UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

L'INTESTIN DU PREMATURE : MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL PAR UNE SUPPLEMENTATION ORALE EN PROBIOTIQUES, IMPACT DIGESTIF ET NUTRITIONNEL ET RECHERCHE DE MARQUEURS NON INVASIFS DE FONCTION INTESTINALE

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de Chimie-Biologie
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Nutrition et Métabolisme

Présentée et soutenue publiquement par

CAROLE ROUGÉ

Le 10 AVRIL 2008

Rapporteurs :	Pr. Anne COLLIGNON, Paris Pr. Christophe DUPONT, Paris
Examinateurs :	Pr. Marie-José BUTEL, Paris Dr. Florence ROCHAT, Vers-Chez-les-Blancs Pr. Luc CYNOBER, Paris Dr. Hugues PILOQUET, Nantes
Directeur de Thèse :	Pr. Dominique DARMAUN, Nantes
Codirecteur de Thèse :	Dr. Marie-France De La COCHETIERE, Nantes

Liste des publications et des principales communications

Publications originales

Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, Volteau C, De la Cochetière MF, Darmaun D. Manipulation of citrulline availability in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007, 293(5):G1061-7.

Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, De la Cochetière MF, Darmaun D. A robust and sensitive GC/MS assay for quantifying citrulline in human plasma, red blood cells and urine. *(Sous presse, J Chromatogr B.* 2008*)*.

Rougé C, Butel MJ, Ferraris L, Piloquet H, Legrand A, Vodovar M, Voyer M, De la Cochetière MF, Darmaun D, Rozé JC. Fecal calprotectin excretion in preterm infants during the neonatal period. *(Soumis à publication).*

Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Legrand A, Göbel U, Rozé JC, Darmaun D, Butel MJ, De la Cochetière MF. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for analysis microbiota colonization in preterm infants. *(Soumis à publication).*

Rougé C, Piloquet H, Butel MJ, Berger B, Rochat F, Ferraris L, Legrand A, De La Cochetière MF, Vodovar M, Voyer M, Darmaun D, Rozé JC. Digestive and nutritional effect of oral supplementation with *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* GG to very low birth weight preterm infants. *(En cours de rédaction)*.

Communications orales

Rougé C, Butel MJ, Ferraris L, Legrand A, Piloquet H, Vodovar M, Voyer M, Roze JC, Darmaun D, De la Cochetière MF. Effet de l'environnement sur la colonisation du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré. Forum des Doctorants, Nantes, France (Mai 2007). (Prix des 5 meilleures communications orales).

Rougé C, Butel MJ, Piloquet H, Ferraris L, Vodovar M, Voyer M, Legrand A, Darmaun D, Rozé JC. La calprotectine peut-elle être un marqueur de tolérance digestive chez le prématuré? 13èmes Journées Francophones de Recherche en Néonatologie (JFRN), Toulouse, France (Décembre 2007).

Rougé C, Piloquet H, Vodovar M, Voyer M, Legrand A, Des Robert C, Butel MJ, Seyrig F, Darmaun D, Rozé JC. Effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG chez le nouveau-né prématuré. 13èmes Journées Francophones de Recherche en Néonatologie (JFRN), Toulouse, France (Décembre 2007).

Communications affichées

Rougé C, Butel MJ, Ferraris L, Legrand A, Piloquet H, Vodovar M, Voyer M, Roze JC, Darmaun D, De la Cochetière MF. Effet de l'environnement sur la colonisation du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré. VIIème Congrès de la Société Francophone de Microbiologie (SFM), Nantes, France (Mai 2007).

Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, Volteau C, De la Cochetière MF, Darmaun D. Effect of citrulline availability on plasma and erythrocyte citrulline in healthy humans. 10th European Nutrition Conference (ENC), Paris, France (Juillet 2007).

Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, Volteau C, De la Cochetière MF, Darmaun D. Effect of citrulline availability on plasma and urinary citrulline in healthy humans. 29th European Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ESPEN), Prague, République tchèque (Septembre 2007).

Table des Matières

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES 1

LISTE DES ABREVIATIONS 3

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 6

I. Le nouveau-né prématuré 7
I. 1. Aspect clinique 7
I. 2. Besoins nutritionnels 8
I. 2. 1. Besoins énergétiques 8
I. 2. 2. Besoins en eau 9
I. 2. 3. Besoins en protéines 9
I. 2. 4. Besoins en lipides 10
I. 2. 5. Besoins en glucides 11
I. 2. 6. Besoins en calcium et phosphore 11
I. 2. 7. Besoins en électrolytes 12
I. 2. 8. Besoins en vitamines et en oligo-éléments 13
I. 3. Alimentation 13
I. 3. 1. Alimentation entérale 13
I. 3. 2. Nutrition parentérale 15

II. Le microbiote intestinal du nouveau-né prématuré 17
II. 1. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal 17
II. 1. 1. Culture 17
II. 1. 2. Modèles animaux 18
II. 1. 3. Méthodes moléculaires 19
II. 2. Mise en place du microbiote intestinal 22
II. 2. 1. Mise en place des bactéries intestinales aéro-anaérobies facultatives 23
II. 2 .2. Mise en place des bactéries intestinales anaérobies strictes 26
II. 2. 3. Autres genres bactériens aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts et levures 28
II. 3. Facteurs intervenant sur le développement du microbiote intestinal 29
II. 3. 1. Age gestationnel 29
II. 3. 2. Mode d'accouchement 30
II. 3. 3. Environnement et conditions d'hygiène 30
II. 3. 4. Antibiotiques 31
II. 3. 5. Alimentation 32
II. 4. Fonctions du microbiote intestinal 33
II. 4. 1. Métabolisme bactérien 33
II. 4. 2. Modifications des caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'intestin 35
II. 4. 3. Education et stimulation du système immunitaire intestinal 36
II. 4. 4. Effet de barrière 38

II. 5. Modulation du microbiote intestinal....39
II. 5. 1. Prébiotiques....39
II. 5. 2. Probiotiques....42

III. La citrulline....47
III. 1. Méthodes d'analyse de la citrulline....48
III. 1. 1. Aspect statique du métabolisme de la citrulline....48
III. 1. 2. Aspect cinétique du métabolisme de la citrulline....48
III. 2. Métabolisme de la citrulline....53
III. 2. 1. Voies de biosynthèse de la citrulline....53
III. 2. 2. Voies de dégradation de la citrulline....56
III. 2. 3. Le foie : Tissu producteur et utilisateur de citrulline....57
III. 2. 4. L'intestin : Tissu producteur de citrulline....58
III. 2. 5. Les reins : Tissus utilisateurs de citrulline....59
III. 2. 6. Les autres tissus utilisateurs de citrulline....59
III. 3. Variations des taux de citrulline plasmatique....60
III. 3. 1. En condition non pathologique....60
III. 3. 2. En condition pathologique....60
III. 4. Intérêt de la citrulline....61
III. 4. 1. Un index de fonctionnement rénal....61
III. 4. 2. Un index de masse et de fonctionnement intestinal....61
III. 4. 3. Un agent thérapeutique potentiel....64

IV. La calprotectine....66
IV. 1. Méthodes d'analyse de la calprotectine fécale....67
IV. 2. Variations de l'excrétion de la calprotectine fécale....68
IV. 2. 1. En condition non pathologique....68
IV. 2. 2. En condition pathologique....69
IV. 3. Intérêt de la calprotectine fécale....71
IV. 3. 1. Un index de l'inflammation intestinale....71
IV. 3. 2. Un index potentiel de l'ECUN....73
IV. 3. 3. Un index potentiel du rejet de greffe intestinale....74

INTRODUCTION....75

TRAVAUX PERSONNELS....79

ETUDE 1 : Effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG chez le nouveau-né prématuré.....80

ETUDE 2 : Excrétion de la calprotectine fécale chez le nouveau-né prématuré durant la période néonatale.....88

ETUDE 3 : La chromatographie liquide haute performance dénaturante pour l'analyse de la colonisation bactérienne intestinale chez le nouveau-né prématuré. 90

ETUDE 4 : Détermination chez l'homme de la citrulline plasmatique, globulaire et urinaire en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. 93

ETUDE 5 : Manipulation de la disponibilité de la citrulline chez l'homme. 95

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 97

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 109

ANNEXES 138

ANNEXE 1 : Fiche informative sur les souches *B. longum* BB536 et *L. rhamnosus* GG 139

ANNEXE 2 : Recueil des données relatif aux nouveau-nés prématurés inclus dans l'étude probiotiques (Cahier d'observations)..... 142

Liste des figures, tableaux et annexes

Liste des figures

Figure 1 : Structure secondaire et variabilité de la molécule d'ARNr 16S de *E. coli*.

Figure 2 : Stratégies d'écologie moléculaire basées sur l'analyse comparée d'ADNr 16S.

Figure 3 : Approche expérimentale de l'inventaire moléculaire.

Figure 4 : Approche expérimentale de la TTGE.

Figure 5 : Principaux produits de dégradation des glucides par le microbiote colique.

Figure 6 : Principaux produits de dégradation des protéines par le microbiote colique.

Figure 7 : Schéma du système immunitaire intestinal.

Figure 8 : Formule développée de la citrulline.

Figure 9 : Principe d'analyse de la leucine par GC-MS en ionisation d'impact électronique, sous forme de dérivé trifluoroacétyl-butyl-ester (TFAB-leucine).

Figure 10 : Principales voies de biosynthèse de la citrulline.

Figure 11 : Principales voies de dégradation de la citrulline.

Figure 12 : Le foie : Un tissu producteur et utilisateur de citrulline.

Figure 13 : L'intestin : Principal tissu producteur de citrulline.

Figure 14 : Les reins et cellules possédant la NOS : Tissus utilisateurs de citrulline.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Analyse du microbiote fécal du nouveau-né prématuré par des techniques classiques de culture.

Tableau 2 : Analyse du microbiote fécal du nouveau-né prématuré par des méthodes moléculaires.

Tableau 3 : Résultats de l'analyse du microbiote fécal de 16 nouveau-nés prématurés sains, par inventaire moléculaire.

Tableau 4 : Mise en place du MI aérobie anaérobie facultatif chez le nouveau-né prématuré sain à différents âges postnataux.

Tableau 5 : Mise en place du MI anaérobie strict chez le nouveau-né prématuré sain à différents âges postnataux.

Tableau 6 : Effets des prébiotiques observés chez le nouveau-né prématuré, à travers des études prospectives et randomisées.

Tableau 7 : Effets des probiotiques observés chez le nouveau-né prématuré, à travers des études prospectives et randomisées.

Tableau 8 : Concentrations de citrulline rapportées dans différents fluides et tissus biologiques chez l'homme sain.

Tableau 9 : Principales méthodes utilisées pour quantifier la citrulline chez l'homme.

Tableau 10 : Variations des concentrations de citrulline plasmatique chez l'homme, en condition pathologique.

Tableau 11 : La citrulline plasmatique : Un marqueur de masse et de fonctionnement intestinal chez l'homme.

Tableau 12 : Intérêt de la calprotectine fécale.

Tableau 13 : La Calprotectine fécale : Un marqueur de l'inflammation intestinale chez l'homme.

Tableau 14 : Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 observés chez l'homme.

Tableau 15 : Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Lactobacillus rhamnosus* GG observés chez l'homme.

Liste des annexes

Annexe 1 : Fiche informative sur les souches *B. longum* BB536 et *L. rhamnosus* GG.

Annexe 2 : Recueil des données relatif aux nouveau-nés prématurés inclus dans l'étude probiotiques (Cahier d'observations).

Liste des abréviations

A

Ac : Anticorps

Acétyl-CoA : Acétyl coenzyme A

AG : Arginase

AGCC : Acides gras à chaîne courte

AS : Argino succinate

ASL : Argino succinate lyase

ASS : Argino succinate synthase

C

CD : Maladie de Crohn

CP : Carbamyl phosphate

CPSI : Carbamyl phosphate synthase de type I

D

DHPLC : Chromatographie liquide haute performance dénaturante

DGGE : Electrophorèse dénaturante en gradient de gel

E

ECUN : Entérocolite ulcéro-nécrosante

EI : Impact électronique

F

FOS : Fructo-oligosaccharides

G

GA : Glutaminase

GC : Chromatographie gazeuse

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GOS : galacto-oligosaccharides

GS : Glutamate synthase

GSA : Glutamate semi-aldéhyde

H

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

I

IBS : Syndrome de l'intestin irritable

IEC : Chromatographie échangeuse d'ions

IgA, G : Immunoglobulines de type A et G.

L

LIE : Lymphocytes intra-épithéliaux

LGG : *Lactobacillus rhamnosus* GG

M

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MI : Microbiote intestinal

MC : Maladie coeliaque

N

NAG : N-acétyl glutamate

NAGs : N-acétyl glutamate synthase

NO : Monoxyde d'azote

NO_2 : Nitrates

NO_3 : Nitrites

NOS : Monoxyde d'azote synthase

eNOS : Monoxyde d'azote synthase forme endothéliale

iNOS : Monoxyde d'azote synthase forme inductible

nNOS : Monoxyde d'azote synthase forme neuronale

O

OAT : Ornithine amino transférase

OCT : Ornithine carbamyl transférase

OS : Oligosaccharides

P

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

P5C : Pyrroline-5-carboxylate

P5CS : Pyrroline-5-carboxylate synthase

P5CD : Pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase

PN : Poids de naissance

PO : Proline oxydase

R

RCEU : Retard de croissance extra-utérin

RCIU : Retard de croissance intra-utérin

RH : Rectocolite hémorragique

RPC : Chromatographie en phase reverse

S

SA : Semaine d'aménorrhée

SGC : Syndrome du grêle court

SII : Système immunitaire intestinal

T

TD : Tube digestif

TGI : Tractus gastro-intestinal

TTGE : Electrophorèse dénaturante en gradient de température

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le nouveau-né prématuré

En France, les nouveau-nés prématurés représentent environ 5% des 800 000 naissances annuelles, soit 40 000 enfants qui naissent prématurément chaque année, dont 9000 grands prématurés. Les raisons d'une naissance avant terme sont nombreuses et parfois multiples. Cependant, trois grands types de causes peuvent être évoqués : médicales, accidentelles et socio-économiques. Parmi les nouveau-nés prématurés, 1% pèsent moins de 1500 g. Ils constituent une population très hétérogène, du point de vue de l'âge gestationnel, du degré de maturation de leurs organes et de l'état nutritionnel. On distingue le très grand prématuré, enfant né avant 28 semaines d'aménorrhée (SA), le grand prématuré, enfant né entre 28 et 32 SA et le prématuré, enfant né entre 32 et 37 SA. Parmi ces derniers, certains sont dits eutrophes, enfants ayant un poids approprié pour leur terme et d'autres sont dits dysmatures ou hypotrophes, enfants ayant subi un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et ayant un poids inférieur au 10ème percentile pour le terme.

I. 1. Aspect clinique

Le prématuré est un bébé de petite taille, bien proportionné, au visage menu et gracieux, recouvert de vernix caseosa. Sa peau est fine, plus ou moins transparente, souvent érythrosique et parfois rouge vif. Elle est douce et de consistance gélatineuse. Le pannicule adipeux sous-cutané est peu important. Il existe parfois un œdème au niveau des extrémités. Le lanugo (i.e. duvet très fin), plus ou moins important recouvre tout le corps, à l'exception des paumes de mains et des plantes des pieds. Le prématuré a un tonus qui est fonction de son âge gestationnel, sachant que le prématuré de moins de 32 SA a des mouvements spontanés en salve.

La composition corporelle du prématuré est très loin de celle du nouveau-né à terme. En effet, le prématuré possède une masse grasse très faible, une masse cérébrale importante par rapport au poids et une masse protéique négligeable. Il est caractérisé par une absence de réserves énergétiques et de réserves en oligo-éléments et en vitamines. Le prématuré présente une immaturité biologique qui concerne un certain nombre de grandes fonctions biologiques et certaines voies métaboliques particulières. L'enfant prématuré est donc dans une situation

précaire et est exposé à de nombreuses complications liées pour l'essentiel à l'immaturité des grandes fonctions physiologiques.

I. 2. Besoins nutritionnels

La naissance prématurée met l'enfant en situation de carence potentielle pour un certain nombre de nutriments. Les prématurés constituent un groupe à risque de dénutrition. D'après les recommandations actuelles de divers comités scientifiques internationaux, la prise en charge nutritionnelle du prématuré a pour but de lui assurer une croissance qualitativement et quantitativement semblable à celle du fœtus *in utero* durant le troisième trimestre de gestation, avec un gain pondéral de 18 à 20 g/kg/j.

Mais en pratique, le recul des limites de viabilité et la prise en charge d'enfants particulièrement immatures présentant des pathologies sévères ne permet pas d'établir une alimentation satisfaisante couvrant les besoins recommandés pour prématurés. Il s'établit ainsi très souvent un déficit nutritionnel progressif conduisant inéluctablement à un retard de croissance extra-utérin (RCEU). L'amélioration de la survie et l'augmentation de l'incidence de RCEU des prématurés de très faible poids à la naissance remet en question l'évaluation des besoins nutritionnels des prématurés. L'objectif d'obtenir une croissance analogue à celle du fœtus *in utero* étant délaissé au profit d'une croissance légèrement supérieure permettant dès les premières semaines de vie de réduire le déficit nutritionnel et de favoriser dans la suite la croissance.

Le prématuré est vulnérable à toute carence comme à tout excès d'apport nutritionnel. Ainsi, l'estimation des besoins nutritionnels doit tenir compte de l'âge du prématuré, de son état clinique et d'une éventuelle pathologie associée à la prématurité.

I. 2. 1. Besoins énergétiques

Pour assurer un gain pondéral moyen de 18 à 20 g/kg/j, les apports énergétiques nécessaires sont estimés à 110-130 Kcal/kg/j [8, 247].

Cet apport énergétique semble adéquat pour assurer une vitesse de croissance satisfaisante si l'apport protéique est suffisant et si les pertes fécales d'énergie sont limitées par l'utilisation de nutriments bien absorbés. Des apports légèrement supérieurs sont nécessaires chez l'enfant présentant un retard de croissance.

I. 2. 2. Besoins en eau

Les apports hydriques doivent compenser les pertes extra-rénales et rénales et couvrir les besoins en eau pour la croissance. Les besoins en eau pour la croissance sont faibles, estimés entre 10 et 12 mL/kg/j. Les pertes d'eau dans les selles sont normalement faibles et varient entre 5 et 10 mL/kg/j. Les pertes insensibles, estimées entre 30 et 60 mL/kg/j après le $10^{ème}$ jour de vie, sont très variables ; elles dépendent de l'âge postnatal, de la température corporelle, de l'humidité relative et de la température ambiante. Ces pertes insensibles peuvent être considérablement augmentées lors de la photothérapie ou lorsque le prématuré est placé sur un incubateur ouvert [325]. Les pertes rénales dépendent de l'apport hydrique, de l'importance des pertes totales et sont modulées par la capacité rénale à concentrer ou à diluer les urines. Les besoins en eau du prématuré se situent entre 150 et 200 mL/kg/j. Lors de certaines situations pathologiques nécessitant une restriction hydrique (défaillance cardiaque, persistance du canal artériel), cet apport peut être diminué à 130 mL/kg/j ; une restriction plus sévère peut excéder les capacités de concentration rénale et la charge osmolaire de l'alimentation doit alors être estimée et adaptée [325].

I. 2. 3. Besoins en protéines

Un apport protéique de 3 à 3,5 g/kg/j permet une accrétion protéique similaire à celle du fœtus *in utero* au cours du troisième trimestre de gestation (en moyenne 2 g/kg/j) [204, 326]. Ce niveau d'apport protéique n'entraîne pas de surcharge métabolique de l'organisme, si cet organisme est dans un état d'anabolisme et s'il s'accompagne d'un apport énergétique suffisant (> 30 Kcal/g de protéine). Des apports plus élevés sont recommandés chez les prématurés de très petit poids de naissance (3,5-3,8 g/kg/j). Des apports supérieurs à 4 g/kg/j ne sont pas recommandés car ils peuvent entraîner des modifications de l'amino-acidémie, une augmentation de l'ammoniémie et un risque d'acidose. Le lait de femme relativement

pauvre en protéines (1 à 1,2 g/dL) doit être supplémenté en protéines (de l'ordre de 0,6 à 0,7 g/dL) afin de respecter un apport minimal, car il n'est pas possible d'augmenter les volumes de lait ingérés au-delà de 200 mL/kg/j. Une supplémentation énergétique assurant au lait de femme un contenu énergétique de 70 Kcal/kg/j est recommandée, permettant d'obtenir un rapport calorico-protéique satisfaisant. