

## **AVIS**

### **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

**relatif à l'évaluation de la sécurité d'emploi de la souche *Lactobacillus reuteri* mise en œuvre en tant qu'ingrédient dans une préparation pour nourrissons**

#### **1. RAPPEL DE LA SAISINE**

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 15 décembre 2009 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) d'une demande d'évaluation de la sécurité d'emploi de la souche *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 mise en œuvre en tant qu'ingrédient dans une préparation pour nourrissons.

#### **2. CONTEXTE**

L'objet du dossier présenté par le pétitionnaire est de démontrer la sécurité d'emploi de la souche *L. reuteri* DSM 17938. Cette souche bactérienne est destinée à être utilisée comme ingrédient dans les préparations pour nourrissons et les préparations de suite.

La directive européenne 2006/141/CE (transposée en droit français par l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux préparations pour nourrissons et aux préparations de suite) définit les préparations pour nourrissons et fixe notamment les dispositions relatives à leur nature, leur composition et leur étiquetage. L'adjonction de microorganismes revendiquant le statut de probiotiques aux préparations pour nourrissons n'est pas spécifiquement mentionnée dans cette directive. Néanmoins, il est précisé dans l'article 4 que : « les préparations pour nourrissons [...] ne contiennent aucune substance dans des proportions susceptibles de nuire à la santé des nourrissons et des enfants en bas âge » et dans l'article 5 que « les préparations pour nourrissons sont fabriquées, selon le cas, à partir de sources protéiques [...] et d'autres ingrédients alimentaires dont il a été démontré par des données scientifiques généralement admises qu'ils conviennent à l'alimentation particulière des nourrissons dès leur naissance ».

La souche *L. reuteri* DSM 17938 faisant l'objet de la présente évaluation est issue de la souche parentale *L. reuteri* ATCC 55730, isolée à partir du lait humain. Des souches de l'espèce *L. reuteri* et en particulier la souche ATCC 55730 sont utilisées depuis longtemps comme ingrédient dans différents aliments (laits fermentés dont des yaourts par exemple). Une recherche bibliographique sur PubMed identifie 29 publications sur les propriétés de cette souche, testées dans le cadre d'études expérimentales *in vitro*, *in vivo* et cliniques.

La souche *L. reuteri* ATCC 55730 contient quatre plasmides (pLR580, pLR581, pLR584 et pLR585) dont deux (pLR581 et pLR585) codent pour des résistances aux antibiotiques (tétracycline et lincomycine). La présence de ces deux plasmides représente un risque potentiel bien qu'une étude clinique récente montre l'absence de transfert du gène de résistance à la tétracycline vis-à-vis d'une microflore intestinale humaine mais n'exclut pas un transfert à bas bruit de fond (Egervärn *et al.*, 2010). Afin de supprimer ce risque de transfert de gène codant pour des résistances aux

antibiotiques, une délétion de ces deux plasmides a été réalisée (Rosander *et al.*, 2008), conduisant à la souche *L. reuteri* DSM 17938.

### 3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par les Comités d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » et « Microbiologie », réunis respectivement le 25 mars et le 14 avril 2010.

### 4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Agence nationale chargée de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) est fondé sur les avis des Comités d'experts spécialisés « Nutrition humaine » et « Microbiologie » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

#### 4.1. Commentaires généraux sur le dossier et les études fournies

Le dossier soumis par le pétitionnaire est un rapport scientifique en anglais intitulé « Technical and scientific data in support of the safety and the suitability and the expected benefits of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in formulae for infants ». Les traductions françaises du résumé et des conclusions intermédiaires et finales figurent dans le dossier.

La bibliographie fournie par le pétitionnaire (229 références) est encombrée par des références et des rapports anciens dont certains ne sont pas ou peu pertinents, tandis que des revues récentes et très pertinentes ne sont pas citées.

Dans plusieurs études, des souches considérées par le pétitionnaire comme *L. reuteri* ATCC 55730 ne portent pas de numéro de référence (Ruiz-Palacios *et al.*, 1996) ou bien un numéro différent : MM53 ATCC SD2112 (Wolf *et al.*, 1995), MM2 SD2112 (Wolf *et al.*, 1998), ING1 (Ouweland *et al.*, 2001 et 2003). L'équivalence des souches SD2112 et ATCC 55730 est précisée dans l'article de Weizman *et al.* (2005). Il aurait été souhaitable que le pétitionnaire précise la filiation de ces souches lui permettant de les considérer comme étant *L. reuteri* ATCC 55730.

Certaines références citées sont difficilement analysables, compte tenu des effectifs faibles des études ou du manque de données rapportées.

#### 4.2. Caractérisation de la souche

La souche de *Lactobacillus reuteri* a été classée selon les méthodes de bactériologie classique complétées par une taxonomie utilisant la phylogénétique moléculaire par séquençage de l'ARNs16. La souche DSM 17938 a été obtenue en deux étapes à partir de la souche parentale ATCC 55730. La première étape est la délétion du plasmide pLR 581 permettant l'obtention de la souche DSM 17686 dépourvue de la résistance à la tétracycline, la production de reutéline<sup>1</sup> étant équivalente à celle de la souche ATCC 55730. L'identité des deux souches a été vérifiée par Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction (REP PCR). La deuxième étape a permis l'obtention de la souche DSM 17938 après délétion du plasmide pLR 585 porteur du gène de résistance à la lincomycine selon la même méthode. Ce plasmide était porteur de gènes codant pour d'autres protéines de fonction inconnue.

#### **Equivalence des souches *L. reuteri* ATCC 55730 et *L. reuteri* DSM 17938**

La souche DSM 17938 ne possède plus les gènes de résistance à la tétracycline *tet* (W) et à la lincosamine *lnu* (A). Rosander *et al.* (2008) montrent que les aspects des cellules bactériennes et des colonies de la souche parentale ATCC 55730 et de la souche DSM 17938 sont similaires. La production de reutéline par les deux souches est identique et les tests de fermentation utilisés dans la galerie API 50CHL ne montrent pas de différence au niveau des profils de fermentation. Les

<sup>1</sup> La reutéline est un des principaux composants produits par les souches *L. reuteri*, qui a fait l'objet d'études portant notamment sur l'activité antimicrobienne.

courbes de croissance en compétition montrent que la souche DSM 17938 a un avantage sur la souche ATCC 55730 en co-culture et une meilleure tolérance à l'acidité. La capacité à se fixer sur le mucus est la même pour les deux souches. Les essais chez des volontaires sains montrent que les concentrations observées dans les selles après 28 jours d'utilisation sont considérées comme équivalentes pour les deux souches et que les souches ne sont plus retrouvées 14 jours après l'arrêt de l'utilisation (Rosander *et al.*, 2008). La colonisation intestinale est donc transitoire.

### 4.3. Obtention et production de la souche d'intérêt

Le mode de production est conforme aux usages de l'industrie de la production des ferments et ne présente pas de spécificité pouvant nuire à la sécurité des inocula produits.

### 4.4. Données relatives à l'évaluation des risques sanitaires de la souche

*Lactobacillus reuteri* bénéficie du statut QPS<sup>2</sup>. Il n'a pas été rapporté dans la littérature médicale d'infection à *Lactobacillus reuteri*. L'analyse génétique de la souche DSM 17938 a été réalisée par O'Sullivan (Université du Minnesota, Etats-Unis) pour détecter la présence de gènes de structure ayant un intérêt pour l'innocuité de la souche. Aucun des gènes analysés (98% du contenu en gènes de la souche) n'est porté par un élément mobile. Un gène similaire au gène de l'hémolysine a été trouvé mais il est présent dans la majorité des souches de *Lactobacillus*. L'étude montre que la distribution des différents gènes de la souche DSM 17938 selon leur catégorie fonctionnelle est similaire à celle des 2 souches pour lesquelles le génome est disponible, F275 et 100-23.

L'analyse de l'innocuité des microorganismes pour lesquels le statut de probiotiques est revendiqué par le pétitionnaire soulève une série de questions abordées dans la littérature : le risque de survenue de bactériémie, l'influence sur l'immunité et la survenue d'autres infections, le risque allergique, le risque lié à la résistance aux antibiotiques, et le risque de survenue de troubles métaboliques, physiologiques et cliniques (acidose lactique, troubles digestifs, modifications de paramètres sanguins et hématologiques, troubles de la croissance et du développement de l'enfant). Ces différents points sont examinés pour l'espèce *L. reuteri* en général, puis pour les deux souches citées dans le dossier du pétitionnaire.

La grande majorité des études porte sur la souche *L. reuteri* ATCC 55730. Les quatre études portant sur *L. reuteri* DSM 17938 ne sont pas publiées à ce jour.

Dans certaines études, *L. reuteri* est utilisé conjointement avec d'autres microorganismes. Quelques études testent seulement l'efficacité de la souche vis-à-vis d'un désordre fonctionnel et ne précisent pas la survenue ou non d'effets indésirables. D'autres études sont incomplètement documentées (absence d'indication de la durée d'utilisation, de la dose employée, des effectifs de l'étude). Compte tenu de ces limites, certaines études fournies par le pétitionnaire n'ont ainsi pas été prises en compte pour l'évaluation de la sécurité d'emploi.

#### **Risque de bactériémie**

Les cas de bactériémie à *Lactobacillus* rapportés dans la littérature, extrêmement rares, concernent essentiellement des patients ayant une pathologie sous-jacente. Des endocardites surviennent plutôt chez les patients immunodéprimés ou ayant des lésions pré-existantes au niveau des valves cardiaques.

Aucune bactériémie à *L. reuteri* ATCC 55730 n'a été rapportée dans la littérature et les études citées dans le dossier n'apportent aucun élément permettant de remettre en cause cette constatation pour la souche *L. reuteri* ATCC 55730, notamment les études comportant la réalisation systématique d'hémocultures (Betta *et al.*, 2007, Wolf *et al.*, 1998).

#### **Effets sur l'immunité et la survenue d'infections**

Larsen *et al.* (2007) montrent que parmi les souches de *L. reuteri*, la souche ATCC 55730 fait partie de celles dont le taux d'adhésion aux cellules épithéliales jéjunales du porcelet est le plus faible. Ces

<sup>2</sup> *Qualified presumption of safety* ou présomption d'innocuité reconnue. Statut délivré par l'EFSA

capacités modérées d'adhésion sont compatibles avec une implantation transitoire dans le tube digestif mais font que la souche ATCC 55730 est vraisemblablement à faible risque de translocation. Le faible nombre d'études réalisées avec la souche DSM 17938 (4 études), pendant des durées de l'ordre de 4 semaines seulement, ne permet pas de conclure à l'absence de risque infectieux. Aucune de ces études n'a porté sur les effets immunologiques de façon approfondie. Cependant, la souche dérivant directement de la souche ATCC 55730, l'absence de risque mis en évidence dans les études sur la souche ATCC 55730 peut *a priori* être extrapolée à la souche DSM 17938.

### **Risque allergique**

Dans leur conclusion, Cirillo *et al.* (2005) indiquent que *L. reuteri* ATCC 55730 permettrait la prévention d'eczéma lié à la prise du lait de vache. L'étude d'Abrahamson *et al.* (2007) va dans le même sens. Ceci plaide en faveur de l'absence d'effet allergisant de cette souche. Les études réalisées avec la souche DSM 17938 ne mettent quant à elles pas en évidence d'effets indésirables particuliers concernant le risque allergique. Il n'y a pas d'argument empêchant l'extrapolation des observations faites avec la souche ATCC 55730.

### **Résistance aux antibiotiques**

La résistance aux pénicillines observée dans l'espèce *L. reuteri* est liée à des mutations ponctuelles dans les gènes des penicillin binding proteins (PBP) (Rosander *et al.*, 2008). Ces gènes étant chromosomiques, le risque de transfert à d'autres bactéries est considéré comme faible. Les auteurs considèrent que la résistance chromosomique de la souche ATCC 55730 relève du même mécanisme, ce qui est vraisemblable. Cependant, on peut émettre des réserves sur l'absence de transfert de ces mutations dans la mesure où le transfert de fragments génétiques de gènes de PBP par transformation a été observé dans d'autres espèces bactériennes comme *Streptococcus pneumoniae*. De plus, la délétion plasmidique entraîne la perte de gènes dont les fonctions ne sont pas décrites. Ce n'est donc qu'en s'appuyant sur les données des essais cliniques qu'on peut supposer que cette perte de gènes est sans conséquence.

La souche DSM 17938 est *a priori* assez sensible à l'ensemble des antibiotiques mais le dossier du pétitionnaire ne mentionne pas de valeurs de concentrations minimales inhibitrices des différents antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine.

La délétion de 2 plasmides éliminant la résistance à la tétracycline et à la lincomycine dans la souche DSM 17938 permet d'obtenir une souche plus appropriée à un usage courant que la souche ATCC 55730. Du fait de l'absence d'élément génétique porteur de gènes de résistance, cette souche ne constitue pas un risque plus important que les souches commensales du tube digestif pour des transferts de gènes de résistance vers d'autres espèces.

### **Risque de survenue de troubles métaboliques, physiologiques et cliniques**

#### ***Acidose lactique***

Les bactéries produisant de l'acide produisent deux énantiomères de l'acide lactique, le D(-) lactate et le L(+) lactate. Chez l'Homme, la forme L est métabolisée en pyruvate par une enzyme spécifique de cet isomère, la L- lactate déshydrogénase. La D<sub>2</sub>-hydroxy acide déshydrogénase présente dans le rein et le foie semble capable de métaboliser le D(-) lactate en pyruvate (Petersen, 2005 ; Ewaschuk *et al.*, 2005). Des études portant sur des enfants nourris avec des laits contenant des microorganismes à visée probiotique montrent une élévation de l'excrétion de l'acide lactique dans les urines, qui reste cependant à des niveaux de concentration considérés comme normaux. Dans certaines situations pathologiques comme le syndrome du grêle court, le D(-) lactate, s'il est produit en quantités élevées par les lactobacilles du tube digestif, peut être insuffisamment métabolisé et s'accumuler dans le sang. Une encéphalopathie par acidose lactique a été rapportée récemment chez un enfant de 5 ans ayant un intestin grêle court du fait de résections multiples en période néonatale (Munakata *et al.*, 2009). Cet enfant avait reçu des microorganismes à visée probiotique (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus faecalis*, et *Streptococcus faecium*) en plus d'un traitement anti-diarrhéique par lopéramide. Aucune publication à ce jour ne fait état de symptômes d'acidose lactique liée à la prise de *L. reuteri*. On peut néanmoins recommander la prudence quant à son utilisation chez des enfants ayant subi une résection intestinale.

Les études réalisées avec la souche DSM 17938 ne mettent pas en évidence la survenue de troubles métaboliques. L'absence d'antécédents chirurgicaux chez les enfants élimine *a priori* le risque d'acidose lactique.

#### **Autres effets métaboliques, physiologiques et cliniques**

Chez l'adulte, la majorité des études retenues est réalisée pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois. Toutes montrent l'absence d'effets indésirables, tant en ce qui concerne les troubles digestifs que les modifications des paramètres sanguins et hématologiques de routine<sup>3</sup>.

La plupart des études réalisées chez l'enfant concerne des nourrissons de quelques mois. Les plus jeunes participants aux études ont quelques jours. Les durées des études sont généralement de l'ordre de quelques semaines. Aucun effet indésirable n'est observé sur le plan digestif ou sur la croissance staturo-pondérale et le développement des enfants.

En résumé, peu d'études ont été réalisées avec la souche *L. reuteri* DSM 17938. Les données relatives à l'étude de la souche n'apportent pas d'éléments pouvant faire craindre l'apparition d'un caractère de virulence comparativement à *L. reuteri* ATCC 55730. Les premiers essais cliniques réalisés avec cette souche ne rapportent pas d'effets indésirables. On peut donc se référer aux études réalisées sur *L. reuteri* ATCC 55730. Certaines références citées sont difficilement analysables (effectifs faibles, données rapportées insuffisantes). Parmi les études recevables pour l'évaluation de la sécurité, aucune ne rapporte d'effet indésirable grave. Certaines études évoquent la possibilité de survenue de troubles fonctionnels mineurs, une seule étude évoque une plus grande fréquence des infections<sup>4</sup> (Abrahamson *et al.*, 2007). Dans les études réalisées chez des patients souffrant de pathologies sous-jacentes (infection à *Helicobacter pylori*, VIH, gingivites, syndrome du côlon irritable), aucun effet secondaire n'a été observé. Cependant les études chez le prématuré sont peu nombreuses et les études chez le nouveau-né et le nourrisson concernent essentiellement des enfants sans pathologie sous-jacente, à l'exception des antécédents d'allergie. Il n'y a pas d'étude bien construite chez les enfants atteints de syndrome de grêle court.

Par ailleurs, la grande majorité des essais cliniques réalisés avec *L. reuteri* DSM 17938 ou ATCC 55730 a été conduite à des doses de l'ordre de  $10^8$  ufc<sup>5</sup>/jour.

En ce qui concerne les études sur les fortes doses prises en considération pour l'évaluation de la sécurité<sup>6</sup>, trois études ont été réalisées chez l'adulte, dont une, non publiée, porte sur cinq participants seulement (Wolf *et al.*, 1995 ; Wolf *et al.*, 1998). Deux études ont été réalisées chez l'enfant à des doses de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  ufc/j, mais l'utilisation de *L. reuteri* durait seulement cinq jours (Shornikova *et al.*, 1997 a et b). Deux études (Weizman *et al.*, 2005 ; Weizman *et al.*, 2006) ont été réalisées chez le nourrisson à la dose intermédiaire de  $10^9$  ufc/j<sup>7</sup>. Aucune de ces études ne met en évidence d'effets indésirables de *L. reuteri*.

<sup>3</sup> Hémoglobine, hématocrite, plaquettes, leucocytes, globules rouges, plaquettes, volume corpusculaire moyen, protéine C réactive, potassium, sodium, créatinine, urée, glucose, cholestérol total, cholestérol HDL, cholestérol LDL, VLDL cholestérol, triglycérides, bilirubine totale, urate, alanine aminotransférase, phosphatases alcalines, lactate, etc. (Valeur *et al.*, 2004 ; Wolf *et al.*, 1995 & 1998)

<sup>4</sup> Tendance vers des otites plus fréquentes dans le groupe recevant *L. reuteri* par rapport au groupe témoin, p=0.08

<sup>5</sup> ufc : unité formant colonie

<sup>6</sup> Compte tenu des critères mentionnés en introduction de la partie 4.4.

<sup>7</sup> D'après ces publications, *L. reuteri* est introduit dans la préparation pour nourrissons à la concentration de  $10^7$  ufc/g de poudre de préparation. D'après la consommation quotidienne moyenne de préparation observée dans ces études, cela représente un apport quotidien de  $1,2 \times 10^9$  ufc de *L. reuteri*.

**Au total :**

Sur la base des études cliniques non publiées menées récemment avec la souche *L. reuteri* DSM 17938 et des études menées avec la souche *L. reuteri* ATCC 55730, qui sont pertinentes pour la souche *L. reuteri* DSM 17938, l'Anses estime que la sécurité d'emploi de la souche *L. reuteri* DSM 17938 chez l'Homme adulte et chez l'enfant est démontrée jusqu'à une dose de  $10^8$  ufc/j.

Pour des concentrations supérieures, l'Anses estime que les données disponibles sont insuffisantes pour conclure quant à la sécurité d'emploi de *L. reuteri*, notamment chez le nourrisson, chez qui aucune étude aux doses de  $10^{10}$  à  $10^{11}$  ufc/j n'a été réalisée.

Enfin, compte tenu de l'absence d'études réalisées chez le prématuré ou l'enfant ayant des antécédents digestifs chirurgicaux, l'Anses estime que l'utilisation dans ces populations n'est pas recommandée.

En ce qui concerne la concentration de *L. reuteri* dans la préparation pour nourrissons du pétitionnaire :

Dans la partie « *Incorporation de L. reuteri dans la préparation pour nourrissons* », le pétitionnaire estime que la préparation pour nourrissons doit fournir une dose moyenne quotidienne de *L. reuteri* de  $10^8$  ufc, et ce jusqu'à la fin de la durée de conservation du produit. Le pétitionnaire estime par ailleurs que la consommation quotidienne moyenne d'un nourrisson (de 0 à 6 mois) est de 110 g de poudre de préparation. S'appuyant sur ces deux éléments, le pétitionnaire estime que la concentration de *L. reuteri* dans la préparation doit être de  $9 \times 10^5$  ufc/g de poudre de préparation à la fin de la durée de conservation.

Les spécifications relatives au prémélange contenant *L. reuteri* DSM 17938 utilisé pour la fabrication du produit figurent en annexe 9. La concentration de *L. reuteri* dans le prémélange est présentée comme une valeur cible. Les informations disponibles permettent de calculer la concentration théorique d'introduction de *L. reuteri* dans la préparation pour nourrissons.

Les annexes 1 et 2, qui correspondent en théorie aux étiquetages de la préparation pour nourrissons et de la préparation de suite, ne présentent pas les informations nécessaires pour déterminer la concentration de *L. reuteri*.

Au total, l'Anses estime que ces informations ne permettent pas de s'assurer de la concentration réelle de *L. reuteri* dans le produit fini et regrette l'absence de données attestant de cette valeur et de sa reproductibilité (résultats d'analyse notamment) au moment de la production du produit et au cours de sa conservation.

#### **4.5. Données relatives aux relations entre l'utilisation de *L. reuteri* DSM 17938 et l'inconfort intestinal et le temps des pleurs des nourrissons**

*L. reuteri* DSM 17938 a été utilisé pour le traitement de troubles digestifs mal caractérisés chez le jeune enfant, comme des régurgitations ou des ballonnements, mais surtout pour le traitement de symptômes dont la définition est extrêmement imprécise, qu'il s'agisse de flatulences ou encore de coliques du nourrisson. Ce dernier terme est de moins en moins utilisé au profit de celui de « pleurs (excessifs) du nourrisson ». Les critères diagnostiques de ce syndrome sont extrêmement flous, variant d'une étude à l'autre, rendant l'interprétation des études particulièrement difficile.

Selon le pétitionnaire, l'intérêt de l'utilisation de *L. reuteri* DSM 17938 dans le traitement des « coliques du nourrisson » est sous-tendu par les conclusions de l'étude de Savino *et al.* (2004), montrant que le nombre de lactobacilles spp. est plus bas chez les enfants allaités présentant des coliques que chez les enfants allaités ne présentant pas de coliques.

La plupart des études disponibles présentées par le pétitionnaire afin d'étayer l'effet de la souche sur l'inconfort intestinal du nourrisson concerne des enfants allaités recevant *L. reuteri* par voie

orale sous forme de gouttes. Elles montrent une diminution du temps des pleurs et/ou des régurgitations chez les nourrissons recevant *L. reuteri* à la dose de  $10^8$  ufc/j par rapport aux nourrissons des groupes témoins. L'Anses note que ces études, dont certaines ne sont pas publiées, sont peu nombreuses et portent sur des effectifs de petite taille.

Par ailleurs, deux études (Weizman *et al.*, 2005 ; Weizman *et al.*, 2006) ont utilisé *L. reuteri* à la dose de  $10^9$  ufc/j<sup>8</sup> dans des préparations pour nourrissons. L'objectif premier de ces études consistait en l'évaluation de la sécurité d'emploi de la souche. Les objectifs secondaires portaient sur l'évaluation des effets de la supplémentation des préparations pour nourrissons en microorganismes à visée probiotique. Ces études montrent l'absence de différence significative entre le groupe recevant *L. reuteri*, le groupe témoin recevant une préparation pour nourrissons non supplémentée et le groupe recevant *Bifidobacterium lactis* (autre souche à visée probiotique) en ce qui concerne certains troubles digestifs (régurgitations, vomissements, caractéristiques des selles, etc.) et certains paramètres comportementaux (temps et fréquence des pleurs, etc.).

## 5. CONCLUSION

Les études cliniques non publiées menées récemment avec la souche *L. reuteri* DSM 17938 et les études menées avec la souche *L. reuteri* ATCC 55730, pertinentes pour la souche *L. reuteri* DSM 17938, ne montrent pas d'effets indésirables jusqu'à la concentration de  $10^8$  ufc/jour. L'Anses estime ainsi que la sécurité d'emploi de la souche *L. reuteri* DSM 17938 en tant qu'ingrédient dans les préparations pour nourrissons est démontrée jusqu'à cette concentration.

L'Anses estime que les données de la littérature disponibles sur les concentrations au-delà de  $10^8$  ufc/jour sont insuffisantes pour conclure quant à la sécurité d'emploi de cette souche en tant qu'ingrédient dans les préparations pour nourrissons à de telles concentrations.

L'Anses estime que les informations disponibles dans le dossier du pétitionnaire ne permettent pas de s'assurer de la concentration réelle de *L. reuteri* dans le produit fini, au moment de sa production et au cours de sa conservation. Ainsi, en l'absence de ces éléments d'information, l'Anses estime qu'elle ne peut pas se prononcer sur la sécurité d'emploi de *L. reuteri* DSM 17938 dans cette préparation.

