques contrôlées réalisées chez le patient adulte ont confirmé l'intérêt de certains mélanges de probiotiques (Gionchetti et al, 2000), et peut-être de certains prébiotiques (Welters et al, 2002).

Les maladies inflammatoires les plus susceptibles de survenir chez les nourrissons sont l'entérocolite nécrosante (ECN) et les entérocolites allergiques. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique) atteignent des enfants plus âgés non inclus dans le champ du groupe de travail. Elles n'ont donc pas été traitées dans ce rapport. Les quelques données disponibles concernant les entérocolites allergiques ont été intégrées dans le paragraphe consacré aux allergies. L'ECN néonatale est l'urgence gastrointestinale la plus fréquente chez les enfants prématurés. Sa physiopathologie demeure mal comprise et la conjonction de plusieurs facteurs semble intervenir dans sa survenue. L'alimentation est un des facteurs impliqués, et il a été montré une réduction du risque avec le lait de femme en comparaison aux préparations pour nourrissons (Lucas et al, 1990). Toutefois, les mécanismes protecteurs du lait de femme ne sont pas clairement établis. La présence de bactéries dans l'intestin est un pré-requis pour le développement de l'ECN. La flore bactérienne des prématurés hospitalisés en unités de soins intensifs diffère significativement de celle des enfants nés à terme et pourrait constituer un des éléments déclencheurs de l'inflammation intestinale. C'est pourquoi il a été suggéré que l'administration de certains probiotiques puisse apporter un bénéfice à ces enfants. Quelques études réalisées à l'aide de modèles animaux confortent cette hypothèse (Butel et al, 1998 ; Caplan & Jilling, 2000). Néanmoins, à la connaissance du groupe de travail, aucune étude clinique n'a démontré jusqu'à présent l'intérêt de ces probiotiques dans la prévention et le traitement de l'ECN chez les prématurés. L'effet des prébiotiques est également inconnu. De plus, concernant les prébiotiques, il doit être démontré que l'administration de ces ingrédients ne favorise pas la prolifération de germes colonisant l'intestin des prématurés et supposés augmenter le risque d'ECN.

Conclusions :

• Des données chez l'animal suggèrent que l'administration de certains probiotiques pourraient réduire l'incidence et la gravité de l'ECN chez les prématurés. Il n'existe pas de données chez le nouveau-né humain prématuré.

V- Intérêt de l'utilisation des probiotiques, prébiotiques et autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale chez le nourrisson et le jeune enfant en bonne santé

L'utilisation des probiotiques, prébiotiques et autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale chez le nourrisson et le jeune enfant en bonne santé est fondée sur l'hypothèse que ces produits pourraient aider à maintenir le bien-être et la santé de l'enfant et réduire le risque de maladies intestinales, allergiques et respiratoires pendant la durée de l'allaitement. L'hypothèse a été étendue à une participation à la réduction du risque à long-terme des pathologies dégénératives (cancers, maladies cardiovasculaires, etc.). Plusieurs aspects sous-jacents à ces hypothèses nécessitent un commentaire.

Tout d'abord, on ne sait pas mesurer la santé dans sa globalité. Ensuite, il n'y a pas d'études indiquant si la consommation régulière d'un lait contenant un probiotique ou un prébiotique aide à mieux maintenir la santé que les autres mesures hygiéniques, diététiques et comportementales. A ce jour, une seule étude a montré un bénéfice modeste d'un probiotique sur l'incidence des infections respiratoires et l'utilisation d'antibiotiques chez des enfants d'une même ville (Helsinki, Finlande), allant à la crèche (Hataka et al, 2001). Une étude du même type, réalisée aux Etats-Unis, indique que l'addition de fructo-oligosaccharides dans les préparations de suite chez des enfants d'environ 12 mois pourrait conduire à un bénéfice semblable (Saavedra and Tschernia, 2002). Quelques études suggèrent également que certains probiotiques possèdent un effet prophylactique sur les diarrhées à *Rotavirus* et peut-être sur l'incidence de l'eczéma atopique. Néanmoins, d'autres études multicentriques et randomisées sur les facteurs âge, sexe, race, statut nutritionnel, statut socio-économique, etc., sont indispensables pour donner du crédit à l'idée que la consommation de laits supplémentés en probiotiques ou prébiotiques seront bénéfiques aux enfants en bonne santé.

L'intérêt d'une modulation de la flore intestinale de jeunes enfants en bonne santé reste controversé. L'idée repose sur la composition bactérienne de la flore des nourrissons allaités au lait maternel, composition supposée « idéale ». Les nouveaux résultats d'analyse du profil bactérien de la flore fécale des nouveau-nés et enfants en bas-âge, obtenus avec des méthodes moléculaires, montrent que la distinction entre les enfants nourris au sein et ceux nourris avec une préparation lactée n'est pas aussi nette qu'on a pu le penser jusque dans un passé récent (cf. III.a). En outre, l'impact d'une consommation régulière de probiotiques ou prébiotiques sur la mise en place de la flore dominante et sous-dominante chez le nouveau-né n'est pas clairement établi: l'implantation de micro-organismes commensaux possiblement bénéfiques ne risque-t-elle pas d'être inhibée par l'ingestion de probiotiques lorsque la flore n'est pas encore établie de façon stable ? A l'inverse, des micro-organismes pouvant avoir des effets néfastes ne risquent-ils d'être favorisés par des prébiotiques ? Un autre point à considérer est la production d'acides organiques lors de la fermentation et la maturation de la capacité fermentaire de la flore intestinale. L'allaitement maternel favorise la production d'acide acétique et d'acide lactique et abaisse le pH fécal. Ces facteurs sont considérés comme favorables à la résistance contre les micro-organismes pathogènes, car les acides acétique et lactique sont bactériostatiques, et le pH acide ne promeut pas la prolifération des agents pathogènes. Toutefois, le maintien d'une flore et d'un profil d'AGCC simplifiés pendant une durée excessive pourrait aussi avoir des inconvénients ; ainsi, la maturation de la capacité fermentaire des enfants pourrait être retardée et représenter un handicap au moment de la diversification alimentaire. L'impact de ces nouveaux produits lors de l'introduction d'aliments non lactés devrait être envisagé.

Toutes ces remarques indiquent que plus de travaux de recherche sont nécessaires. Jusqu'à présent, la majorité des recherches a porté sur les enfants à risque de troubles gastrointestinaux ou d'allergies. Il est indispensable d'en savoir plus sur les enfants en bonne santé et sur les fonctions « normales » de la flore intestinale.

VI- Sécurité d'emploi des probiotiques, prébiotiques et autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale dans l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant

a. Les problèmes rencontrés ou possibles

i. Allergie

A la connaissance du groupe, un seul cas d'accident allergique a été rapporté avec l'ingestion d'inuline chez un sujet adulte (Gay-Crosier et al, 2000). Le groupe de travail n'a trouvé aucun élément indiquant un risque particulier lié à l'utilisation de glucides indigestibles, sans contaminants protéiques, chez l'adulte et chez l'enfant. De la même façon, aucune donnée n'a été trouvée suggérant un risque d'accident allergique avec des probiotiques.

Chez les nourrissons à risque allergique élevé (antécédents familiaux), il est conseillé de retarder la diversification alimentaire jusqu'à l'âge de 6 mois. L'introduction de prébiotiques ou symbiotiques dès la naissance nécessiterait de mettre en place un suivi spécifique pour ces nouveau-nés à risque.

Conclusions :

- A ce jour et à la connaissance du groupe, aucune manifestation allergique associée à l'ingestion de prébiotiques, probiotiques ou symbiotiques n'a été décrite chez des nourrissons et des enfants en bas-âge.
- Néanmoins, un suivi spécifique des nouveau-nés avec des antécédents familiaux d'allergie serait nécessaire lors de l'ingestion de préparations contenant des prébiotiques ou symbiotiques.

ii. Résistance aux antibiotiques

Les échanges génétiques sont fréquents au sein de la microflore, c'est sans doute un facteur positif d'évolution. La microflore digestive contient des populations bactériennes renfermant des éléments génétiques mobiles (transposons, plasmides). De plus la lyse bactérienne dans le tractus digestif conduit au relargage d'ADN bactérien qui peut être incorporé (en tout petit nombre) par des bactéries de la microflore. Des transferts de gènes de pathogénicité, en particulier des gènes de résistances aux antibiotiques sont donc théoriquement possibles dans la microflore intestinale, et les probiotiques pourraient constituer soit des donneurs de gènes, soit des receveurs intermédiaires ou définitifs.

Un contrôle doit donc être effectué sur les souches probiotiques et la preuve que la souche ne contient pas de gènes de résistance aux antibiotiques portés par des éléments génétiques mobiles, donc transférables, doit être apportée. Ces résistances portées par des éléments mobiles sont à distinguer des résistances intrinsèques des espèces, considérées comme non transférables.

L'hypothèse que les probiotiques pourraient être des receveurs intermédiaires ou définitif de gènes de pathogénicité est peu probable, compte tenu de la durée de vie et de la faible prolifération dans le tube digestif des principaux probiotiques utilisés chez l'enfant. Cette hypothèse devrait cependant être testée dans des cas où le risque est important (par exemple résistance à la vancomycine). Néanmoins dans l'état actuel des connaissances, cette considération ne doit pas limiter la consommation de probiotiques.

Conclusion:

- Les souches utilisées comme probiotiques ou symbiotiques ne doivent pas contenir de facteurs de pathogénicité connus. En particulier, les souches contenant des résistances aux antibiotiques portées par des éléments génétiques mobiles et préjudiciables à l'homme doivent être exclues.

iii. Infections

Le risque d'infections par des probiotiques, en particulier par des lactobacilles et des bifidobactéries, est considéré comme négligeable pour la population adulte en bonne santé. Par exemple, en Finlande, le nombre de cas de bactériémies à *L. GG* a été évalué à 0,3 cas pour 100 000 personnes/an, alors que ce probiotique est très fortement consommé dans ce pays (Salminen et al, 2002). En revanche, des cas d'infections provoquées par des bactéries de même espèce que les probiotiques usuels ont été rapportés chez des patients ayant de graves problèmes de santé, avec des défenses immunitaires diminuées (Rautio et al, 1999 ; Mackay et al, 1999 ; Antony, 2000 ; Marteau, 2001), présentant une rupture de la barrière intestinale (Farina et al, 2001), atteints de valvulopathies ou porteuses d'un cathéter central (Jureen et al, 2001).

Chez le nourrisson et l'enfant en bas-âge en bonne santé, aucune donnée n'a été trouvée par le groupe de travail montrant un risque d'infection par un probiotique ou une augmentation du risque d'infections par des micro-organismes virulents avec des prébiotiques.

Egalement, à la connaissance du groupe, aucun cas d'infection liée à l'ingestion de probiotiques et/ou de prébiotiques n'a été rapporté chez les prématurés. Néanmoins, les connaissances étant actuellement très insuffisantes dans cette population, le groupe recommande que des études spécifiques soient réalisées chez les prématurés avant que les préparations contenant des probiotiques et/ou des prébiotiques soient utilisées de manière plus large, d'autant que cette population est caractérisée par son immaturité immunologique.

Conclusions :

- Dans l'état actuel des connaissances, les préparations contenant des probiotiques, des prébiotiques ou symbiotiques sont à éviter chez les enfants ayant un déficit immunitaire congénital ou acquis (traitement par immunosuppresseurs, corticothérapie, etc.).
- Le risque d'infection lié à l'utilisation de probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques chez les nouveau-nés prématurés étant inconnu, des études spécifiques doivent être réalisées chez ces enfants.
- D'une façon générale, la capacité de résistance des souches probiotiques aux défenses innées de l'hôte devrait être évaluée avant l'utilisation de la souche dans des aliments pour nouveau-nés et enfants en bas-âge.

iv. Diarrhée osmotique

Comme déjà indiqué ci-dessus (III-d.), certains prébiotiques sont des glucides indigestibles de petite taille moléculaire (disaccharides ou oligosaccharides) qui pourraient induire à forte dose une diarrhée osmotique. La concentration de ces ingrédients dans les préparations doit donc être limitée de façon à ce qu'une consommation maximale de préparation apporte une quantité de prébiotiques nettement inférieure (valeur de sécurité) à la valeur déclenchant une diarrhée. D'autre part, la concentration des prébiotiques dans les préparations de suite doit être raisonnée en prenant en compte la présence possible d'autres substrats indigestibles dans la préparation (émulsifiants, colloïdes, sucres-alcools édulcorants, fibres, etc.) et dans l'alimentation de l'enfant.

Conclusions :

- La dose de prébiotiques, si ceux-ci sont osmotiquement actifs, doit être limitée et ne pas représenter de risque pour la balance hydrique des nourrissons. Fixation en l'état actuel des connaissances par le CSAH d'une concentration maximale de 0,8 gramme pour 100 mL de produit prêt à l'emploi d'un mélange 10% FOS-90% GOS pour les préparations pour nourrissons et les préparations de suite (avis du 13 décembre 2001).
- La quantité de prébiotiques apportée par la préparation doit être raisonnée en prenant en compte les autres substrats indigestibles apportés par la préparation et par l'alimentation de l'enfant.

v. Douleurs abdominales

Des symptômes d'inconfort intestinal, principalement un excès de flatulences quelquefois associé à des ballonnements et/ou des crampes abdominales, ont été rapportés par des sujets adultes lors de la consommation de certains prébiotiques. L'effet dépend de la nature du prébiotique (les courtes chaînes semblant moins bien tolérées), de la dose ingérée, du mode de consommation (la prise isolée en dehors d'un repas favorisant les symptômes), et aussi de l'individu, certains sujets étant plus sensibles que d'autres. L'origine de cette différence pourrait provenir du profil bactérien des sujets et de leur capacité à produire des gaz. L'effet des prébiotiques sur la production de gaz et le confort intestinal des enfants est mal caractérisé. Une étude a montré que la production de gaz chez les nourrissons était fortement influencée par l'alimentation, les enfants nourris au sein étant plus fortement producteurs d'hydrogène que ceux recevant des préparations, mais plus faiblement producteurs de gaz sulfurés (Jiang et al, 2001). La possibilité d'un inconfort intestinal des enfants, lors de la prise de préparations contenant des prébiotiques, devrait donc être considérée par l'industriel. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, aucune restriction d'emploi liée à cette question n'est justifiée.

b. Les groupes potentiellement à risque

- Le risque d'infections opportunistes est plus élevé chez les enfants ayant un déficit immunitaire, congénital ou acquis. C'est pourquoi, dans l'état actuel des connaissances, les préparations contenant des probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques sont déconseillées chez ces d'enfants.
- La supplémentation de l'alimentation des prématurés avec des probiotiques, des prébiotiques ou des symbiotiques nécessiterait l'étude préalable de l'impact de ces aliments sur la flore du nouveau-né prématuré. Il n'est en effet pas possible d'extrapoler les effets décrits chez le nourrisson né à terme aux effets potentiels chez le nouveau-né prématuré n'abritant pas forcément dans sa flore intestinale les mêmes espèces bactériennes.

c. Les tests préconisés

Afin d'assurer la sécurité de l'utilisation des préparations contenant des probiotiques, prébiotiques, symbiotiques ou des bactéries tuées, il est nécessaire de vérifier la sécurité des ingrédients pour la dose recommandée, la fréquence d'association de l'espèce bactérienne avec une infection ou une allergie, la fréquence d'association de l'ingrédient avec une allergie, l'éventuelle production de métabolites délétères ou de toxines, etc. Il est également nécessaire de considérer les consommateurs qui pourraient présenter des risques plus importants d'effets indésirables avec ces produits (cf. VI-b).

- Pour les probiotiques ou les microorganismes non vivants présents dans les préparations, les critères permettant l'évaluation de l'innocuité du microorganisme sont ceux qui ont été recommandés par l'Afssa (Rapport Afssa, 2002).
- Pour les prébiotiques, les critères d'évaluation de l'innocuité sont ceux classiquement utilisés pour les ingrédients. De plus, des effets secondaires pouvant survenir avec certains prébiotiques si la dose employée est trop élevée (induction de diarrhées osmotiques, production excessive de gaz), il est recommandé de limiter cette dose.

d. La mise en place d'une veille

L'utilisation de préparations contenant des probiotiques, prébiotiques, symbiotiques ou microorganismes non vivants étant relativement récente pour certaines d'entre elles, la mise en place d'une veille ou vigilance (nutrivi-gilance pour faire un parallèle avec pharmacovigilance) est nécessaire pour mieux identifier les éventuels effets indésirables. Un tel système pourrait aussi être utilisé pour évaluer les bénéfices à long-terme de ces produits.

VII- Lignes directrices pour l'utilisation de probiotiques, prébiotiques et autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale, dans des préparations pour nourrissons et de suite

a. Sélection, classification et identification des souches probiotiques

- La sélection des probiotiques utilisées en alimentation infantile doit reposer sur les preuves de leur sécurité (cf. VI.c) et de leur efficacité, dans les conditions recommandées d'utilisation, pour la population ciblée, avec le mode d'administration et la dose préconisés.
- La majorité des probiotiques utilisés en alimentation infantile sont des bactéries à Gram positif, appartenant principalement aux deux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Néanmoins, le groupe de travail n'exclut pas la possibilité que d'autres micro-organismes ou d'autres genres bactériens puissent être utilisés dans l'avenir à condition qu'ils répondent parfaitement aux critères de sécurité et d'efficacité.
- La nomenclature des bactéries probiotiques doit se conformer aux noms courants, scientifiquement reconnus. L'utilisation d'anciennes nomenclatures ou de noms pouvant créer des confusions dans l'esprit du consommateur, par exemple *Lactobacillus plantarum serenitas*, n'est pas acceptable.
- L'hybridation ADN-ADN est la méthode de référence pour spécifier l'appartenance d'une souche à une espèce. La caractérisation de la souche doit ensuite être réalisée avec une méthode génétique reconnue telle que, par exemple, l'électrophorèse en champ pulsé (cf. Rapport de l'AFSSA, 2002).
- L'activité d'un probiotique est spécifique à la souche et ne peut pas être extrapolée à une autre souche de la même espèce. C'est pourquoi, toute généralisation de l'effet d'un probiotique à l'espèce bactérienne est hasardeuse et doit être prohibée.
- Les mêmes principes de sélection, caractérisation et identification doivent être appliqués aux micro-organismes tués et aux symbiotiques.

b. Procédés d'obtention et caractérisation des prébiotiques

- Les produits ou organismes à l'origine de l'ingrédient prébiotique doivent être connus et caractérisés, qu'il s'agisse d'un ingrédient extrait/isolé d'un produit végétal, animal ou microbien, ou d'un ingrédient produit par synthèse chimique ou microbienne.
- Les procédés d'obtention doivent être décrits.
- La ou les molécules actives doivent être identifiées(s) et caractérisées(s), et leur concentration dans le produit doit être précisée.
- Les microorganismes ciblés par l'ingrédient prébiotique doivent être identifiés aussi complètement que possible.
- Les mêmes principes de caractérisation des matières premières d'origine, des procédés d'obtention et des principes actifs doivent être appliqués aux produits contenant des micro-organismes tués, et aux symbiotiques.
- Dans le cas des symbiotiques, toute relation alléguée entre le prébiotique et le probiotique (amélioration de la survie et/ou de l'activité du probiotique, par exemple) doit être démontrée.

c. Sécurité d'emploi

- L'innocuité des probiotiques ou des microorganismes non vivants présents dans les préparations doit être évaluée selon les recommandations de l'AFSSA (Rapport AFSSA, 2002).
- L'innocuité des prébiotiques est évaluée selon les critères classiquement utilisés pour les ingrédients déjà autorisés.
- La dose de prébiotiques, si ceux-ci sont osmotiquement actifs, doit être limitée et ne pas représenter de risque pour la balance hydrique des nourrissons.
- Dans l'état actuel des connaissances, les préparations contenant des probiotiques, des prébiotiques ou des symbiotiques sont à éviter chez les enfants ayant un déficit immunitaire congénital ou acquis (traitement par immunosuppresseurs, corticothérapie, etc.).
- Le risque d'infection lié à l'utilisation de probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques chez les nouveau-nés prématurés étant actuellement inconnu, des études spécifiques doivent être réalisées chez ces enfants.

d. Conservation des préparations et recommandations d'utilisation

- La viabilité et l'identité des probiotiques, et la stabilité des prébiotiques doivent être vérifiées régulièrement dans les préparations au cours de leur stockage.
- La concentration de probiotiques et de prébiotiques actifs doit être connue au moment et au-delà de la date limite de consommation.
- La viabilité et l'activité des probiotiques, la stabilité des prébiotiques, l'innocuité de ces ingrédients doivent être maintenues au travers des transformations, manipulations et stockage des préparations contenant ces ingrédients. Par exemple :
 - Les biberons étant souvent préparés pour 24 h dans les collectivités, la viabilité des probiotiques et la stabilité des prébiotiques doivent être évaluées dans ces conditions, ainsi que l'éventuelle prolifération bactérienne liée à la présence de ces ingrédients dans les biberons.
 - Il doit être clairement indiqué que le chauffage excessif (par exemple avec l'utilisation des micro-ondes) des biberons entraîne la mort des probiotiques et donc la disparition des effets associés à leur présence.
- La recommandation de n'utiliser que de l'eau très peu minéralisée dans la préparation des biberons doit être accompagnée d'une mise en garde vis-à-vis du recours à des eaux considérées comme laxatives quand le lait contient des prébiotiques.
 - Les conditions de conservation des préparations (température, humidité, etc.) par les utilisateurs doivent être indiqués sur l'emballage.

e. Démonstration des effets physiologiques et cliniques

La démonstration de l'innocuité et des effets nutritionnels, physiologiques et/ou thérapeutiques des préparations pour nourrissons et de suite doit s'appuyer sur des essais réalisés chez des nourrissons et/ou des enfants en bas-âge. Ces études doivent être réalisées selon les bonnes pratiques des essais cliniques et les bonnes pratiques de laboratoire. Bien entendu, elles doivent avoir obtenu l'autorisation d'un comité consultatif de protection des personnes en recherche biomédicale (CCPPRB) et le consentement éclairé des parents. L'évaluation du niveau de preuve apporté par les résultats de ces études s'appuiera sur les critères suivants (Aggett et al, 2001 ; Koletzko et al, 2002):

i. Groupes ciblés, environnement, nombre d'enfants à inclure

- Les études sont réalisées chez des enfants représentatifs des groupes d'enfants ciblés par la préparation et/ou l'allégation (âge, conditions de santé, etc.).
- L'environnement dans lequel évoluent les enfants est clairement caractérisé et son éventuel impact sur les résultats de l'étude est évalué (e.g. crèches par rapport « à la maison », unités de néonatalogie, etc.).
- Un nombre suffisant d'enfants doit être inclus dans l'étude de façon à obtenir une signification statistique élevée (valeur de P au moins inférieure à 0.05).

ii. Protocole de l'étude

- Les essais doivent être contrôlés et inclure un groupe 'placebo' et/ou témoin. Le placebo doit être une préparation de même composition que la préparation testée dans laquelle les composants supposés actifs (probiotiques ou prébiotiques) sont absents ou inactivés. Lorsque que le protocole de l'essai ne permet pas d'utiliser un 'placebo', un groupe d'enfants témoins ne recevant pas la préparation doit être inclus dans l'essai. Des enfants de caractéristiques équivalentes mais nourris exclusivement au sein constitueraient un groupe de 'témoins' idéaux.
- La répartition des enfants dans les différents groupes doit être randomisée.
- La distribution du 'placebo' et de la préparation testée doit se faire en double-aveugle (ni l'expérimentateur, ni les parents de l'enfant n'ont connaissance du type de préparation distribuée).
- La possibilité d'évènements indésirables survenant au cours de l'essai doit être prise en compte et l'étude doit comporter une procédure permettant un suivi indépendant des données.
- Un suivi des enfants inclus dans l'essai est recommandé pour déterminer si les marqueurs biologiques retournent à l'état initial ou si la pathologie récidive ou s'aggrave après l'arrêt de la préparation contenant des probiotiques ou des prébiotiques.

iii. Doses et mode d'administration

- L'innocuité et les effets nutritionnels, physiologiques et/ou thérapeutiques des préparations doivent être démontrés avec la préparation telle qu'elle sera commercialisée, et dans les conditions d'utilisation recommandées.
- La dose active de probiotiques ou de prébiotiques ajoutés doit être déterminée. Elle devrait être basée sur une relation dose-effet indiquant la dose minimale nécessaire pour obtenir un effet et la dose maximale produisant un effet maximal sans aucun effet secondaire ou négatif. La quantité minimale et maximale de la préparation finie à consommer pour obtenir un effet sans effet secondaire négatif doit être connue.
- La durée d'utilisation de la préparation devrait aussi être déterminée selon les mêmes principes.

iv. Choix des critères principaux et des biomarqueurs

- L'essai destiné à démontrer un effet fonctionnel et/ou thérapeutique devrait être focalisé sur des critères principaux tels que la capacité de la préparation à moduler un biomarqueur ou une série de biomarqueurs rendant compte d'une fonction physiologique, ou bien à prévenir, traiter ou retarder des épisodes pathologiques.
- L'évaluation de critères secondaires peut aussi être inclus dans l'essai.
- Les critères principaux et secondaires étudiés doivent être pertinents et adaptés à la population étudiée. A titre d'exemple, pour les diarrhées infectieuses, le critère principal pourrait être la réduction des cas de déshydratation grave dans les pays en voie de développement, alors que dans d'autres pays (en Europe en particulier), cela pourrait être la réduction de la fréquence et/ou de la durée des épisodes diarrhéiques.
- De la même façon, les biomarqueurs mesurés doivent rendre compte du fonctionnement de la fonction ciblée pour la population ciblée, et leur modulation doit être associée à des événements bénéfiques ou néfastes pour la santé.

