

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

***Report of the working group on
"Infant foods and modification of the intestinal flora"***

-Juin 2003-

Coordination éditoriale /Editorial co-ordination:

Jean-Louis Berta

Landy Razanamahefa

Juliette Chevalier

Carole Thomann

SOMMAIRE /CONTENTS

Rapport du groupe de travail Alimentation infantile et modification de la flore intestinale	5
Report of the working group on Infant foods and modification of the intestinal flora...	39
Bibliographie/ <i>Bibliography</i>	73

**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	9
a.	Saisine	9
b.	Cadre général de la réflexion et objectifs du groupe de travail.....	9
c.	Méthodologie de travail	10
II-	DEFINITIONS	11
a.	Santé	11
b.	Probiotiques.....	11
c.	Prébiotiques.....	11
d.	Symbiotiques.....	11
e.	Micro-organismes tués	11
f.	Notions de souches, d'espèces, de genres bactériens.....	11
g.	Colonisation, implantation, prolifération, survie.....	13
h.	Notions de dominance et sous-dominance	13
III-	EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES ET AUTRES INGREDIENTS DESTINES A MODIFIER LA FLORE INTESTINALE CHEZ LE NOURRISSON ET LE JEUNE ENFANT	14
a.	La flore intestinale du nouveau-né et du jeune enfant	14
i.	Méthodes de caractérisation	14
ii.	Composition.....	14
b.	Les activités bactériennes coliques chez le nouveau-né et le jeune enfant	17
i.	La fermentation des glucides	17
ii.	Autres activités enzymatiques non fermentaires.....	19
c.	Digestion du lactose	19
d.	Balance hydrique et absorption des minéraux	19
e.	Transit intestinal, nombre et caractéristiques des selles.....	20
f.	Barrière épithéliale intestinale : facteurs non immunologiques	21
g.	Immunité systémique et intestinale	22
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.....	25
a.	Allergies	25
b.	Diarrhées infectieuses.....	26
c.	Autres infections	27
d.	Infection à <i>Helicobacter pylori</i>	28
e.	Entérocolite nécrosante	28
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	29

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.....	30
	a. Les problèmes rencontrés ou possibles.....	30
	i. Allergie.....	30
	ii. Résistance aux antibiotiques.....	30
	iii. Infections	30
	iv. Diarrhée osmotique	31
	v. Douleurs abdominales.....	31
	b. Les groupes potentiellement à risque	32
	c. Les tests préconisés	32
	d. La mise en place d'une veille	32
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.....	33
	a. Sélection, classification et identification des souches probiotiques	33
	b. Procédés d'obtention et caractérisation des prébiotiques	33
	c. Sécurité d'emploi	33
	d. Conservation des préparations et recommandations d'utilisation.....	34
	e. Démonstration des effets physiologiques et cliniques	34
	i. Groupes ciblés, environnement, nombre d'enfants à inclure.....	34
	ii. Protocole de l'étude.....	34
	iii. Doses et mode d'administration	35
	iv. Choix des critères principaux et des biomarqueurs	35
	v. Nombre d'études indépendantes	35
	vi. Recherche des mécanismes d'action	35
	vii. Présentation des résultats.....	35
	f. Etiquetage	35
	g. Communication sur les produits	35
	h. Suivi après la mise sur le marché	36
	ANNEXE	37

I- Introduction

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 (DCCRF) 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.

II- Définitions

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 ribosomaux 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. À 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 minimes. 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 polymerase 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 coccoides* 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'enterobactéries (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 (Lundquist 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 4eme 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 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'immaturité 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 paracréisol 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 (10^8 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 dégradaient 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 sourceaux axéniques peuvent être rendues tolérantes 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 Tscherneia, 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 sécrétaires.
- 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 (Björksten et al, 1998 ; Björksten 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 $5 \cdot 10^8$ 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 ($3 \cdot 10^8$ 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 était 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* ($2 \cdot 10^{10}$ 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-β2 (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 jj], 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* (Szajweska 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 destines 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 bactémies 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 (nutrivilance 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 cible, avec le mode d'administration et la dose préconisées.
- 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 identifiée(s) et caractérisée(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 indiquées 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 inférieur 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 constituerait 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'événements 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.

vii. 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.

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 pilori*
 - 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, ammoniacal, 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 envisagez 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

**Report of the working group on
"Infant foods and modification of the intestinal flora"**

-June 2003-

Members of the working group

■ Members of the "Human Nutrition" specialist expert committee

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

■ Other experts

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

■ Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

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

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

D. Baelde
G. Cousyn

■ Industry representatives who gave evidence:

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

Contents

I.	INTRODUCTION.....	43
a.	Referral	43
b.	Context of the review and working group objectives	43
c.	Working methodology	44
II.	DEFINITIONS	45
a.	Health	45
b.	Probiotics.....	45
c.	Prebiotics.....	45
d.	Symbiotics	46
e.	Non-live micro-organisms	46
f.	Strains, species and bacterial genera	46
g.	Colonisation, implantation, proliferation, survival	47
h.	The concepts of dominance and sub-dominance	47
III.	PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF PROBIOTICS, PREBIOTICS AND OTHER INGREDIENTS DESIGNED TO MODIFY THE INTESTINAL FLORA IN BABIES AND YOUNG CHILDREN	48
a.	Intestinal flora in newborn baby and young child	48
i.	Characterisation methods	48
ii.	Composition	49
b.	Colonic bacterial activity in newborn babies and young children	51
i.	Carbohydrate fermentation	51
ii.	Other non-fermentation enzymatic activities	52
c.	Lactose digestion	53
d.	Water balance and mineral absorption	53
e.	Intestinal transit, number and characteristics of stools	54
f.	Intestinal epithelial barrier: non-immunological factors	54
g.	Systemic and intestinal immunity	55
IV.	"PREVENTIVE" AND CURATIVE CLINICAL EFFECTS OF PROBIOTICS, PREBIOTICS AND OTHER INGREDIENTS DESIGNED TO MODIFY THE INTESTINAL FLORA IN BABIES AND YOUNG CHILDREN	58
a.	Allergies	58
b.	Infectious diarrhoea	59
c.	Other infections	60
d.	<i>Helicobacter pylori</i> infection	60
e.	Necrotising enterocolitis	60
V.	BENEFIT OF USING PROBIOTICS, PREBIOTICS AND OTHER INGREDIENTS DESIGNED TO MODIFY THE INTESTINAL FLORA IN HEALTHY BABIES AND YOUNG CHILDREN	62

VI. SAFETY OF USE OF PROBIOTICS, PREBIOTICS AND OTHER INGREDIENTS DESIGNED TO MODIFY THE INTESTINAL FLORA IN FOODS FOR BABIES AND YOUNG CHILDREN	63
a. Reported and potential problems	63
i.Allergy.....	63
ii.Antibiotic resistance	63
iii.Infections	63
iv.Osmotic diarrhoea	64
v.Abdominal pain	64
b. Potential at-risk groups	64
c. The recommended tests	65
d. Setting up a monitoring system	65
 VII. GUIDELINES ON THE USE OF PROBIOTICS, PREBIOTICS AND OTHER INGREDIENTS DESIGNED TO MODIFY THE INTESTINAL FLORA, IN INFANT FORMULAS AND FOLLOW-ON FORMULAS	66
a. The selection, classification and identification of probiotic strains	66
b. Procedures for obtaining and characterising prebiotics	66
c. Safety of use	66
d. Storage of infant formulas and recommendations for use	67
e. Demonstration of physiological and clinical effects	67
i. Target groups, environment, number of infants to be included	67
ii. Study protocol	67
iii. Doses and method of administration	67
iv. Selection of principal criteria and biomarkers	68
v. Number of independent studies	68
vi. Research into mechanisms of action	68
vii. Presentation of results	68
f. Labelling	68
g. Advertising the products	68
h. Post-marketing monitoring	69
 ANNEXE	71

Introduction

a. Referral

As a result of reports of an increasing number of infant formulas and follow-on formulas coming onto the market containing added ingredients with a prebiotic and probiotic action designed to imitate the functional properties of breast milk, the Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DCCRF) [Directorate General for Competition, Consumer Affairs and Prevention of Fraud] requested the Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) [French Food Standards Agency] for technical advice on "*the impact on the health of babies and young children of the increased incorporation of prebiotics and probiotics in milk formulas intended specifically for them*".

In addition, the European Commission, as part of its review of Directive 91/321/EEC of 14 May 1991, concerning infant formulas and follow-on formulas, has requested the Scientific Committee on Food (SCF) for an opinion on new scientific data which might require the amendment of this Directive.

b. Context of the review and working group objectives

The question posed by the DGCCRF concerns the possible clinical consequences, both short and long term, of the use of prebiotics and probiotics in infant and follow-on formulas. This question breaks down into several specific questions. For example:

- What benefits are to be gained from modifying the intestinal flora in infants? What are the risks and therefore what restrictions should be imposed?
- Which flora profile should be promoted? Can one or several bacterial populations be selectively modified? What are the consequences for the undesirable populations?
- Which dietary agents (antibiotics are excluded from the review) are capable of modifying the composition and activity of the flora? How should they be consumed in order to act on the flora?
- Do all these agents have the same effects?
- What are the effects of these agents on functions other than the intestinal flora?
- What benefits may be claimed for the health and wellness of infants and young children? How and to whom should they be communicated?

The working group therefore set the following objectives:

1. To report on the current state of knowledge of the issues raised by modification of the intestinal flora in young children, by examining every aspect of the use of ingredients in infant formulas and follow-on formulas which modify the intestinal flora.
2. To produce guidelines for the constitution of industrial dossiers specific to this type of product.

It was felt by the members of the working group that the issues raised by the use of these ingredients in infant nutrition mainly concerned infant formulas and follow-on formulas. The review was therefore restricted to this type of formula, for healthy full-term babies, from birth to one year. However, for reasons of nutritional logic, the issues surrounding the presence of these ingredients in formulas for young children, for healthy children from one to three years, were also considered.

- The group excluded from the review the issues related to:
- The use of genetically modified bacteria

Special diet foods designed for specialist medical purposes, as defined by the Order of 20 September 2000.

c. Working methodology

The Group decided to carry out a review and critical analysis of the literature published prior to 2003. It restricted its field of analysis to articles published in peer-reviewed journals, giving priority to studies conducted in children. When no data were available for children, the analysis was extended to data obtained in adults, and, if deemed useful, in animals. A list of the aspects to be considered was then prepared and the various areas for analysis were divided amongst the scientific experts on the working group. The result of the analysis by each expert was explained to the whole group and then discussed collectively.

As the group was aware that not all the data available have probably been published, as this field of research and innovation is a new and competitive one from the industry standpoint, it decided to consult some scientific experts from industry known for their involvement in this research. A letter stating the objectives of the consultation was sent to three industry experts nominated by their companies (Annex). Each expert addressed a meeting of the group and the various issues dealt with by the group were discussed with each of the industry experts.

II. Definitions

a. Health

The WHO defines health as a state of physical, mental and social well-being. The working group agreed that the review should therefore include physiological and psychological effects as well as clinical effects. Physiological effects include for example changes to the faecal flora, modulation of the immune system or changes to metabolic markers. Clinical effects concern the prevention and/or treatment of disease (infections, allergies, etc.) and possibly the impact on quality of life indices (crying, bloating, etc.).

b. Probiotics

The FAO (Food and Agriculture Organisation) of the United Nations and the World Health Organisation (WHO) recently produced guidelines for the use of the term "probiotics" in food (FAO/WHO, 2001). The definition by the expert committee set up by the FAO and WHO in 2001 is as follows: "**live micro-organisms which, when they are administered in appropriate quantities produce a health benefit for the host**". It holds that the term "probiotic" applies solely to live microbes with a proven beneficial effect. This poses the question of micro-organisms which are live at the point of ingestion, which have a proven beneficial effect but which do not survive their passage through the digestive system. The FAO/WHO conference recommended that solely those micro-organisms which survive their passage through the digestive tract should be deemed to be probiotic. It went even further in its requirement as it recommended that not only must the probiotics survive but they must also be able to proliferate in the digestive tract. The working group did not retain these requirements, **defining probiotics as all those micro-organisms which are live at the point of ingestion and which exercise a beneficial effect on the health of infants and young children.**

The FAO and WHO definition also includes live microbes used as vectors for physiologically beneficial compounds, such as, for example, processed strains of *L. lactis* producing Interleukin-10. The group excluded this category of (genetically modified) probiotics from its review.

Although non-live bacteria can induce a beneficial physiological effect, they are not considered as probiotics within this definition and other terms should be suggested. The following terms have been proposed in the literature: abiotic, biotherapeutic agent, etc. The working group was not tasked to rule on this lexicon.

The working group's analysis covered the principal organisms used as probiotics in infant foods; these belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

The nomenclature of probiotic bacteria must conform to scientifically recognised common names. The use of old nomenclatures or names could cause confusion in the mind of the consumer, for example *Lactobacillus plantarum serenitas* is not acceptable. DNA-DNA hybridisation is the reference method for specifying a strain's membership of a species. Characterisation of the strain should then be carried out using a recognised genetic method such as pulsed field electrophoresis (Afssa Report, 2002). Finally, all the strains should be deposited in an internationally recognised collection.

c. Prebiotics

A prebiotic is defined as a **non-digestible substance which induces a beneficial physiological effect in the host by selectively stimulating the growth and/or the activity of a limited number of bacterial populations already established in the colon** (Gibson & Roberfroid, 1995). This definition does not place the emphasis on one bacterial population in particular. It is generally accepted that a prebiotic increases the number of bifidobacteria and of lactic acid producing bacteria, as these bacterial groups can be beneficial to the host. Nonetheless, prebiotics may exist which stimulate the proliferation and/or the activity of other bacterial groups in the intestinal flora. Of the many prebiotic candidates, the best known and most studied are the fructans (FOS: fructo-oligosaccharides, oligofructose and inulin) and other oligosaccharides of galactose and transgalactose (GOS and TOS). The part of lactose which remains undigested in the infant's small intestine is also a prebiotic (Schulze & Zunft, 1991), and several studies have shown that lactose could reach the colon in babies (Kien, 1996). A number of other carbohydrates could claim the designation as prebiotics (xylo-

oligosaccharides, isomalto-oligosaccharides, gluco-oligosaccharides, etc.). Acacia gum has been shown to be prebiotic. Lactulose is also a prebiotic. Some resistant starches and sugar alcohols may also have prebiotic properties. Nevertheless, the group restricted its analysis to the products which are already in use in infant feeding, excluding other ingredients either reserved for other uses (pharmacology) or as yet insufficiently characterised as regards their prebiotic properties in infants.

The prebiotic ingredient must be fully characterised. The products or organisms from which the ingredient is derived must be known and characterised, whether it involves an ingredient isolated from a plant, animal or microbial product, or an ingredient produced by chemical or microbial synthesis. The obtention processes must be described. Furthermore, as prebiotic ingredients are often composed of a mixture of molecules, the active molecules must be identified and characterised and their concentration in the product must be stated. Finally, the micro-organisms targeted by the prebiotic ingredient and its mechanisms of action must also be studied and defined as far as possible.

d. Symbiotics

A symbiotic is defined as a product which contains both one or more probiotics and one or more prebiotics. This definition indicates that the demonstration of a synergetic effect of the pre-and probiotics is not required and each component of the symbiotic may have separate effects. However, it is possible that the prebiotic may be added in order to promote the survival and activity of the probiotic in the digestive tract. If this type of relationship between the ingredients is indicated, it must be scientifically proven. Moreover, and as a general rule for all the symbiotics, the same considerations of characterisation, safety of use and demonstration of beneficial effects as those used for probiotics and prebiotics should be applied.

e. Non-live micro-organisms

Other products containing non-live micro-organisms are or may be added to infant and follow-on formulas with the aim of modifying the intestinal flora and producing beneficial effects for the infant's health. These products may be composed of micro-organisms alone or fermented products (made from cereals, milk, etc.) which no longer contain live micro-organisms. These products are neither probiotics nor symbiotics as the micro-organisms are not live. They may be considered to be prebiotics if their non-digestibility in the small intestine has been proved and if their effects on the intestinal flora have been demonstrated. However, the group decided not to consider them as prebiotics for three reasons:

- their indigestibility in the infant small intestine has not been clearly demonstrated;
- there are very few data available in the literature on their physiological effects and these ingredients are less well characterised and less studied than the standard prebiotics;
- it is probable that their mechanisms of action differ in part from those of the prebiotics which do not contain bacterial cells or fractions of such cells.

As far as the group knows, there are principally two types of milk-based formulas containing non-live micro-organisms. These products are made from the fermentation of milk either with a strain of *Lactococcus lactis*, or with a mixture of two lactic bacteria: *Streptococcus thermophilus* and a strain of *Bifidobacterium breve*. The bacteria are killed after fermentation by heat treatment, then drying or sterilisation.

As with probiotics and prebiotics, the product obtention processes, the safety of the microbial strains used, characterisation of the active ingredients, the safety of use of the finished products, the intended physiological targets and the demonstration of the health benefits for infants must be documented for those products containing non-live micro-organisms.

f. Bacterial strains, species and genera

- A bacterial strain is all the micro-organisms produced from a single cell (isolated). The strain is kept in a collection. Each strain is allocated a code selected by the laboratory or collection.
- A bacterial species is defined as a group of strains deemed to be similar. This is based on the concept of phylogenetic species. For each species a type strain is arbitrarily designated from

among the first strains isolated. However, the criteria for similitude are based on parameters which can vary from one species to another. The definition of the species is therefore fragile and may be amended when more discriminating criteria are identified. Access to genomes has led to the definition of a threshold value for overall similarity between two genomes for the corresponding strains to belong to the same species: at least 70% similarity is required. This value corresponds to a similarity of sequences in the genes coding for ribosomal RNA of about 98%.

- A bacterial genus corresponds to a easily-definable entity, clearly separated from other genera. There is, however, no full consensus on the definition of genera and redefinitions are occasionally suggested. The species in the same genus have genomes in which the degree of similarity is between 30 and 70%. For classification purposes, one type species is used as a reference for each bacterial genus.

- Convention has it that the species name is written in lower case and it is always accompanied by the corresponding genus which has an initial capital. Latin names are written in italics and the genus name can be abbreviated to the initial capital letter. So, in *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Bifidobacterium* is the genus name, *lactis* the species name and Bb-12 the strain identifier.

- A bacterium's beneficial or harmful effects are attributable to one strain and cannot be extended to another strain. Similarly, extension to the species is dangerous and should be prohibited.

g. Colonisation, implantation, proliferation, survival

- Colonisation of the digestive ecosystem by a bacterial strain, species or genus is characterised by a microbial population at a constant level over time and which does not require regular re-inoculation. This assumes that the bacteria which have colonised a given niche multiply there at a rate equal to the rate of elimination for that niche. As a general rule, a micro-organism defined as native or indigenous naturally colonises a habitat in the digestive tract. Native to a given habitat, the micro-organism may be non-native to other habitats which it passes through following elimination from its original habitat.

- Implantation is a term synonymous with colonisation and the authors use both terms equally. It is sometimes used in a more specific sense to indicate the bacterial multiplication which precedes colonisation.

- Bacterial proliferation is a strong multiplication in the ecological niche in question. When it concerns pathogenic bacteria (*salmonella*, *shigella*), it often results in disease. In native bacteria, proliferation enables colonisation. In bacteria in transit which do not colonise, two situations are possible: survival or death.

- Survival is expressed as a percentage of the number of micro-organisms ingested or as concentrations reached at different intestinal sites. During transit, the surviving micro-organism may be inactive (for example, spores which do not germinate) or develop an activity relating to the digestive environment (probiotics, for example). Finally, even when there is no survival, bacterial lysis in the intestinal lumen can release biologically active compounds.

h. The concepts of dominance and sub-dominance

The dominant flora in adult humans is deemed to be bacterial populations representing more than 1% of the total microflora. In terms of culturable bacteria, a dominant population comprises between 10^{10} and 10^{11} Colony-Forming Units (CFU) per gram of stools. At 10^9 and below, sub-dominant flora is the term employed. However, two types of population level must be distinguished. The populations representing between 1 and 0.1% of total microflora are sub-dominant but slight fluctuations in the host's diet or physiology can result in their becoming dominant. Moreover, they represent a considerable bacterial mass which can have an effect on the host. The population level at which a bacterium (non-pathogenic) can influence the host's physiology depends on the bacterium and the effect. It is for this reason that opinions diverge on the estimation of this level. It would seem, however, that below 10^8 CFU/g metabolic effects are minimal. Bacteria in which the population levels are below 10^5 CFU/g are suppressed by the microflora and cannot play a part unless their population levels increase by at least 1000 times.

III. Physiological effects of probiotics, prebiotics and other ingredients designed to modify the intestinal flora in babies and young children

a. Intestinal flora in the newborn baby and young child

i. *Characterisation methods*

Current knowledge of the digestive microflora is based on methods which are constantly evolving, which include microscopy, culture on specific media and direct molecular analysis. Culture on specific media has several limitations. A number of bacterial species of intestinal or faecal flora cannot be cultured under standard conditions. The culture media are not specific enough. Alternative methods, not relying on culture, have therefore been developed to improve the detection and identification of micro-organisms. These are based on the molecular detection of 16s rRNA or its coding gene. Amplification by polymerase chain reaction (PCR) of the 16s rRNA gene directly from colonies cultured on agar jelly, followed by sequence analysis, already enabled precise phylogenetic characterisation of the corresponding strain. The application of this type of method directly to total faecal DNA, permitted, after cloning, listing of the diversity of dominant species in an intestinal sample without passing through any culture phase. Moreover, the variability of the rDNA sequences thus obtained was put to good use to develop specific probes for detecting different groups of bacteria (large groups, genera, species) directly in the faecal samples using quantitative PCR or quantitative hybridisation either on nucleic acids or on cell bacteria fixed by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). These culture-free methods have been validated for a number of bacterial groups, genera and species. Nevertheless, molecular methods have their limitations:

- They are not very sensitive: while they enable a more precise view of the bacteria present to be obtained, they only apply to the populations represented in the largest numbers in the samples studied. For example, in stools in which the bacteria reach population levels of 10^{11} bacteria per gram, hybridisation techniques provide information on the composition of populations present at 10^9 bacteria per gram or higher and techniques based on specific PCR can provide information on species present at 10^6 bacteria per gram or higher.
- They are subject to bias: the stages of extraction of nucleic acids, PCR amplification of genes or fixation of cells for hybridisation are all stages which can bias the populations.
- Measurements are usually expressed as a relative value (percentage of RNA or percentage of total bacteria) while the standard techniques give an absolute measurement of the number of micro-organisms or colony-forming units per gram.
- They provide no information on the role of the micro-organisms *in situ*. Using rRNA as a molecular target provides information on the phylogenetic identity of the micro-organisms but not on their probable physiology in the digestive context.

This means that molecular methods cannot replace the standard approach based on culture for the identification of micro-organisms and the formal description of new species. It underlines the benefits to be gained from coupling the molecular and standard approaches. Finally, quantification of total microbial populations is ideally based on a microscopy method of enumerating the bacteria which can be marked by fluorescent hybridisation using a universal probe targeting the rRNA.

The main groups to be analysed in children are the groups typically dominant in the faecal microflora of the healthy adult human (*Bacteroides* and related genera, *Clostridium leptum* and related species, *Clostridium coccoides* and related species) as well as groups which will be found frequently and in potentially higher proportions in the newborn, but are less prevalent in adults (bifidobacteria, *Atopobium* and related species, enterobacteria, lactobacilli, streptococci and enterococci). Hybridisation probes are available for all these groups while selective media are not always available or satisfactory.

Furthermore, if probiotics are administered, the putting in place and use of tools to monitor the strain or species of probiotic used are essential. In addition, analysis of the impact on the species diversity of lactic bacteria (lactobacilli, streptococci, etc.) and bifidobacteria should be encouraged when using ingredients intended to modify the intestinal flora.

Conclusions:

- Characterisation of the faecal microflora in babies and young children can be achieved using the standard techniques of bacterial culture and by molecular methods without using culture. As the latter provide a view closer to reality in spite of their limitations, they are recommended.
- The population level of the bacterial groups found in the dominant flora in adults, as well as bifidobacteria, the *Atopobium* genus, lactobacilli, streptococci, enterococci and enterobacteria should be characterised in the faecal microflora of babies and young children when food ingredients are used designed to modify the intestinal flora.
- The number of these different bacteria should be compared with the total bacteria in the microflora. This quantity should preferably be measured by counting the bacteria whose rRNA can be detected using a universal fluorescent probe.
- Species diversity provides an interesting, though incomplete, reflection of the impact of the food. It should be analysed systematically as regards lactic bacteria and bifidobacteria when using ingredients designed to modify the intestinal flora in babies and young children.

ii. Composition

In utero, the intestine is sterile. It is nonetheless rapidly colonised by a microbial community originating from the mother (vaginal, faecal, oral flora) and the environment (bacteria carried by the nursing staff, the family, etc.). It is for this reason that the method of delivery influences the development of intestinal flora in the newborn. A prolonged delivery promotes the presence of viable bacteria in the stomach and oral cavity of the newborn. A Caesarean section promotes exposure to environmental and family circle bacteria. The main culturable populations of faecal flora in the newborn at between 0 and 3 days old include enterobacteria (including *E. coli*), streptococci, staphylococci (dominant temporarily) and sometimes, though not systematically, bifidobacteria and lactobacilli (Stark & Lee, 1982; Hudault, 1996). The intestinal microflora of the newborn, composed of only a few bacterial genera during the first few days, develops strongly and rapidly up to dietary diversification depending on the environment, the diet and any antibiotic therapy administered. After dietary diversification, the profile of the dominant flora diversifies and then stabilises.

Two periods therefore appear critical for colonisation of the intestine: the period from birth to dietary diversification and the period around dietary diversification. The working group's interest was mainly centred around the first period. During this time, the baby can be exclusively breastfed or exclusively formula-fed, a third possibility being mixed feeding in which infant formula gradually replaces breast milk. The composition of the faecal flora in babies has been analysed in the first two situations, however, the consequences of the third situation for the bacterial profile of the flora are almost unknown.

Several studies, using conventional culture techniques, showed that the flora in exclusively breastfed babies was dominated by bifidobacteria, while the flora of babies fed with infant formula contained more *Bacteroides*, clostridia and enterobacteria (Starck & Lee, 1982; Yoshioka et al, 1983; Balmer & Wharton, 1989; Hall et al, 1990; Kleesen et al, 1995; Mackie et al, 1999). However, some studies have not confirmed this difference (Lundequist et al, 1985). An analysis by Tannock (1994) showed that clostridia populations were always lower in young breastfed babies when compared with formula-fed babies. Nevertheless, the presence of this bacterial group is not associated with a pathological risk.

Analysis of the intestinal microflora of babies using molecular methods has confirmed the above data. Harmsen et al (2000) analysed the composition of the flora of 12 full-term babies at between 1 and 20 days old. Six of the babies were breastfed and the six others were fed a standard infant formula. In the breastfed babies, the mean percentage of bifidobacteria was less than 40% at birth, the *Bacteroides* were between 0 and 80% and *E. coli* between 0 and 30%. On the 4th day, the flora of all the breastfed babies was dominated by bifidobacteria which represented between 60 and 91% of the flora. The other bacterial genera occupied a sub-dominant position at the same point. In the formula-fed babies, the initial composition of the flora was comparable with that of the breastfed babies. However, the changes were different. In some of the babies (3/6), bifidobacteria did not become dominant. They represented between 28 and 75%, with a mean of approximately 50%. In one of the babies, bifidobacteria were undetectable. In the majority of the babies, the *Bacteroides* reduced after the 4th day, but increased again towards the 20th day, reaching a level between 35 and 61%.

Other studies have placed the emphasis on the diversity of species of bifidobacteria in the intestinal flora of breastfed or formula-fed babies. Three species of bifidobacteria are frequently found in the flora of

breastfed babies: *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* (Matsuki et al, 1999). Nonetheless, a recent study observed no difference in the distribution of species of bifidobacteria and lactobacilli in the flora of breastfed babies and formula-fed babies at the age of one month and at the age of 7 months, meaning before and after dietary diversification (Satokari et al, 2002). In this study, the most frequently measured representatives were *B. infantis* of the bifidobacteria and the species belonging to the *L. acidophilus* group (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*) of the lactobacilli. The dominant populations of these two genera were composed of only one or two species in the majority of the babies. Another interesting result of this study was the absence of differences between breastfed and formula-fed babies in the composition of the dominant bacterial populations of the established intestinal flora at 1 month.

The second critical period after birth in the development of the intestinal flora is the period of dietary diversification, during which non-milk foods are gradually introduced to the baby's diet. These foods expose the babies' flora to different complex carbohydrates. Furthermore, the intestine continues to develop during the first year of life. It is therefore important to define whether the changes in the flora observed during this period are caused by the introduction of new foods or if they simply occur at the same time but are in fact due to other factors (genetic, immunological, etc.). The preliminary results of a longitudinal study suggest that the bacteria flora diversifies with a greater dominance of *Bacteroides* and clostridia even before the introduction of solid food, in both breastfed and formula-fed infants (Martin et al, 2000). Another study indicates that the communities of bifidobacteria remain stable during the period of dietary diversification and that the transition to the species of bifidobacteria found in adults does not appear to be directly in response to the introduction of solid foods into the diet (Satokari et al, 2002). This study also shows that the changes in the bacterial profile observed at the time of dietary diversification are comparable in babies previously breastfed and those which were fed infant formula.

One of the objectives of the introduction of probiotics, non-live micro-organisms or prebiotics into infant formula, follow-on formulas and formulas for young children is to promote a bacterial profile in the faecal flora similar to that observed in breastfed babies. The enrichment of the faecal flora in bifidobacteria is particularly sought after. The products currently on the market have demonstrated this effect in certain groups of babies. It is regrettable, however, that the persistence of the effect after a period of several months of feeding has never been studied and that microbiological analysis has been restricted to a few dominant species. In addition, the effect has not been documented at every age and in particular there is a lack of data on the first days of feeding and at dietary diversification. Knowledge of the impact of probiotics, prebiotics and non-live micro-organisms on the bacterial composition of the faecal flora in infants should therefore be improved and the research continued.

Conclusions:

- The change to dominance by bifidobacteria during the first week after birth seems well-established in breastfed babies.
- A more complex flora might be established in formula-fed babies. Nonetheless, a difference in bacterial profile between the two groups of children has not been established conclusively.
- Whatever the method of feeding, newborn babies whose flora is not dominated by bifidobacteria have high levels of *Bacteroides*, clostridia and enterobacteria.
- The diversity of faecal bacterial populations increases during the period of dietary diversification. It is characterised by a greater dominance of *Bacteroides* and clostridia. The determining factors in bacterial diversification during this period are not known. The direct role played by the introduction of solid foods has not been established.
- In comparison with an infant formula, the precise impact of breastfeeding on the development and characteristics of bacterial diversification when solid foods are introduced has not been established conclusively.
- The introduction of probiotics or prebiotics into infant formulas and follow-on formulas increases faecal concentration of bifidobacteria. Nonetheless, there is a lot still to learn about the impact of these products on the composition of the intestinal flora. The principal data missing concern the possible variation of this effect depending on age, its persistence over time and at dietary diversification and the impact on intestinal bacteria other than bifidobacteria.

b. Colonic bacterial activity in newborn babies and young children

i. Carbohydrate fermentation

Carbohydrate fermentation is a major function of the colonic bacterial flora. Short chain fatty acids (SCFA) produced by the bacteria supply energy to the colonocytes, butyrate being in fact the principal colonocyte energy source in adults; the SCFAs stimulate the absorption of water by the colon and can contribute to inhibiting the growth of pathogenic germs. The profile of SCFA in the faeces of children differs from that of adults. In the first few days of life, SCFA concentration is very low and it then gradually increases. Nonetheless, it remains low during the whole of the first year and only reaches the level found in adults during the second year (Ogawa et al, 1992; Midtvedt & Midtvedt, 1992). The molar proportion of individual SCFA is also very different. In adults, the principal SCFA are acetic acid, propionic acid and butyric acid in mean proportions of 57, 22 and 21% (Cummings et al, 1987) and lactic acid accumulates very little under normal dietary conditions. In babies, acetic acid and lactic acid dominate during the first month of life, while propionic and butyric acid are barely present. The concentration of these two acids increases gradually with age. Propionic acid is present in all children after the age of 6 months and butyric acid after the age of 9 months (Midtvedt & Midtvedt, 1992). Diet influences these SCFA profiles. Breast milk induces a profile dominated by acetic and lactic acids and a low pH of the stools (5.2 – 6) (Edwards et al, 1994; Flickinger et al, 2002). Propionic and butyric acid concentration in these babies increases later, after 6 months. In formula-fed babies, concentration of total SCFA is higher during the first 3 months and the profile of the different SCFAs is more complex than in breastfed babies. Acetic acid remains dominant but propionic and butyric acid are present at higher concentrations than those found in breastfed babies. In contrast, the level of lactic acid is low. The pH of the stools is higher and close to neutral (Okawaga et al, 1992).

In children on mixed feeding, acetic acid remains dominant, propionic acid appears quite rapidly but the appearance of butyric acid can be delayed. Faecal pH is less acid than in exclusively breastfed babies, but lower than in exclusively formula-fed babies (Bullen et al, 1977). Nonetheless, for this group of children, there are still not enough data available to be able to reach a definitive conclusion. The low diversity of the intestinal flora of babies (before dietary diversification) restricts its fermentation capacity for complex carbohydrates. This capacity has been compared *in vitro* with that of adult faecal flora (Parrett & Edwards, 1997). The results confirmed that a baby's flora makes very little use of too complex carbohydrates, but it is capable of degrading sugars and short chain oligosaccharides (fructooligosaccharides). The total quantity of SCFA produced was not affected by the type of feeding received by the infants (breast milk or infant formula) but the proportions of individual SCFA reflected the profiles found in the stools of children, with more acetate and lactate produced by the flora of breastfed babies and higher levels of propionate and butyrate produced by the flora of formula-fed children. To the group's knowledge, the impact on fermentation and SCFA production of the introduction of probiotics or prebiotics into infant formulas and follow-on formulas has not been characterised, with the exception of acidification of the pH of the stools in babies fed this type of formula.

When dietary diversification occurs, infants are exposed for the first time to several different complex carbohydrates. A large proportion of starch can escape digestion in the small intestine during this period, due to the inability of the infant to chew food and the immaturity of the pancreatic exocrine function. This starch reaches the colon with other carbohydrates originating from plant cell walls. Significant quantities of starch have been detected in the stools of children up to the age of 3 years (Verity & Edwards, 1994).

SCFA concentrations and profiles in the stools change during dietary diversification. The speed of the change is linked to the diet prior to this period. In breastfed babies, there is a gradual reduction in lactic acid and an increase in acetic and propionic acid, then later the arrival of butyric acid. In formula-fed babies, the change is less marked, as propionic and butyric acid were already present before the introduction of non-milk foods. However, the proportion of propionic acid reduces while that of butyric acid increases.

The capacity of the colonic flora to ferment complex carbohydrates seems to develop more slowly in breastfed babies than in formula-fed babies. This is consistent with the greater diversity of bacterial species observed in the second group. In an *in vitro* study, it was observed that one month after dietary diversification, the flora of breastfed children could use small sugars and oligosaccharides but not more complex carbohydrates. These were only properly broken down after at least 7 months on

the diversified diet. In contrast, the capacity to ferment complex carbohydrates was established from the start of dietary diversification in infants previously fed on infant formula (Parrett et al, 1997). The impact of the diet at the time when dietary diversification takes place can persist into adulthood. The quantity and type of dietary fibre consumed in the weaning ration of baby rats influenced the capacity of their intestinal flora to ferment these fibres in adulthood (Armstrong et al, 1992). More SCFA were found in the faeces of the adult rats fed for a month on pectin, if these rats had been fed these pectins during weaning. When these rats had been fed fibre other than pectin at weaning, the increase in SCFA induced by pectin in adulthood was not found. Moreover, the rats produced more SCFA in adulthood, even with a low fibre diet, when they had been fed fibre at weaning. In a study conducted in South Africa, the faecal bacteria of black children under 3 in Soweto produced more butyric acid from different carbohydrates *in vitro* than the bacteria from children the same age from the nearby town of Potchefstroom, where the population consists of white South Africans. The authors suggest that this effect could be the result of the much greater quantity of resistant starch consumed by the Soweto children at dietary diversification (Edwards et al, 1998). This result is particularly interesting as the prevalence of colonic cancer is much lower in black adults than in white adults, even when black Africans have a lifestyle and diet in adulthood similar to that of white Africans. Nonetheless, the data do not permit a cause and effect relationship to be concluded.

Conclusions:

- Fermentation capacity, the quantity and the profile of SCFA, depend on the age and diet of babies up to the start of dietary diversification.
- Between birth and the age of one month, acetic acid and lactic acid predominate and propionic and butyric acid are almost absent. Propionic acid increases gradually after 1 month, while butyric acid appears later.
- Breastfeeding induces an SCFA profile dominated by acetic and lactic acids and a low pH of the stools, during the whole breastfeeding period.
- Bottle-feeding encourages the increase of concentrations of propionic acid and later butyric acid. The proportion of lactic acid is low. The pH of the stools is close to neutral.
- When dietary diversification occurs, maturation of the fermentation capacity of the flora is more rapid in formula-fed infants than in breastfed infants.
- The impact on colonic fermentation of the introduction of probiotics or prebiotics into infant formula and follow-on formulas is unknown, other than a lowering of the pH of the stools.

ii. Other non-fermentation enzymatic activities

Most of the non-fermentation enzymatic activities of the intestinal flora do not develop in children before the second year of life and there are very little data available on the impact of the diet of babies and young children on these activities. Nonetheless, a few studies have focused on certain enzymatic activities during the first months of life. Midtvedt et al (1988) reported that the flora's capacity to degrade mucins was not established before the age of 3 months. However, this capacity was observed in the majority of infants over 1 year old and in all children over 2 years (Midtvedt et al, 1994). The capacity to deconjugate bile acids was already present at the age of 1 month (Johnsson et al, 1995), while the capacity to convert cholesterol into coprostanol developed after 6 months and was delayed by breastfeeding (Midtvedt & Midtvedt, 1993). The metabolites of protein degradation such as ammonia, cresol and paracresol were associated with harmful effects on the colonic mucosa and at systemic level after absorption. It was observed that prior to dietary diversification, formula-fed babies had a urease activity and an ammonia concentration in the stools higher than that of breastfed children (Gronlund et al, 1999). Levels of phenol and cresol were also higher (Heavey et al, 2000). It has been suggested that the enzymes β -glucuronidase and β -glucosidase may be implicated in the activation of carcinogens and other toxins in the colon. The level of activity of these enzymes was low in infants breastfed up to weaning and higher in formula-fed infants, which probably reflects the wider diversity of flora in these infants (Gronlund et al, 1999; Heavey et al, 2000). The level of all these bacterial enzymatic activities increases strongly following the introduction of solid food when the flora is more varied (Heavey et al, 2000).

Conclusions:

- A more complex flora has more varied enzymatic activity. Some of these activities have been associated with harmful effects. Nonetheless, there is currently no convincing evidence of the involvement of these activities in the occurrence of disease.

c. Lactose digestion

It is known that certain probiotic strains increase lactose digestion in the adult small intestine, due to the action of their lactase in the intestinal lumen. This effect is reinforced when the milk is gelified and drained more slowly than liquid milk (de Vrese et al, 2001). The value of adding these strains to an infant formula with this objective is more controversial. Some authors have estimated that in the newborn about 35% of lactose can be metabolised in the colon, in particular premature babies (Kien et al, 1996). However lactase activity is present at a high level in the small intestine of most full-term infants and lactose digestion itself is almost total (MacLean et al, 1983; Suarez et al, 1995, Naim 2001). Reduction in lactase activity occurs later in infants (Scrimshaw and Murray 1988) and colic in infants can be a symptom of lactose intolerance. The possible benefit of improving the digestion of lactose in young children is therefore not known and it appears that no data have been published showing a beneficial effect from the addition of a prebiotic or probiotic on lactose digestion in babies and young children.

Conclusion:

- In non-lactose intolerant babies, the value of improving lactose hydrolysis in the small intestine has not been demonstrated.
- In lactose intolerant babies, it is not impossible that the addition of certain probiotics to the diet might be beneficial. However, no clinical data demonstrating this benefit are currently available.

d. Water balance and mineral absorption

Some prebiotics increase, to a moderate extent, the water content of stools in adults. This effect is due to two mechanisms : the first is linked to the increase in biomass excretion, itself high in water, the second is linked to the osmotic power of these prebiotics. The effect on water excretion therefore principally depends on the molecular size of the prebiotic carbohydrates and the dose consumed. Conversely, stimulation of SCFA production by these prebiotics increases the absorption of water by the colon, which might limit the risk of dehydration during diarrhoea (Ramakrishna & Mathan, 1993).

In babies, the risk of a possible disturbance of the hydromineral balance caused by these prebiotics has been raised by the SCF. Studies in babies being fed infant formula containing a mixture of fructose (FOS) and galactose (GOS) oligosaccharides, at a dose of 0.8 g/100 ml of reconstituted product show that the stools are softer, thereby suggesting an increase in water excretion (Moro et al, 2002). Nonetheless, this effect is moderate and at the rate considered it is unlikely that it would cause a water loss likely to have a negative effect on the babies' water balance.

In an initial opinion dated 26 September 2001, the SCF concluded that there was insufficient data to establish the safety of FOS and GOS as ingredients in infant formulas and called for more studies on the potential undesirable effects of these ingredients, in particular on water balance and the bioavailability of micronutrients. The SCF considered that the risk was far less for follow-on formulas, which only accounted for part of a baby's diet, unlike infant formula. It agreed to the addition of FOS and GOS in follow-on formulas at a maximum concentration of 0.8 gram per 100 ml of ready-to-use product. In a second opinion, dated 13 December 2001, the SCF confirmed, on the basis of four clinical studies whose results had not been available at the time of the first opinion, that there was no indication of undesirable effects from infant formula and follow-on formulas containing up to 0.8 gram/100 ml of ready to use product of a FOS-GOS mixture at proportions of 10%-90%.

Studies in adolescents and adults suggest that certain probiotics (fructans in particular), increase the absorption of calcium and magnesium in the colon (van den Heuvel et al, 1999; Scholz-Ahrens et al, 2001). The effect is probably mainly due to the lowering of the colonic pH caused by the fermentation of these prebiotics which facilitates the solubilisation of the minerals in the lumen contents and thereby increases their absorption by the colonic mucosa. However, the possible consequences on the mineral balance and bone density of the subjects receiving these supplements have not been clearly established. In addition, the effects seem significant only with high doses of prebiotics. There is no data available in babies.

Conclusions:

- Prebiotics increase the faecal excretion of water. The effects depend on the dose and molecular size of the prebiotic substances.
- The dose of prebiotics, if they are osmotically active, should be restricted and not present a risk for the babies' water balance. The SCF, based on the current state of knowledge, has set a maximum concentration of 0.8 gram per 100 ml of ready-to-use product of a mixture of 10% FOS-90% GOS for infant formula and follow-on formula (Opinion of 13 December 2001).
- The effects of prebiotics on mineral absorption (calcium, magnesium) are not known in babies. In adults, an increase in the absorption of these minerals in the colon has been observed with high doses of prebiotics. The possible benefit of this increase for mineral status and bone density has not been demonstrated.

e. Intestinal transit, number and characteristics of stools

Some probiotics and prebiotics improve faecal transit and excretion in slightly constipated adults. In infants, there are very little data available on any favourable effects of prebiotics and probiotics. However, it is probable that the mechanisms resulting in a reduction in slight constipation in adults would be identical in infants. These mechanisms mainly depend on an increase in the biomass excreted in the stools due to the effect of prebiotic fermentation and perhaps to a specific effect of some probiotics on intestinal transit. These laxative effects nevertheless remain very moderate in adults and depend on the amount ingested.

In full-term babies, frequency of bowel movements increased and stool consistency improved following the ingestion of a formula containing a mixture of FOS and GOS in comparison with a standard formula. The effect depended on the amount of prebiotic; however, its extent remained low and was not enough to be statistically significant (Moro et al, 2002). The same mixture also increased the frequency of bowel movements in premature newborns (Boehm et al, 2002). In addition, while stools became firmer in the control group, their consistency did not vary in the prebiotic group. No effect on the frequency and consistency of bowel movements was observed, however, in older children (Firmansyah et al, 2001; Saavedra & Tscherneia, 2002).

As far as the group knows, a single published study has shown that one probiotic, *B. lactis* Bb12 (10^8 CFU/g), added to a standard infant formula, reduced the percentage of infants with firm stools and increased the number of infants with soft stools (Saavedra et al, 1999).

Conclusion:

- A favourable effect of prebiotics and certain probiotics on the frequency and consistency of bowel movements in babies and young children has not been excluded. However, too few data are available to establish this effect.

f. Intestinal epithelial barrier: non-immunological factors

The possible effects of the addition of probiotics or prebiotics to infant formula on trophicity and the enzymatic, endocrine and detoxifying functions of the intestinal epithelium do not appear to have been studied in infants. Data in animals are also very rare. One study, conducted on newborn piglets, showed that the addition of fructo-oligosaccharides (3 g/l) increased cellular density and the epithelial proliferation index of the caecum and colon in the animals (Howard et al, 1995). The same team did not find these effects in baby rats fed a weaning food containing various indigestible carbohydrates (30 g/l) including prebiotics (Howard et al, 1995). In adult mice, the ingestion of a food containing 30% milk fermented with a strain of *L. casei*, for 3 and 15 days increased cell proliferation and villi surface area in the small intestine after 3 days; nonetheless, the effect was not significant at 15 days, suggesting that the probiotic did not affect the regulation of cell proliferation in the long term. Similarly, enzyme activity (lactase, amyloglucosidase, maltase and alkaline phosphatase) was increased after 3 days of the diet containing the probiotic but the effect disappeared after 15 days in spite of the continued administration of *L. casei* (Thoreux et al, 1998).

Mucous is a contributing factor to the integrity of the intestinal barrier. There are currently no *in vivo* data indicating whether probiotics or prebiotics influence the synthesis, secretion and/or glycosylation of the intestinal mucins. Stimulation of the expression of certain mucin genes by probiotic strains has

however been observed *in vitro* (Mack et al, 1999). It has been demonstrated in young mice that colonisation by the flora was necessary for fucosylation of the glycoproteins in the enterocyte membranes to be complete (Bry et al, 1996). Inoculation of conventional flora in adult axenic mice re-established a complete fucosylation programme. Nevertheless, only some bacteria seem to act on this process and the action of the most commonly used probiotics has not been studied. A large majority of probiotics have been selected for their capacity to adhere to the intestinal mucosa, including in babies, the hypothesis being that this property is required for competition with pathogenic micro-organisms (Juntunen et al, 2001), and for interaction with the epithelial and/or immunocompetent cells in the intestine (He et al, 2001). Finally, other studies have looked at whether probiotics degrade the mucous, forming the hypothesis that the inability of probiotic strains to degrade the mucous would be a guarantee of their safety of use (Ruseler van Embden et al, 1995).

Translocation is the passage of intestinal bacteria into the mesenteric ganglia, the liver, the spleen and then the peripheral blood. Data obtained in animals suggest that there might be a certain degree of natural translocation in babies, whose intestinal barrier is immature; some authors even suggest that this moderate translocation might be necessary for establishing the immune defences. Nonetheless, the translocation of pathogenic micro-organisms can be the cause of severe infections and death. A recent study indicated that the degree of translocation of the intestinal bacteria is lower in baby rats fed on their mother's milk than in baby rats fed on a milk formula (Yajima et al, 2001). Several studies have shown that certain probiotics reduce the risk of the translocation of pathogenic bacteria in animal models (Suzuki et al, 1997). Nonetheless, the effect of probiotics or prebiotics contained in infant formula is not known.

The capacity of certain probiotics to reverse the increase in intestinal permeability during inflammation of the intestinal mucosa has been reported in animals (Isolauri et al, 1993; Madsen et al, 1991; Schultz et al, 2002). An uncontrolled study in four young adolescents with Crohn's Disease showed that the ingestion of *Lactobacillus* GG for 6 months reduced inflammatory activity and intestinal permeability (Gupta et al, 2000). In atopic babies, treatment with *L. GG* was followed by a reduction in intestinal permeability evidenced by a reduction in faecal excretion of α 1-antitrypsin (Majamaa & Isolauri, 1997).

Conclusions:

- The possible effects of prebiotics and probiotics on the trophicity and functional adaptation of the intestinal epithelium are not known in babies. Some data in animals suggest that these effects might be favourable.
- The interaction between probiotics or prebiotics and intestinal glycoproteins, including mucins, is currently unknown.
- Probiotics reduce bacterial translocation in different animal models. Their effects in babies are unknown, the same applies to prebiotics.
- Some experimental data suggest that some probiotics might stabilise the epithelial barrier by modulating intestinal permeability. The level of proof is still very low and almost non-existent in young children.

g. Systemic and intestinal immunity

The different effectors of non-specific and specific immunity develop gradually during the *in utero* period. However, they are not fully mature at birth; this explains the particular susceptibility of the newborn and particularly the premature baby to bacterial and viral infections. The various antigenic stimuli and T/B cell co-operation enable the complete maturation of the specific immune system during the first years of life (Durandy, 2001). The specific immune response which occurs in the secondary lymphoid organs (spleen and lymph glands) bring into play the T lymphocytes responsible for cellular immunity (cytotoxicity, activation of macrophages and B lymphocytes), and the B lymphocytes responsible for humoral immunity (production of antibodies). This response, antigen specific, necessitates prior education of the T and B lymphocytes. It also requires a cell capable of introducing the antigen (mononuclear/dendritic cell) to the effector T cells.

T lymphocytes in the newborn are naïve and non-memory lymphocytes (Bofill et al, 1994). Their response to the antigen is of a primary type and the majority express the CD45RA receptor characteristic of naïve lymphocytes. Acquisition of the CD45RO marker, characteristic of the T memory lymphocytes, occurs gradually during the first years of life; the values observed in adults are

acquired after the first decade (Durandy, 2001). The primary response of naïve T lymphocytes results in low level production of type Th1 (IL-2 and IFN γ) and Th2 (IL-4, IL-10, IL-13...) cytokines (Lewis et al, 1991; Watson et al, 1991). To this lack of production is added a lack of cellular interaction (Durandy et al, 1995). Finally, naïve T lymphocytes have a lower cytotoxic response capacity than memory T lymphocytes. These characteristics taken together explain a certain degree of immunological immaturity in the newborn. Moreover, at birth, the B lymphocytes mainly produce IgM and have a reduced capacity for isotopic switching (meaning for producing IgG and IgA) compared with B lymphocytes in adults. The various antigenic stimuli and the co-operation with the T lymphocytes enable the generation of memory B lymphocytes expressing the CD27 marker, capable of secondary response and the production of IgG and IgA. An identical percentage of B CD27 $^{+}$ lymphocytes to that in adults is reached during the first year of life. At birth, the baby's rate of immunoglobulin synthesis is very low. Production gradually increases to reach adult levels after the fourth year (Durandy, 2001).

Colonisation of the intestine by microbial flora is probably involved in the maturing and fine adjustment of immune responses. This hypothesis has been well documented in animal models. For example, intestinal flora seems to slow down type Th2 cell activity, thereby promoting oral tolerance in mice (Sudo et al, 1997). In addition, the period during which the microbial stimulus survives seems important. Axenic baby mice can be made tolerant to food antigens only if the intestinal flora is present during the neonatal period, while later implantation of the flora means this oral tolerance cannot be induced (Sudo et al, 1997). Studies in children have focussed principally on the effects of colonisation on specific humoral immunity to the colonising bacteria. Several studies have shown an increase in the secretion of specific IgA and IgM in the saliva and in the stools of babies and young children following the administration of various non-pathogenic strains of *E. coli* (Mellander et al, 1984; Lonodova et al, 1991). In contrast, only one study exploring the relationship between intestinal microbial colonisation in children under 6 months old and the maturation of the immune system has been published to date. The authors concentrated on linking faecal bacterial composition to different factors in non-specific humoral immunity in infants aged 0 to 6 months (Gronlund et al, 2000). They observed that babies fed infant formula before the age of 2 months had a higher faecal concentration of *Bacteroides* (of the type *B. fragilis*) at the ages of 2 and 6 months in comparison with babies exclusively breastfed for more than 2 months. The other bacterial genera were not notably affected by the type of diet. The higher presence of *B. fragilis* was significantly correlated with a higher number of cells secreting IgA and IgM in the peripheral blood, this was found at all the ages studied, whatever the diet. The number of IgG secreting cells was not linked to colonisation by *B. fragilis* bacteria. This bacterial genus alone (of those studied during this project) was linked to modifications in non-specific humoral immunity. In contrast, neither the percentage, nor the faecal concentration of *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp. were correlated with the number of immunoglobulin secreting cells.

Different effects on the immune system have been observed with the administration of different strains of probiotic bacteria (*Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp.), alone or in fermented milk, in several animal models and in healthy adults. In the healthy adult, it was shown that the consumption of certain strains of lactobacilli and/or bifidobacteria stimulated phagocytosis by the mononuclear cells of the peripheral blood (Blum et al, 2002) and increased the total and specific IgA response following inoculation with attenuated *S. Typhi* (Link-Amster et al, 1994; Fang et al, 2000). In newborns and young children, most of the data suggesting that certain probiotics influence the immune system originate from studies on allergies and infections. Administration of live *L. GG* (in comparison with killed *L. GG*) in children (21 months) with a *Rotavirus* diarrhoea, increased the number of cells secreting anti-*Rotavirus* IgA (Kaila et al, 1995). The same probiotic also increased the number of cells secreting *Rotavirus*-specific IgM eight days after oral vaccination in infants aged 2 to 5 months (Isolauri et al, 1995). In children aged 21 months suffering from atopic eczema, ingestion of *L. GG* for four weeks increased serum IL-10 concentration compared with the circulating levels measured before and at the start of the treatment (Pessi et al, 2000). The other parameters measured (serum IL-6, IL-12, TNF α and IFN gamma levels; faecal IgA and TNF α concentrations) were not modified by the *L. GG* in this study. In healthy children aged from 15 to 31 months, an infant formula containing live bifidobacteria (*B. lactis* Bb12), consumed for 21 days, increased levels of total IgA in the stools and circulating levels of specific anti-poliovirus IgA (Fukushima et al, 1998). The same probiotic lowered soluble CD4 and TGF- β 1 concentration in the blood of infants (5 months) presenting with atopic eczema (Isolauri et al, 2000). Finally, a recent study has indicated that the administration of *L. GG* for 7 months reduced the number of children suffering from respiratory infections and the use of antibiotics in Finnish children aged between 1 and 6 years old; in total, the children who had been

given this probiotic were absent less often from nursery due to illness (Hatakka et al, 2001). However, no immunological parameters were measured in this study.

A controlled study, conducted on twenty babies on their discharge from the maternity unit fed either a standard infant formula or one containing milk fermented with lactic bacteria (*S. thermophilus* and *B. breve*), these bacteria being killed in the final formula, showed a significant increase in anti-poliovirus secretory IgA response after the second Pentacoq vaccination (Romond et al, 2001). Only one summary of this study has been published so far.

Very little is known about the possible effects of prebiotics on the immune systems of young children. Children aged 11-12 months were fed an infant formula with or without fructo-oligosaccharides for 6 months (n> 60 in each group). The children which had been given the prebiotic presented less frequently with symptoms of fever and episodes of rhinorrhea; they were given fewer antibiotics and were absent less often from the nursery due to illness (Saavedra and Tschernia, 2002), which suggests that defensive capabilities against various infections had been increased in these children. However, this study has not yet been published in full and the possible modification of different markers for the functioning of the immune system is not known. Another controlled study showed that a cereal-based formula containing a mixture of inulin and FOS (daily consumption of the prebiotic mixture was about 0.2 g/kg body weight) was well tolerated by infants aged 7-9 months, had no negative impact on growth, but increased levels of vaccinal IgG 10 weeks after immunisation of the children against measles (Firmansyah et al, 2001). The positivity rate with an adequate IgG response was 96% in the children who had been given the prebiotic compared with 88% in the control children. Levels of anti-measles IgM were no different. Only a summary of the study is currently available.

Conclusions:

- The immune system is not completely mature in full-term newborn babies and continues to develop during the first years of life.
- Colonisation of the intestine by bacteria is an essential stimulus for the development of immunity. However, the exact nature of the relationship between the maturation of the immune system and colonisation by the different bacterial populations is barely known in children.
- Several studies have shown that certain probiotics (*Lactobacillus GG*, *Bifidobacterium Bb12*) increase the post-vaccinal secretory IgA response.
- Preliminary results indicate that infant formula containing *Bifidobacterium C50* inactivated after fermentation could have the same effect. Nonetheless, the results have not yet been sufficiently characterised.
- Preliminary results suggest that certain prebiotics (fructans) might influence the immune system in young children. Other studies are required to establish that effect.

IV. Preventive" and curative clinical effects of probiotics, prebiotics and other ingredients designed to modify the intestinal flora in babies and young children

a. Allergies

Several epidemiological studies have indicated that the occurrence of an infection (in the widest sense) in young children is likely to reduce the risk of developing atopic phenomena later on (Langhendries, 2001). Other studies suggest that antibiotic therapy during early childhood and more generally, improvements in hygiene, may promote atopia by modifying the intestinal microbial environment (Alm et al, 1999; Brabäck et al, 1998). At the same time, a comparison of the prevalence of allergies in Estonia and Sweden has suggested that the dominance of lactic acid bacteria in the intestinal flora of children might protect against the development of allergies (Björksten et al, 1998; Björksten et al, 1999). More recently, one study analysed the bacterial profile in at-risk atopic children at the age of 3 weeks and at the age of 3 months and linked this profile to the occurrence of an atopic reaction at the age of 1 year. The proportion of clostridia was higher and that of bifidobacteria tended to be lower, leading to a significant reduction in the bifidobacteria/clostridia ratio in atopic children in comparison with non-atopic ones (Kalliomaki et al, 2001). The same team observed that serum IgE concentration was correlated with the number of *E. coli* and *Bacteroides* in atopic children intolerant to a formula containing hydrolysed milk proteins and that supplementation of the feed with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 reduced the number of *E. coli* and slowed the growth of *Bacteroides* at dietary diversification (Kirjavainen et al, 2002).

Based on the epidemiological hypothesis that the bacterial profile of the intestinal flora is a determining factor in the development of allergies, in particular atopia, four published clinical studies have sought to demonstrate the benefit of ingesting probiotics to prevent or treat atopic eczema. These studies were all carried out by the same Finnish team, at Turku University. The first study showed that the oral ingestion of *Lactobacillus rhamnosus* GG, at a dose of 5.10^8 cfu/mg of food for one month, in babies aged from 2 to 16 months already allergic to cow's milk, improved clinical symptoms and reduced intestinal inflammation (Majamaa & Isolauri, 1997). The same authors confirmed these results in a second controlled study in 27 babies aged about 5 months, breastfed and suffering from atopic eczema (Isolauri et al, 2000). Weaning these babies with a hydrolysed formula with the addition of a strain of *Lactobacillus* GG (3.10^8 cfu/g) or a strain of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (10^9 cfu/g) significantly reduced mean SCORAD and improved skin condition after 2 months. Serum CD4 concentration and urine levels of eosinophil protein X were reduced. There was no significant difference between the two probiotics. In both studies the probiotics were ingested in the form of a supplement not included in the food. This team then worked on the prevention of atopia. In a controlled, randomised and double blind study, the authors gave a supplement containing 10^{10} cfu of *Lactobacillus* GG, for 2 to 4 weeks prior to delivery to mothers who had an allergic first degree relative or partner. They then continued the supplementation in the breastfeeding mother or the newborn for 6 months at the same dose. The frequency of atopic eczema during the first two years was reduced by half in the group given the probiotic (Kalliomaki et al, 2001). However, in the allergic children, neither SCORAD nor serum IgE concentration were modified by the supplementation. These results have been confirmed by the same authors who recently showed that the administration of *L. GG* (2.10^{10} cfu/d) to mothers during pregnancy and lactation reduced very significantly the risk of atopic eczema in the child during the first two years (RR= 0.32) and increased the milk content of TGF- β 2 (Rautava et al, 2002). These results look very promising. It must be emphasised, however, that they have only been obtained by one team to date and therefore require confirmation by other researchers in other countries and under other genetic and health conditions. In a highly critical editorial, Matricardi (2002) highlighted the weak points in these studies: the lack of a comparison of the bacterial profile of the faecal flora in the control and supplemented children; the lack of difference in the median values of the SCORAD in the two groups in the study by Majamaa & Isolauri (1997); no difference in IgE and SCORAD between the two groups of atopic children in the study by Kalliomaki et al (2001); etc.

Very few studies have been published on the effects of probiotics on other allergic diseases. The consumption of non-thermised yoghurts for one year reduced symptoms of nasal allergy and serum IgE levels in adults (Trapp et al, 1993). No effect was found in another controlled study in adults with mild asthma, given yoghurt with or without live lactobacilli for one month (Wheeler et al, 1997). Finally,

a recent study in children and young adolescents allergic to birch pollen showed no improvement in symptoms following supplementation with *L. GG* (5.10^9 CFU/j) for 5 months (Helin et al, 2002).

Moreover, to the group's knowledge, no study has yet been published concerning the possible effects of prebiotics on the prevention or treatment of allergies.

Conclusions:

- A reduction in atopic eczema symptoms has been shown following administration of certain probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium lactis* Bb-12) in at-risk children.
- The risk of atopic eczema seems to be reduced by the ingestion of certain probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG) by the mother prior to delivery and during breastfeeding. These effects have been reported by a single team and require confirmation by other teams in other countries.
- The possible effects on atopic eczema of other probiotic strains or prebiotics or ingredients containing non-live micro-organisms, as a treatment or preventive, are not known.
- The possible effects of probiotics and prebiotics on other types of allergy have not been established.

b. Infectious diarrhoea

Epidemiological studies have indicated that breastfeeding (for more than 3 months) reduces the risk of infections, especially gastro-intestinal, in young children (Duffy et al, 1986; Brown et al, 1989; Howie et al, 1990). Other studies have shown that in reality breastfeeding protects against infection during the first years of life and delays risk to a later age, at a time when the maturation of the intestinal barrier is more advanced (Clemens et al, 1986; Clemens et al, 1993). As breastfeeding is linked to an intestinal flora richer in acetic and lactic acid bacteria, the assumption was made that the administration of probiotics might improve the treatment of infectious diarrhoea in babies and reduce its occurrence.

Several controlled clinical studies have demonstrated that the administration of certain probiotics reduces the duration of infectious diarrhoea. A recent meta-analysis reviewed all the controlled, randomised and double blind trials in which treatment with lactobacilli was given during acute diarrhoea in children under 3 years old (Van Niel et al, 2002). The results show that the duration of the diarrhoea was reduced by approximately 0.7 day [95% confidence interval: 0.3 – 1.2 d] and that the frequency of motions was reduced by 1.6 motions/d [0.7 – 2.6] from the second day. The therapeutic effect seems dose-dependent and effective from 10^{10} cfu/d. In addition, the administration of probiotics seems to benefit all types of infectious diarrhoea, even though the effect might be more pronounced in *Rotavirus* diarrhoea. Another meta-analysis (Szajewska & Mrukowicz, 2001) reached similar conclusions. Even if these meta-analyses have their limitations, acknowledged by the authors themselves, they strongly suggest that the administration of probiotic strains of lactobacilli improve the clinical symptoms of acute diarrhoea in young children. A new and recent clinical study (not included in the meta-analyses), carried out with a mixture of a strain of *L. rhamnosus* and a strain of *L. reuteri*, also showed that the duration of the diarrhoea tended to be reduced in the treated group of children (6 to 36 months) and that the effect became highly significant when the treatment was applied from the start of the diarrhoea (Rosenfeldt et al, 2002). Hospital stays were reduced by half in the treated group. At the end of the treatment, the *Rotavirus* antigen was found in 12% of the treated patients and 46% of the controls.

Other studies have researched the existence of a preventive effect of probiotics on the occurrence of infectious diarrhoea. In a wide sample of undernourished Peruvian children, aged from 6 to 24 months, the administration of *Lactobacillus GG* for 15 months reduced the incidence of episodes of diarrhoea in comparison with children given a placebo (Oberhelman et al, 1999). The effect was more pronounced between 18 and 29 months and was restricted to non-breastfed children. However, the duration and causes of the diarrhoea were similar in the two groups of children. The incidence of diarrhoea was reduced in hospitalised children given a preventive treatment of *L. GG* (Szajweska et al, 2001). In contrast, two other studies carried out with the same probiotic found no effect (Vanderhoof & Young, 1998). Other probiotics might be effective. Feeding an infant formula enriched with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 reduced the incidence of diarrhoea and the carriage of *Rotavirus* in babies hospitalised for long periods (Saavedra et al, 1994). These results have been confirmed in France with healthy children in nurseries (Chouraqui et al, 1998). Finally, two studies have shown that the concomitant administration of *L. GG* with antibiotic therapy tended to reduce the incidence of antibiotic-associated diarrhoea and its duration and the number of daily bowel movements, in children with an average age of 4 (Arvola et al, 1999; Vanderhoof et al, 1999).

The effect of formulas containing non-live lactic bacteria was evaluated in two clinical studies. In Chile, two groups of children under 12 months recruited in two different centres were given either a milk containing two non-live bacterial strains (*S. thermophilus* and *L. lactis*), or a comparable milk without the bacteria, for 6 months. The incidence and duration of bacterial or parasitic diarrhoea was lower in the group receiving the milk fermented with lactic bacteria (Brunser et al, 1989). In France, the consumption of another type of milk containing non-live lactic bacteria (*S. thermophilus* and *B. breve*) reduced the severity of episodes of diarrhoea in babies in crèches (n> 900), aged between 4 and 6 months and followed for 5 months, in comparison with a standard infant formula. In contrast, neither the incidence nor the duration of episodes of diarrhoea differed significantly between the two milks (Goulet et al, 2001).

Conclusions :

- Some strains of *Lactobacillus* reduce the duration and improve the symptoms of infectious diarrhoea in children. The effect is moderate but significant. It should be noted, however, that these probiotics were administered separately from food in the majority of the studies.
- The extent of the effect depends on the dose of *Lactobacillus* and the type of diarrhoea, the effect seeming more marked in *Rotavirus* diarrhoea.
- Certain probiotics (*Bifidobacterium lactis* Bb-12) have a preventive effect. There are still very few studies, however, and these are restricted to populations of babies in long or medium-stay units.
- Infant formulas made with milk fermented with strains of lactic bacteria, subsequently inactivated, might have positive effects on the incidence and severity of diarrhoea. There are still not enough studies available.
- The effect of prebiotics is not known.

c. Other infections

The consumption of certain probiotics may improve the symptoms of non gastro-intestinal infections (urogenital, respiratory, etc.) in adults. Similar effects in children have not yet been published. However, one controlled, randomised, double blind study has been conducted in children, with an average age of four and a half, regularly attending a nursery in Helsinki, Finland (Hatakka et al, 2001). Approximately ¼ litre of milk with or without a supplement of *Lactobacillus GG* (10^6 cfu/ml) was consumed daily by these children during 7 months in winter. The number of days with respiratory or gastro-intestinal symptoms, the number of days' absence due to illness and of respiratory infections diagnosed by a doctor and the number of days on antibiotics were calculated. The results show that the children treated with *L. GG* were absent less often due to illness, the number of children suffering from respiratory infections was reduced by 17% in this group and that antibiotic treatment for respiratory infections was reduced by 19%. Another study of the same type and involving healthy American children aged from 4 to 24 months, also concluded there was a modest but genuine benefit from dietary supplementation with FOS (about 1 g/d) on the number of episodes of fever associated with colds and on the use of antibiotics in respiratory infections (Saavedra & Tschnia, 2002).

Conclusions :

- Certain probiotics (*L.GG*) could be of modest but genuine benefit in reducing the risk of infection and the use of antibiotics in young children. However, there is currently insufficient published data to confirm this benefit.
- Certain prebiotics (FOS) could have similar effects. Again, more data is essential.
- The possible effects of non-live micro-organisms are not known.

d. *Helicobacter pylori* infection

Experimental data *in vitro* and in animals suggest that certain lactic bacteria might inhibit the proliferation of *H. pylori*. There are currently very little data in humans but these are encouraging. (Michetti et al, 1999; Felley et al, 2001). The level of proof is nonetheless considered still insufficient to permit any nutritional or medical recommendation. As far as the working group is aware, there are no published data for children.

e. Necrotising enterocolitis

The benefit of certain probiotics in the treatment or prevention of intestinal inflammation has been shown in different animal models (Madsen et al, 1991 ; Schultz et al, 2002). More recently, the

possible benefit of certain prebiotics has also been suggested based on these animal models (Videla et al, 2001). Finally, a few controlled clinical studies carried out in adult patients have confirmed the value of certain mixtures of probiotics (Gionchetti et al, 2000) and perhaps certain prebiotics (Welters et al, 2002).

The inflammatory diseases most likely to occur in babies are necrotising enterocolitis (NEC) and allergic colitis. The chronic inflammatory diseases of the intestine (Crohn's disease, ulcerative colitis) affect older children not included in the working group's field. They are therefore not covered in this report. The few data available on allergic colitis have been included in the paragraph on allergies. Neonatal NEC is the most frequent gastro-intestinal emergency in premature babies. Its physiopathology is still not fully understood and the conjunction of several factors seems to be involved in its occurrence. Diet is one of the factors implicated, and a reduction in risk has been shown with human breast milk when compared with infant formula (Lucas et al, 1990). However, the protective mechanisms in human breast milk have not been clearly established. The presence of bacteria in the intestine is a prerequisite for the development of NEC. The bacterial flora of premature babies hospitalised in special care units differs significantly from that of full term babies and may be one of the trigger elements for intestinal inflammation. For this reason, it has been suggested that the administration of certain probiotics might be of benefit to these babies. Some studies carried out using animal models support this hypothesis (Butel et al, 1998; Caplan & Jillings, 2000). Nonetheless, as far as the working group is aware, as yet no clinical study has demonstrated the benefit of these probiotics in the prevention and treatment of NEC in premature babies. The effect of prebiotics is also unknown. Furthermore, as far as prebiotics are concerned, evidence is required that the administration of these ingredients does not promote the proliferation of the bacteria which colonise the intestines of premature babies and which are assumed to increase the risk of NEC.

Conclusions:

- Data in animals suggest that the administration of certain probiotics could reduce the incidence and severity of NEC in premature babies. There is no data available in human premature neonates.

V- Benefit of using probiotics, prebiotics and other ingredients designed to modify the intestinal flora in healthy babies and young children

The use of probiotics, prebiotics and other ingredients designed to modify the intestinal flora in healthy babies and young children is based on the hypothesis that these products might help to maintain the child's well-being and health and reduce the risk of intestinal, allergic and respiratory illnesses whilst on a purely milk diet. The hypothesis has been extended to a contribution to the reduction of the long term risk of degenerative disease (cancer, cardiovascular disease, etc.). Several of the aspects underlying these hypotheses require comment.

In the first place, we do not know how to measure overall health. Secondly, there are no studies indicating whether regular consumption of milk containing a probiotic or prebiotic helps more in maintaining health than other hygienic, dietary and behavioural measures. To date, only one study has shown a modest benefit from a probiotic on the incidence of respiratory infections and the use of antibiotics in children in the same city (Helsinki, Finland), attending a nursery (Hatakka et al, 2001). A similar type of study, in the United States, indicated that the addition of fructo-oligosaccharides to follow-on formulas for children aged about 12 months could result in a similar benefit (Saavedra and Tscherneia, 2002). A few studies also suggest that certain probiotics have a prophylactic effect on *Rotavirus* diarrhoea and perhaps on the incidence of atopic eczema. Nonetheless, other multi-centre studies, randomised for age, sex, race nutritional status, socio-economic status, etc., are essential to give credit to the idea that the consumption of milk supplemented with probiotics or prebiotics would be beneficial to healthy children.

The benefits to be gained from modulating the intestinal flora of healthy young children remain controversial. The idea is based on the bacterial composition of the flora of breastfed children, presumed to be the "ideal" composition. New results from the analysis of the bacterial profile of the faecal flora in newborn babies and young children, obtained using molecular methods, show that the distinction between breastfed children and formula-fed children is not as clear as was thought until very recently (cf. III.a). Moreover, the impact of the regular consumption of probiotics or prebiotics on the establishment of the dominant and sub-dominant flora in the newborn has not been clearly established: might the implantation of possibly beneficial commensal micro-organisms be inhibited by the ingestion of probiotics when the flora is not yet fully stable? Conversely, could micro-organisms which might have harmful effects be assisted by prebiotics? Another point to consider is the production of organic acids during fermentation and the maturation of the fermentation capacity of the intestinal flora. Breastfeeding promotes the production of acetic acid and lactic acid and lowers the faecal pH. These factors are considered favourable to the resistance to pathogenic micro-organisms, as acetic and lactic acid are bacteriostatic and the acid pH is not favourable to the proliferation of pathogenic agents. However, maintenance of a simplified flora and SCFA profile for an excessive period can also have drawbacks; maturation of the fermentation capacity in children might be delayed and represent a handicap when dietary diversification takes place. The impact of these new products on the introduction of solid food must be considered.

These remarks as a whole indicate that more research is needed. To date, the majority of the research has related to children at risk of gastro-intestinal problems or allergies. It is essential that more work is done on healthy children and on the "normal" functions of the intestinal flora.

VI- Safety of use of probiotics, prebiotics and other ingredients designed to modify the intestinal flora in foods for babies and young children

a. Reported and potential problems

i. Allergy

As far as the group is aware, a single case of allergic reaction has been reported with the ingestion of inulin in an adult subject (Gay-Crosier et al, 2000). The working group has not found any information indicating a particular risk from the use of indigestible carbohydrates free of protein contaminants, in adults and children. Similarly, no data has been found suggesting a risk of allergic reaction with probiotics.

In babies at high risk of allergy (family history), it is recommended that dietary diversification be delayed to the age of 6 months. The introduction of prebiotics or symbiotics from birth would require specific monitoring to be put in place for these at-risk newborns.

Conclusions:

- To date and as far as the group is aware, no allergic reaction associated with the ingestion of prebiotics, probiotics or symbiotics has been described in babies or young children.
- Nonetheless, specific monitoring of newborn babies with a family history of allergy would be required if administering infant formula containing prebiotics or symbiotics.

ii. Antibiotic resistance

Genetic exchanges occur frequently in the microflora, probably a positive evolutionary factor. The digestive microflora contains bacterial populations with mobile genetic elements (transposons, plasmids). In addition, bacterial lysis in the digestive tract results in the salting-out of bacterial DNA which can be incorporated (in tiny numbers) by bacteria in the microflora. Transfers of genes for pathogenicity, in particular genes for antibiotic resistance, are therefore theoretically possible in the intestinal microflora and probiotics could constitute either gene donors or intermediate or final receptors.

A check should therefore be made on the probiotic strains and evidence that the strain contains no genes for antibiotic resistance carried by mobile, and therefore transferable, genetic elements, must be provided. These types of resistance carried by mobile elements must be distinguished from the species' intrinsic resistance, considered non-transferable.

The hypothesis that probiotics might be intermediate or final receptors of genes for pathogenicity is unlikely, given the lifespan and the low proliferation in the digestive tract of the principal probiotics used in infants. This hypothesis however, requires testing in high-risk situations (for example resistance to vancomycin). Nonetheless, in the current state of knowledge, this consideration should not restrict the consumption of probiotics.

Conclusion:

- The strains used as probiotics or symbiotics must not contain known factors of pathogenicity. In particular, strains containing antibiotic resistance carried by mobile genetic elements and harmful to humans must be excluded.

iii. Infections

The risk of infections from probiotics, in particular from lactobacilli and bifidobacteria, is considered negligible for the healthy adult population. For example, in Finland, the number of cases of bacteraemia involving *L. GG* was assessed at 0.3 cases per 100,000 persons/year, although this probiotic is consumed in large amounts in this country (Salminen et al, 2002). However, cases of infection caused by bacteria of the same species as the standard probiotics have been reported in patients with serious health problems, with weakened immune defences (Rautio et al, 1999; Mackay et al, 1999; Antony, 2000; Marteau, 2001), presenting a breach of the intestinal barrier (Farina et al, 2001), suffering from valvular heart disease or with a central line inserted (Jureen et al, 2001).

No data was found by the working group on healthy babies and young children which showed a risk of infection from a probiotic or an increased risk of infection by virulent micro-organisms from prebiotics. Similarly, as far as the group is aware, no case of infection associated with the ingestion of probiotics and/or prebiotics has been reported in pre-term babies. Nonetheless, as there is not nearly enough information available for this population, the group is recommending that specific studies are conducted in pre-term babies before infant formulas containing probiotics and/or prebiotics are used more widely, as this population is characterised by immunological immaturity.

Conclusions:

- In the current state of knowledge, infant formulas containing probiotics, prebiotics or symbiotics should be avoided in infants with a congenital or acquired immune deficiency (treatment with immunosuppressors, corticosteroids, etc.).
- As the risk of infection associated with use of probiotics, prebiotics or symbiotics in premature newborn babies is still not known, specific studies should be conducted in these children.
- As a general rule, the resistance capacity of probiotic strains to the host's innate defences should be assessed before the strain is used in foods for newborn babies and young children.

iv. Osmotic diarrhoea

As already indicated above (III-d.), certain prebiotics are indigestible carbohydrates of small molecular size (disaccharides or oligosaccharides) which might cause osmotic diarrhoea in large doses. The concentration of these ingredients in infant formulas should therefore be restricted in such a way that maximum consumption of the formula would provide a markedly lower quantity of prebiotics (safety value) than the value triggering diarrhoea. Moreover, the concentration of prebiotics in follow-on formulas must be calculated based on the possible presence of other indigestible substrates in the formula (emulsifiers, colloids, sugar-alcohol sweeteners, fibre, etc.) and in the infant's diet.

Conclusions:

- The dose of prebiotics, if these are osmotically active, should be restricted and not represent a risk for the babies' water balance. Based on current knowledge the SCF has set a maximum concentration of 0.8 gram per 100 ml of product when using a mixture of 10% FOS-90% GOS for infant formulas and follow-on formulas (Opinion of 13 December 2001).
- The dose of prebiotics contained in the formula must be calculated based on the other indigestible substrates contained in the formula and in the infant's diet.

v. Abdominal pain

Symptoms of intestinal discomfort, mainly excess flatulence sometimes combined with abdominal bloating and/or cramps, have been reported by adult subjects during consumption of certain prebiotics. The effect depends on the type of prebiotic (short chain seem less well tolerated), the dose ingested, the mode of consumption (taking them separately from a meal increases the symptoms) and also the individual, certain subjects being more sensitive than others. The origin of this difference might originate from the bacterial profile of the subjects and their capacity to produce gas. The effect of prebiotics on gas production and intestinal comfort in children is poorly characterised. One study has shown that gas production in babies was strongly influenced by diet, breastfed children producing more hydrogen than formula-fed babies, but less sulphur gas (Jiang et al, 2001). The possibility of intestinal discomfort in infants fed formulas containing prebiotics should therefore be considered by industry. However, the current state of knowledge provides no justification for a restriction on use relating to this issue.

b. Potential at-risk groups

- The risk of opportunistic infections is higher in children with a congenital or acquired immune deficiency. For this reason, in the current state of knowledge, the use of formulas containing probiotics, prebiotics or symbiotics is not recommended for these children.
- Supplementing the diet of pre-term babies with probiotics, prebiotics or symbiotics would require prior study of the impact of these foods on the flora of the pre-term newborn. It is not in fact possible to extrapolate the effects described in the full-term newborn to the potential effects in the pre-term newborn, whose intestinal flora does not necessarily contain the same bacterial species.

c. The recommended tests

In order to guarantee the safety of use of infant formulas containing probiotics, prebiotics, symbiotics or non-live bacteria, verification is required of the safety of the ingredients at the recommended dose, how often the bacterial species is linked to an infection or an allergy, the likelihood of producing harmful metabolites or toxins, etc. It is also necessary that consideration be given to the consumers who might run greater risks of undesirable effects with these products (cf. VI-b).

- For probiotics or non-live micro-organisms present in infant formulas, the safety evaluation criteria for the micro-organism are those recommended by Afssa (Afssa Report, 2002).
- For prebiotics, the safety evaluation criteria are those traditionally used for ingredients. Moreover, in view of the secondary effects which can occur with certain prebiotics if the dose used is too high (osmotic diarrhoea, excessive gas production), it is recommended that this dose be restricted.

d. Setting up a monitoring system

As the use of infant formulas containing probiotics, prebiotics, symbiotics or non-live micro-organisms is relatively recent in some cases, the putting in place of a system of monitoring or vigilance (nutravigilance to draw a parallel with pharmacovigilance) is required to improve the identification of any undesirable effects. This type of system could also be used to evaluate the long term benefits of these products.

VII- Guidelines on the use of probiotics, prebiotics and other ingredients designed to modify the intestinal flora, in infant formulas and follow-on formulas

a. The selection, classification and identification of probiotic strains

- Selection of the probiotics used in infant foods must be based on evidence of their safety (cf. VI.c) and effectiveness, under recommended conditions of use, for the target population using the recommended dose and method of administration.
- The majority of the probiotics used in infant foods are Gram positive bacteria, most of which belong to the two genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Nevertheless, the working group is not excluding the possibility that other micro-organisms or bacterial genera could be used in the future on condition that they comply fully with the safety and effectiveness criteria.
- The nomenclature of probiotic bacteria should use the scientifically accepted common names. Use of old nomenclatures or names which could cause confusion in the mind of the consumer, for example *Lactobacillus plantarum serenitas*, is not acceptable.
- DNA-DNA hybridisation is the reference method for specifying a strain's membership of a species. Characterisation of the strain must then be performed using a recognised genetic method such as, for example, pulsed field electrophoresis (cf. Afssa Report 2002).
- The activity of a probiotic is specific to the strain and cannot be extrapolated to another strain of the same species. For this reason, any generalisation of the effect of one probiotic to the bacterial species is dangerous and should be prohibited.
- The same principles of selection, characterisation and identification must be applied to non-live micro-organisms and symbiotics.

b. Procedures for obtaining and characterising prebiotics

- The products or organisms from which the prebiotic ingredient is obtained must be known and characterised, whether it is an ingredient extracted/isolated from a plant, animal or microbial product or an ingredient produced by chemical or microbial synthesis.
- The obtention processes must be described.
- The active molecule(s) must be identified and characterised and their concentration in the product must be defined.
- The micro-organisms targeted by the prebiotic ingredient must be identified as fully as possible.
- The same principles of characterisation for the raw materials, the obtention processes and the active principles must be applied to products containing non-live micro-organisms or symbiotics.
- As regards symbiotics, any relationship claimed between the prebiotic and the probiotic (improvement of the survival and/or the activity of the probiotic, for example) must be demonstrated.

c. Safety of use

- The safety of probiotics or non-live micro-organisms present in infant formulas must be assessed in conformity with Afssa's recommendations (AFSSA Report, 2002).
- The safety of prebiotics must be assessed based on the standard criteria used for permitted ingredients.
- The quantity of prebiotics used, if they are osmotically active, must be restricted and not pose any risk to the water balance in babies.
- In the current state of knowledge, infant formulas containing probiotics, prebiotics or symbiotics should be avoided in children with a congenital or acquired immune deficiency (treatment with immunosuppressors, corticosteroids, etc.).
- As the risk of infection associated with the use of probiotics, prebiotics or symbiotics in premature newborn babies is currently not known, specific studies must be carried out in these infants.

d. **Storage of infant formula and recommendations for use**

- The viability and identity of probiotics and the stability or prebiotics must be regularly verified in the infant formulas during storage.
- The concentration of probiotics and active prebiotics must be known at the time of and after the best before date.
- The viability and activity of the probiotics, the stability of the prebiotics and the safety of these ingredients must be maintained during processing, handling and storage of infant formulas containing these ingredients. For example:
 - As enough bottles are often prepared to last 24 hours in institutions, the viability of the probiotics and the stability of the prebiotics must be assessed under these conditions, as well as the possible proliferation of bacteria due to the presence of these ingredients in the bottles.
 - There must be clear indication that excessive heating of bottles (for example using a microwave oven) causes the death of the probiotics and therefore the probable elimination of the effects of their presence.
 - The recommendation that only water with a very low mineral content be used in the preparation of bottles should be accompanied by a warning regarding use of water considered laxative when the milk contains prebiotics.
 - Storage conditions for the infant formulas (temperature, humidity, etc.) by the users must be indicated on the packaging.

e. **Demonstration of physiological and clinical effects**

Demonstration of the safety and the nutritional, physiological and/or therapeutic effects of infant formula and follow-on formulas must be based on trials carried out in babies and/or young children. These studies must be conducted in accordance with the rules of good practice for clinical trials. Naturally, they must have received authorisation from a consultative committee for the protection of human subjects in biomedical research and the clear consent of the parents. Assessment of the degree of proof provided by the results of these studies must be based on the following criteria (Aggett et al, 2001; Koletzko et al, 2002):

i. Target groups, environment, number of infants to be included

- The studies are carried out in infants representative of the groups of infants targeted by the infant formula and/or the claim (age, state of health, etc.).
- The environment in which the infants are developing is clearly characterised and its possible impact on the results of the study has been assessed (e.g. nurseries compared with "home", neonatal units, etc.).
- A sufficient number of children must be included in the study to enable a high statistical significance to be obtained (P value under 0.05 at least).

ii. Study protocol

- The trials must be controlled and include a placebo and/or control group. The placebo must be an infant formula with the same composition as the formula being tested in which the components assumed to be active (probiotics or prebiotics) are absent or inactive. When the trial protocol does not permit the use of a placebo, a control group of infants not being given the formula must be included in the trial. Infants with equivalent characteristics but exclusively breastfed would constitute an ideal control group.
- Distribution of infants across the different groups must be randomised.
- Distribution of the placebo and the tested formula must be done double blind (neither the researcher, nor the child's parents know which type of formula is being distributed).
- The possibility of undesirable events occurring during the trial must be taken into account and the study must comprise a procedure enabling independent monitoring of the data.
- Monitoring the infants included in the trial is recommended to determine whether the biological markers return to the initial state or if the disease recurs or worsens following withdrawal of the infant formula containing probiotics or prebiotics.

iii. Doses and method of administration

- The safety and the nutritional, physiological and/or therapeutic effects of the infant formulas must be demonstrated with the infant formula in the form in which is to be marketed and under the recommended conditions for use.

- The active dose of probiotics or prebiotics added must be defined. It must be based on a dose-effect relationship indicating the minimum dose necessary to obtain an effect and the maximum dose producing a maximum effect with no side effects or negative effects. The minimum and maximum quantities of the finished infant formula to be consumed to obtain an effect with no side effects or negative effects must be known.
- The duration of use of the infant formula must also be defined based on the same principles.

iv. Selection of principal criteria and biomarkers

- A trial designed to demonstrate a functional and/or therapeutic effect must focus on principal criteria such as the capacity of the infant formula to modulate a biomarker or a series of biomarkers reflecting a physiological function or to prevent, treat or delay pathological episodes.
- The criteria studied must be relevant and appropriate to the population studied. For example, for infectious diarrhoea, the principal criterion in developing countries might be a reduction in cases of serious dehydration, while in other countries (in Europe in particular), it might be a reduction in the frequency and/or duration of diarrhoeic episodes.
- Similarly, the biomarkers measured must reflect the functioning of the target function for the target population, and their modulation must be associated with beneficial or harmful effects on health.

v. Number of independent studies

- It is desirable that at least two independent studies should corroborate the physiological and/or therapeutic effects of an infant formula.

vi. Research into action mechanisms

- Demonstration of the physiological and/or therapeutic effects of an infant formula containing probiotics or prebiotics must be accompanied by an attempt to explain the mechanisms involved.
- Experimental studies (*in vitro* and/or *in vivo*) must be carried out with the infant formulas or their supposed active ingredients to clarify the molecular mechanisms from which the observed beneficial effects originate.

vii. Presentation of results

- Whatever they are (positive, negative or neutral) the results of these studies must be presented either in the form of scientific articles in peer-reviewed journals or in the form of dossiers complying with the quality criteria of a publication of acknowledged scientific value.

f. Labelling

- The precise name of the probiotic or the micro-organisms used for fermentation (microbial species and strain, as defined in VII.a), or the active principle of the prebiotic ingredient or the other ingredients designed to modify the intestinal flora of babies and young children, must be stated on the packaging.
- The concentration of the probiotic, the symbiotic or the active principle of the prebiotic ingredient in the infant formula, up to the best before date, must be stated on the packaging.
- The dose and the minimum duration of use for the claimed effect must be stated on the packaging.
- Recommendations for storage and use of the preparation (cf. VII.d) must be stated on the packaging.

g. Advertising the products

Claims making a link between diet and health are regulated, firstly at Community level by general provisions on the presentation of foodstuffs and secondly at national level by the provisions in health and consumer legislation. A more specific regulatory framework, both European and French, is expected. Regarding the specific nature of paediatric products, the only prohibition in force relates to claims on infant formulas other than those laid down by the special provisions contained in the annexes to European directive 91/321/CE and the amended Order of 1 July 1976. It is for this reason Afssa conducted an in-depth review into the need for a specific approach to claims used for foods for paediatric use (Afssa Report, 2001). The proposals made as part of this review apply perfectly to the area covered by this report, namely the use in infant feeds of probiotics, prebiotics or other ingredients designed to modify the intestinal flora of infants.

h. Post-marketing monitoring

- Monitoring of infants being given or who have been given infant formulas containing probiotics, prebiotics or symbiotics would be useful in identifying any incidents, and also in assessing the benefits over a longer period than generally used in trials.
- The type of monitoring and the modalities for its implementation should be defined on the basis of discussions with experts, the public authorities and industry.

Annex - Letter sent by Afssa to food industry representatives

Dear Sir or Madam,

Thank you for agreeing to contribute to the review being conducted by the above-mentioned working group, for which the areas of interest suggested for study are:

- ✓ Microbiological aspects:
 - Clarification and definition of the concepts "colonisation, implantation, proliferation, survival" and "probiotics, prebiotics, lactic acid bacteria, lactic bacteria".
 - Characterisation (methodology) and characteristics (description) of flora in babies and children
 - Undesirable flora in babies and children
 - Identification of populations capable of using prebiotics
 - Fate of probiotics in the intestine of babies and children
 - Fate of probiotics, effects of prebiotics, during simultaneous administration of antibiotics
 - Role of probiotics in antibiotic resistance
- ✓ Clinical effects (preventive and therapeutic):
 - Effects on allergies
 - Effects on infectious diarrhoea
 - Effects on other types of infection (respiratory)
 - Risk of bacterial translocation
 - Effects on the risk of Helicobacter pylori
 - Effects on necrotising enterocolitis in pre-term babies
- ✓ Physiological functions:
 - Immunity
 - Function of the intestinal mucous barrier (mucin, permeability, trophicity)
 - Water and mineral balance
 - Bioavailability of nutrients (macro and micro)
 - Intestinal transit
 - Production and quality of stools
 - Digestibility of lactose
- ✓ Fermentation
 - Bacterial enzymes
 - pH
 - Fermentation metabolites (short chain fatty acids, lactic acid, other organic acids, ammonia, etc.)
 - Production of gas

The working group would like to have your opinion of this list and requests your participation in the analysis of these different subjects by any means you consider appropriate: sending summaries or unpublished reports of work, information on studies you are currently working on or which you are planning, information on any problems encountered, on unresolved issues, retrospective view of the long term effects of infant formulas which you market, etc.

A separate hearing for industry representatives is scheduled for 9 July 2002 at Afssa. You are cordially invited to this meeting for a scientific discussion on the aspects which you would like to cover and which are included in the subjects being studied by the working group.

Thank you in advance for your contribution,

Yours faithfully

Dr Christine CHERBUT
Chair of the working group

Bibliographie/ Bibliography

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) Lactobacillemia : 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.

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

Björksten 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, Schiffriin 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, LaScolea 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 pré-natale. *Arch Pediatr* 8 : 979-985.
- Durandy A, de Saint Basile G, Lisowska-Grosپierre 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. *rhamnosus* 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, Sondena K, Hoiby EA, Digranes 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, Mathoudakis 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, Cortésy-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 MIL, 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* bacteraemia 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, Mikolajczyk 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.