Enfin, compte tenu de l'absence d'études réalisées chez le prématuré ou l'enfant ayant des antécédents digestifs chirurgicaux, l'Anses estime que l'utilisation dans ces populations n'est pas recommandée.

En ce qui concerne les données relatives aux relations entre l'utilisation de *L. reuteri* DSM 17938 d'une part, et l'inconfort intestinal et le temps des pleurs des nourrissons d'autre part, l'Anses note que les études cliniques présentées, dont certaines ne sont pas publiées, sont peu nombreuses et portent sur des effectifs de petite taille.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

<sup>8</sup> D'après ces publications, *L. reuteri* est introduit dans la préparation pour nourrissons à la concentration de  $10^7$  ufc/g de poudre de préparation. D'après la consommation quotidienne moyenne de préparation observée dans ces études, cela représente un apport quotidien de  $1,2 \times 10^9$  ufc de *L. reuteri*.

**MOTS-CLES**

**Mots clés :** *Lactobacillus reuteri*, probiotique, formule infantile, équivalence de souches

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bootcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Bjorksten B, Oldaeus G. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1174-80.

Betta P, Sciacca P, Trovato L, Vilardi L, Scuderi MG, Di Benedetto V, Liveri S, Romea MG. Probiotics in the prevention of bacterial and Candida infections in newborns submitted to greater surgical intervention and admitted in NICU – retrospective group controlled study. ESPGHAN Annual Meeting, Barcelona, Spain, 9-12 May 2007. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44: E127 (Abstract)

Cirillo AI, Boccia E, Cirillo Ar, Scotto G, Maiella D, De Crescenzo G, Leone G, Grimaldi S, Cirillo Ag. Effectiveness of *L. reuteri* in patients with atopic dermatitis and cow milk intolerance: preliminary study. Congress of the Italian Society for Clinical Allergy and Immunology, Rome, 4-7 May 2005 (Abstract)

Egervärn M, Lindmark H, Olsson J, Roos S. Transferability of a tetracycline resistance gene from probiotic *Lactobacillus reuteri* to bacteria in the gastrointestinal tract of humans. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2010; 97:189-200

Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-lactate in human and ruminant metabolism. *J Nutr* 2005; 135: 1619-25.

Larsen N, Nissen P, WGT Willats. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus ssp.* and *E. coli* O138. *Int J Food Microbiol* 2007; 114:113-9.

Munakata S, Arakawa C, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H. A case of D-lactic acid encephalopathy associated with use of probiotics. *Brain Dev* 2009 Nov 14. [Epub ahead of print].

Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkkio S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Foods Microbiol* 2001; 64:119-26.

Ouwehand AC, Salminen S, Roberts PJ, Ovaska J, Salminen E. Disease-dependant adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; 10: 643-6.

Petersen C. D-lactic acidosis. *Nutr Clin Prac* 2005; 20: 634-45.

Rosander A, Connolly E, Roos S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol* 2008;74: 6032-40.

Ruiz Palacios G, Guerrero M, Hilty M, Dohnalek M, Newton P, Calva J, Costigan T, Tuz F, Arteaga F. Feeding of a probiotic for the prevention of community-acquired diarrhea in young Mexican children. *Pediatr Res* 1996; 39 : 184

Savino F, Cresi F, Pautasso F, Palumeri E, Tullio V, Roana J, Silvestro L, Oggero R. Intestinal microflora in breastfed colicky and non-colicky infants. *Acta Paediatrica* 2004; 93: 825-9.

Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkanen H, Vesilari T. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 1997a ; 24:399-404.

Shornikova AV, Casas IA, Mykkanen H, Salo E, Vesilari T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 1997b; 16: 1103-7.

Stolley H, Droese W. Lactic acid in milk formula, the influence on absorption of nutrients and the influence on the metabolism in young babies. *Acta Paediatr Scand* 1971; 60: 367-8.

Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. Colonisation and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1176-81.

Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 2005; 115 : 5-9.

Wolf BW, Garleb KA, Ataya DG, Casas IA. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* in healthy adult male subjects. *Microbial Ecol Health Dis* 1995; 8: 41-50.

Wolf BW, Wheeler KB, Ataya DG, Garleb KA. Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the human immunodeficiency virus. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 1085-94.