v. Nombre d'études indépendantes

- Il est souhaitable qu'au moins deux études indépendantes corroborent les effets physiologiques et/ou thérapeutiques d'une préparation.

vi. Recherche des mécanismes d'action

- La démonstration des effets physiologiques et/ou thérapeutiques d'une préparation contenant des probiotiques ou des prébiotiques doit être accompagnée d'un effort d'explication des mécanismes impliqués.
- Des études expérimentales (*in vitro* et/ou *in vivo*) devraient être réalisées avec les préparations ou leurs ingrédients supposés actifs pour élucider les mécanismes moléculaires à l'origine des effets bénéfiques observés.

vi. Présentation des résultats

- Quels qu'ils soient (positifs, négatifs ou neutres), les résultats de ces études doivent être présentés soit sous forme de publications scientifiques dans des revues à comité de lecture, soit sous forme de dossiers respectant les critères de qualité d'une publication de valeur scientifique reconnue.

f. Etiquetage

- Le nom exact du probiotique ou des micro-organismes utilisés pour la fermentation (espèce microbienne et souche, tel que défini en VII.a), ou du principe actif de l'ingrédient prébiotique, ou des autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale des nourrissons et jeunes enfants, doit figurer sur l'emballage.
- La concentration du probiotique, symbiotique ou du principe actif de l'ingrédient prébiotique dans la préparation, jusqu'à la date limite de consommation, doit figurer sur l'emballage.
- La dose et la durée d'utilisation minimales pour l'effet allégué doivent être indiquées sur l'emballage.
- Les recommandations de conservation et d'utilisation de la préparation (cf. VII.d) doivent apparaître sur l'emballage.

g. Communication sur les produits

Les allégations faisant un lien entre alimentation et santé sont réglementées, d'une part au niveau communautaire par des dispositions générales sur la présentation des denrées alimentaires,

d'autre part au niveau national par des dispositions des codes de la santé et de la consommation. Un cadre réglementaire plus spécifique, européen et français, est cependant en attente. Concernant la spécificité des produits pédiatriques, seule est prévue l'interdiction des allégations pour les préparations pour nourrissons en dehors de celles fixées par les dispositions particulières contenues dans les annexes de la Directive européenne 91/321/CE et de l'arrêté modifié du 1^{er} juillet 1976. C'est pourquoi, l'Afssa a mené une réflexion approfondie sur la nécessité d'une approche spécifique des allégations utilisées pour les aliments à usage pédiatrique (rapport de l'Afssa, 2001). Les propositions faites dans ce cadre de réflexion s'appliquent parfaitement au domaine traité dans le présent rapport, à savoir l'utilisation en alimentation infantile des probiotiques, prébiotiques ou autres ingrédients destinés à modifier la flore intestinale des enfants.

h. Suivi après la mise sur le marché

- Un suivi des enfants recevant ou ayant reçu des préparations contenant des probiotiques, des prébiotiques ou symbiotiques serait utile pour identifier les éventuels incidents, mais aussi pour évaluer les bénéfices sur un terme plus long que celui habituellement pris en compte dans les essais.
- La nature du suivi et les modalités de sa mise en place doivent être définies en concertation entre les experts, les pouvoirs publics et l'industrie.

Références bibliographiques

Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2001) Allégations nutritionnelles relatives aux préparations pour nourrissons et préparations de suite. Rapport du comité d'experts spécialisé Nutrition humaine de l'AFSSA du 13 novembre 2001. <http://www.afssa.fr>

Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2002) Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'inocuité des micro-organismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire. Souches nouvelles ou modifiées- Applications différentes de souches déjà utilisées. Rapport du comité d'experts spécialisé Microbiologie de l'AFSSA du 22 novembre 2002. <http://www.afssa.fr>

Aggett PJ, Agostoni C, Goulet O, Hernell O, Koletzko B, Lafeber HL, Michaelsen KF, Rigo J, Weaver LT (2001) The nutritional and safety assessment of breast milk substitutes and other dietary products for infants : a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32 : 256-258.

Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G (1999) Atopy in children of families with anthroposophic lifestyle. *Lancet* 353 : 1485-1488.

Antony SJ (2000) Lactobacillæmia : an emerging cause of infection in both the immunocompromised and the immunocompetent host. *J Natl Med Assoc* 92 : 83-86.

Armstrong EF, Eastwood MA, Edwards CA, Brydon WG, MacIntyre CCA (1992) The effect of weaning diet on the subsequent colonic metabolism of dietary fibre in the adult rat. *Br J Nutr* 68 : 741-751.

Arvola T, Laiho K, Torkkeli S, Mykkänen H, Salminen S, Maunula L, Isolauri E (1999) Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhoea in children with respiratory infections : a randomized study. *Pediatrics* 104 : 1-4.

Balmer SE, Wharton BA (1989) Diet and faecal flora in the newborn : breast milk and infant formula. *Arch Dis Child* 64 : 1678-1684.

Björkstén B, Dumitrescu D, Foucard T, Khetsuriani N, Khaitov R, Leja M, Lis G, Pekkanen J, Priftanji A, Riiikjarv MA (1998) Prevalence of childhood asthma, rhinitis and eczema in Scandinavia and Eastern Europe. *Eur Respir J* 12 : 432-437.

Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 29 : 342-346.

Blum S, Haller D, Pfeifer A, Schiffrin EJ (2002) Probiotics and immune response. *Clin Rev Allergy Immunol* 22 : 287-309.

Boehm G, Lidestri M, Casetta P, et al (2002) Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch Dis Child* 86 : F178-F181.

Bofill M, Akbar AN, Salmon M, Robinson M, Burford G, Janossy G (1994) Immature CD45R (low) T cells in the human cord blood. I. Antecedents of CD45RA+ unprimed T cells. *J Immunol* 152 : 5613-5623.

Brabäck L, Hedberg A (1998) Perinatal risk factors for atopic disease in conscripts. *Clin Exp Allergy* 28 : 936-942.

Brown K, Black R, Lopez de Romana G, Creed de Kanashiro H (1989) Infant-feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. *Pediatrics* 83 : 31-40.

Brunser O, Araya M, Espinoza J, Guesry PR, Secretin MC, Pacheco I (1989) Effect of an acidified milk on diarrhea and the carrier state in infants of low socio-economic status. *Acta Paediatr Scand* 78 : 259-64.

Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI (1996) A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science* 273 : 1380-1383.

Bullen CL, Tearle PV, Stewart MG (1977) The effects of humanised milks and supplemented breast milk on the faecal flora of infants. *J Med Microbiol* 10 : 403-413.

- Butel MJ, Roland N, Hibert A, et al (1998) Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol* 47 : 391-399.
- Caplan MS, Jilling T (2000) Neonatal necrotizing enterocolitis: possible role of probiotic supplementation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30 : S18-S22.
- Chouraqui JP, van Egroo LD, Fichot MC (1998) Prevention of diarrhea by feeding infants with an acidified milk formula containing *Bifidobacterium bifidum*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26 (suppl) : 539 (résumé).
- Clemens J, Rao M, Ahmed F, Ward R, Huda S, Chakraborty J, Yunus M, Khan MR, Ali M, Kay B, van Loon F, Sack D (1993) Breast-feeding and the risk of life-threatening *Rotavirus* diarrhea: prevention or postponement? *Pediatrics* 92 : 680-685.
- Clemens JD, Stanton B, Stoll B, Shahid NS, Banu H, Chowdhury AK (1986) Breast feeding as a determinant of severity in shigellosis. Evidence for protection throughout the first three years of life in Bangladeshi children. *Am J Epidemiol* 123 : 710-720.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28 : 1221-1227.
- Duffy LC, Byers TE, Riepenhoff-Talty M, La Scolea LJ, Zielezny M, Ogra PL (1986) The effects of infant feeding on *Rotavirus*-induced gastroenteritis: a prospective study. *Am J Public Health* 76 : 259-263.
- Durandy A (2001) Développement de l'immunité spécifique au cours de la vie prénatale. *Arch Pediatr* 8 : 979-985.
- Durandy A, de Saint Basile G, Lisowska-Groszpiere B, et al (1995) Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* 154 : 1560-1568.
- Durandy A, Thuillier L, Forveille M, Fischer A (1990) Phenotypic and functional characteristics of human newborns' B lymphocytes. *J Immunol* 144 : 60-65.
- Edwards CA, Hepburn IC, Segal I, Hassan H, Vorster E, Oosthuizen W, Kruger S (1998) Colonic fermentation capacity in young children from south African populations of low and high cancer risk. In « Functional properties of non digestible carbohydrates », Guillon F and Amado R (eds), pp. 222-224. Brussels : EU Commission DGXII.
- Edwards CA, Parrett AM, Balmer SE, Wharton BA (1994) Faecal short chain fatty acids in breast-fed and formula-fed babies. *Acta Paediatr Scand* 83 : 459-462.
- Fang H, Elina T, Heikki A, Seppo S (2000) Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29 : 47-52.
- FAO/WHO (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Argentina, October 2001. <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>
- Farina C, Arosio M, Mangia M, Moioli F (2001) *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* sepsis in a patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 33 : 251-252.
- Felley CP, Corthésy-Theulaz I, Rivero JLB, et al (2001) Favourable effects of an acidified-milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13 : 25-29.
- Firmansyah A, Pramita G, Carrie Fassler A, Haschke F, Link-Amster H (2001) Improved humoral immune response to measles vaccine in infants receiving infant cereal with fructo-oligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31, A521 (résumé).
- Flickinger EA, Hatch TF, Wofford RC, Grieshop CM, Murray SM, Fahey GC (2002) In vitro fermentation properties of selected fructooligosaccharide-containing vegetables and in vivo colonic microbial populations are affected by the diets of healthy human infants. *J Nutr* 132 : 2188-2194.
- Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T (1998) Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 42 : 39-44.
- Gay-Crosier F, Schreiber G, Hauser C (2000) Anaphylaxis from inulin in vegetables and processed food. *N Engl J Med* 342 : 1372.

- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J Nutr* 125: 1401-1412.
- Gionchetti P, Rizello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis : a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119 : 305-309.
- Goulet O, Thibault H, Gontier C, Blareau JP (2001) Less severe diarrhoeic episodes with consumption of a new fermented infant formula, FFC50 : a double blind randomised study in 968 French infants. *Ann Nutr Metabol* 45 (Suppl 1) : 557 (résumé).
- Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E (2000) Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy : a prospective follow up study in infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Neonatal Ed* 83 : F186-F192.
- Gronlund MM, Salminen S, Mykkanen H, Kero P, Lehtonen OP (1999) Development of intestinal bacterial enzymes in infants- relationship to mode of delivery and type of feeding. *APMIS* 107 : 655-660.
- Gutpa P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S (2000) Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease ? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31 : 453-457.
- Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ (1990) Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in infancy. *Arch Dis Child* 65 : 185-188.
- Hamaker BR, Rivera K, Morales E, Graham GG (1991) Effects of dietary fiber and starch on faecal composition in preschool children consuming maize amaranth or cassava flours. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 13 : 59-66.
- Harmsen HJM, Vibleboer-Veloo ACM, Rangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Wellings GW (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30 : 61-67.
- Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Ko R (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending care centres : double-blind, randomised trial. *Br Med J* 322 : 1327-1329.
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S (2001) Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30 : 43-47.
- Heavey PM, McBain AJ, Rumney CJ, Rowland IR, Savage SAH, Edwards CA (2000) Metabolic properties of faecal samples from breast fed and formula fed babies. *Proc Nutr Soc* 59 : 62A (résumé).
- Helin T, Haatela S, Haathtela T (2002) No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATC 53103), on birch-pollen allergy : a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 57 : 243-246.
- Howard MD, Gordon DT, Garleb KA, Kerley MS (1995) Dietary fructooligosaccharide, xylooligosaccharide and gum arabic have variable effects on cecal and colonic microbiota and epithelial cell proliferation in mice and rats. *J Nutr* 125 :2604-2609.
- Howard MD, Gordon DT, Pace LW, Garleb KA, Kerley MS (1995) Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21 : 297-303.
- Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD (1990) Protective effect of breast-feeding against infection. *Br Med J* 300 : 11-16.
- Hudault S (1996) Microbial colonization of the intestine of the newborn. In « Recent developments in infant nutrition », Bindels JG et al (eds), pp. 307-317. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.
- Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30 : 1604-10.
- Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T (1995) Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant *Rotavirus* vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13 : 310-312.

- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantal I, Virtanen E, Arvilommi H (1993) *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105 : 1643-1650.
- Jiang T, Suarez FL, Levitt MD, Nelson SE, Ziegler EE (2001) Gas production by feces of infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32 : 534-541.
- Johnsson G, Midtvedt AC, Norman A, Midtvedt T (1995) Intestinal microbial bile acid transformation in healthy children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 20 : 394-402.
- Juntunen M, Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Salminen SJ, Isolauri E (2001) Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during *Rotavirus* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 8 : 293-296.
- Jureen R, Sondana K, Hoiby EA, Digraanes A (2001) *Lactobacillus rhamnosus* septicaemia in a patient with a graft in the inferior vena cava. *Scand J Infect Dis* 34 : 135-136.
- Kaila M, Isolauri E, Arvilommi H, Vesikari T (1995) Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute *Rotavirus* diarrhoea. *Arch Dis Child* 72 : 51-53.
- Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease : A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357 : 1076-1079.
- Kien CL (1996) Digestion, absorption, and fermentation of carbohydrates in the newborn. *Clin Perinatol* 23 : 211-28.
- Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E (2002) Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants : a target of bifidobacterial therapy at weaning ? *Gut* 51 : 51-55.
- Kleesen B, Bunke H, Tovar K, Noack J, Sawatzki G (1995) Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora of newborn infants. *Acta Paediatr* 84 : 1347-1356.
- Koletzko B, Ashwell M, Beck B, Bronner A, Mathoudiakakis B (2002) Characterisation of infant food modifications in the European union. *Ann Nutr Metab* 46 : 231-42.
- Langhendries JP (2001) Prévention de l'allergie : et si tout (ou presque) se jouait à la naissance ? *Arch Pédiatr* 8 : 1037-1041.
- Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, Wilson CB (1991) Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon gamma production by neonatal T cells. *J Clin Invest* 87 : 194-202.
- Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10 : 55-63.
- Lodinova-Zadnikova R, Slavikova M, Tlaskalova-Hogenova H, Adlerberth I, Hanson LA, Wold A, Carlsson B, Svanborg C, Mellander L (1991) The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with *Escherichia coli* O83. *Pediatr Res* 29 : 396-399.
- Lucas A, Cole TJ (1990) Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 336 : 1519-1523.
- Lundequist B, Nord CE, Winberg J (1985) The composition of the faecal microflora in breast fed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr Scand* 74 : 45-51.
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDouglas L, Hollingsworth MA (1999) Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 276 : G941-G950.
- Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JMT (1999) *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clinical Microbiology and Infection* 5: 290-292.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 69 : 1035S-1045S.
- Maclean W, Fink B, Schoeller D, Wong W, Klein P (1983) Lactose assimilation by full term infants : relation of C13 and H2 breath tests with fecal C13 excretion. *Pediatr Res* 17: 629-33.

- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121:580-91.
- Majamaa H, Isolauri E (1997) Probiotics : a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99 : 179-185.
- Marteau P (2001) Safety aspects of probiotic products. *Scand J Nutr* 45: 22-24.
- Martin F, Savage SAH, Parrett AM, Gramet G, Doré J, Edwards CA (2000) Investigation of bacterial colonisation of the colon in breast-fed infants using novel techniques. *Proc Nutr Soc* 59 : 64A (résumé).
- Matricardi PM (2002) Probiotics against allergy : data, doubts, and perspectives. *Allergy* 57 : 185-187.
- Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H (1999) Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* 65 : 4506-4512.
- Mellander L, Carlsson B, Hanson LA (1984) Appearance of secretory IgM and IgA antibodies to *Escherichia coli* in saliva during early infancy and childhood. *J Pediatr* 104 : 564-568.
- Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, Brassart D, Verdu E, Herranz M, Felley C, Porta N, Rouvet M, Blum AL, Corthésy-Theulaz I (1999) Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La 1 on *Helicobacter pylori* infections in humans. *Digestion* 60 : 203-209.
- Midtvedt AC, Carlstedt-Duke B, Midtvedt T (1994) Establishment of a mucin-degrading intestinal microflora during the first two years of human life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 18 : 321-326.
- Midtvedt AC, Carlstedt-Duke B, Norin KE, Saxerholt H, Midtvedt T (1988) Development of five metabolic activities associated with the intestinal microflora of healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7 : 559-567.
- Midtvedt AC, Midtvedt T (1992) Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 15 : 395-403.
- Midtvedt AC, Midtvedt T (1993) Conversion of cholesterol to coprostanol by the intestinal microflora during the first two years of human life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 17 : 161-168.
- Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G (2002) Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructo-oligosaccharides in formula-fed term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34 : 291-295.
- Naim HY (2001) Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histol Histopathol* 16: 553-61.
- Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G (1999) A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 134 : 15-20.
- Ogawa K, Ben RA, Pons S, de Paolo ML, Fernandez LB (1992) Volatile fatty acids, lactic acid, and pH in the stools of breast-fed and bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 15 : 248-252.
- Parrett AM, Edwards CA (1997) In vitro fermentation of carbohydrate by breast-fed and formula-fed infants. *Arch Dis Child* 76 : 249-253.
- Parrett AM, Lokerse E, Edwards CA (1997) Colonic fermentation in vitro : development during weaning in breast fed infants is slower for complex carbohydrates than for sugars. *Am J Clin Nutr* 65 : 927-933.
- Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E (2000) Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 30 : 1804-1808.
- Ramakrishna BS, Mathan VI (1993) Colonic dysfunction in acute diarrhoea: the role of luminal short chain fatty acids. *Gut* 34:1215-1218.
- Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E (2002) Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 109 : 119-121.

- Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, Koskela M. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG (1999) Clin Infect Dis 28: 1159-1160.
- Romond MB, Thibault H, Kremp O et al (2001) Stimulation of endogenous bifidobacteria and enhancement of the intestinal immune response with a new fermented infant formula FF C50 in infants aged 0 to 4 months : results of a double blind randomised study. Ann Nutr Metab 45 (suppl 1) : 558 (résumé).
- Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jacobsen M, Larsen CN, Moller PL, Pedersen P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A (2002) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. Pediatr Infect Dis J 21 : 411-416.
- Ruseler-van Embden JG, van Lieshout LM, Gosselink MJ, Marteau P (1995) Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. Scand J Gastroenterol 30 : 675-680.
- Saavedra J, Abi-Hanna A, Moore N, et al (1998) Effect of long term consumption of infant formulas with bifidobacteria and *S. Thermophilus* on stool patterns and diaper rash in infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 27 : 483 (résumé).
- Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH (1994) Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of *Rotavirus*. Lancet 344 : 1046-49.
- Saavedra JM, Tschernia A (2002) Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. Br J Nutr 87 (Suppl 2) : S241-46.
- Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, et al (2002) *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. Clin Infect Dis 35 : 1155-1160.
- Satokari RM, Vaughan EE, Favier CF, Doré J, Edwards CA, de Vos WM (2002) Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. Microb Ecol Health Dis 14 : 97-105.
- Scholz-Arhens KE, Schaafsma G, Van den Heuvel EG, Schrezenmeir J (2001) Effects of prebiotics on mineral metabolism. Am J Clin Nutr 73 (suppl) : 459S-464S.
- Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB (2002) *Lactobacillus plantarum* 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. Inflamm Bowel Dis 8 : 71-80.
- Schulze J, Zunft HJ (1991) [Lactose--a potential dietary fiber. The regulation of its microecologic effect in the intestinal tract. 3. Dietary fiber actions of lactose due to microbial activity] Nahrung 35: 903-20.
- Scrimshaw NS, Murray EB (1988) Prevalence of lactose maldigestion. Am J Clin Nutr 48 (Suppl.):S1086-S1098.
- Stark PL, Lee A (1982) The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula fed infants during the first year of life. J Med Microbiol 15 : 189-203.
- Suarez FL, Savaiano DA, Levitt MD (1995) Review article: the treatment of lactose intolerance. Alim Pharmacol Ther 9: 589-597.
- Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. J Immunol 159 : 1739-1745.
- Suzuki T, Itoh K, Kaneko T, Suzuki H (1997) Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium longum*. J Vet Med Sci 59 : 665-669.
- Szajewska H, Mrukowicz JZ (2001) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children : a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. J Pediatr Gastroenterol Nutr 33 (suppl 2) : S17-S25.
- Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikołajczyk W (2001) Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhoea in infants. J Pediatr 138 : 361-365.

- Thoreux K, Balas D, Bouley C, Senegas-Balas F (1998) Diet supplemented with yoghurt or milk fermented by *Lactobacillus casei* DN-114 001 stimulates growth and brush-border enzyme activities in mouse small intestine. *Digestion* 59 : 349-359.
- Trapp CL, Chang CC, Halpern GM, Keen CL, Gershwin ME (1993) The influence of chronic yoghurt consumption on populations of young and elderly adults. *Int J Immunother* 9 : 53-64.
- Van den Heuvel EG, Muys T, Van Dokkum W, Schaafsma G (1999) Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr* 69 : 544-548.
- Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children : a meta-analysis. *Pediatrics* 109 : 678-684.
- Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ (1999) *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 135 : 564-568.
- Vanderhoof JA, Young RJ (1998) Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27 : 323-332.
- Verity K, Edwards CA (1994) Resistant starch in young children. *Proc Nutr Soc* 53 : 105A (résumé).
- Videla S, Vilaseca J, Antolin M, Garcia-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A, Malagelada JR (2001) Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am J Gastroenterol* 96:1486-93.
- Watson W, Oen K, Ramdahim R, Harman C (1991) Immunoglobulin and cytokine production by neonatal lymphocytes. *Clin Exp immunol.* 83 : 169-174.
- Welters CF, Heineman E, Thunnissen FB, van den Bogaard AE, Soeters PB, Baeten CG (2002) Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 45 : 621-627.
- Wheeler JG, Bogle ML, Shema SJ, Shirrell MA, Stine KC, Pittler AJ, Burks AW, Helm RM (1997) Impact of dietary yogurt on immune function. *Am J Med Sci* 313 : 120-123.
- Yajima M, Nakayama M, Hatano S, Yamazaki K, Aoyama Y, Yajima T, Kuwata T (2001) Bacterial translocation in neonatal rats : the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33 : 592-601.
- Yoshioka H, Iseki KI, Fujita K (1983) Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 72 : 317-321.

Annexe - Lettre envoyée par l'Afssa aux représentants de l'industrie agro-alimentaire

Madame, Monsieur,

Vous avez manifesté votre accord pour participer à la réflexion du groupe de travail sus-mentionné et pour lequel les thèmes d'intérêt proposés à l'étude sont :

- ✓ Aspects microbiologiques :
 - Clarification et définition des notions « colonisation, implantation, prolifération, survie », ainsi que « probiotiques, prébiotiques, ferments lactiques, bactéries lactiques ».
 - Caractérisation (méthodologie) et caractéristiques (description) de la flore chez le nourrisson et les enfants
 - Flore indésirable chez le nourrisson et les enfants
 - Identification des populations capable d'utiliser les prébiotiques
 - Devenir des probiotiques dans l'intestin des nourrissons et des enfants
 - Devenir des probiotiques, effets des prébiotiques, lorsque administration simultanée d'antibiotiques
 - Rôle des probiotiques dans la résistance aux antibiotiques
- ✓ Effets cliniques (préventifs et thérapeutiques) :
 - Effets sur les allergies
 - Effets sur les diarrhées infectieuses
 - Effets sur les autres types d'infections (respiratoires)
 - Risque de translocation bactérienne
 - Effets sur le risque d'*Helicobacter pylori*
 - Effets sur l'entérocolite nécrosante chez le prématuré
- ✓ Fonctions physiologiques :
 - Immunité
 - Fonction de barrière de la muqueuse intestinale (mucine, perméabilité, trophicité)
 - Balance hydrominérale
 - Biodisponibilité des nutriments (macro et micro)
 - Transit intestinal
 - Production et qualité des selles
 - Digestibilité du lactose
- ✓ Fermentation
 - Enzymes bactériennes
 - pH
 - Métabolites fermentaires (acides gras à chaîne courte, acide lactique, autres acides organiques, ammoniacque, etc.)
 - Production de gaz

Le groupe de travail souhaiterait recueillir votre avis sur cette liste et sollicite votre participation à l'analyse de ces différents thèmes par tous les moyens que vous jugerez opportuns : envoi de synthèses ou de rapports de travaux non publiés ; informations sur les études que vous avez en cours ou que vous envisager de réaliser, informations sur les difficultés rencontrées ; sur les questions en attente ; recul sur les effets à long terme des préparations que vous commercialisez, etc.

Une audition individuelle des représentants du secteur industriel est programmée le 9 juillet 2002 dans les locaux de l'Afssa. Vous êtes cordialement invité à cette réunion pour une discussion scientifique sur les aspects que vous souhaitez aborder et qui restent dans le cadre des thèmes d'étude du groupe de travail.

En vous remerciant pour votre contribution, veuillez agréer, Madame, Monsieur, mes salutations distinguées.

Dr Christine CHERBUT
Présidente du groupe de travail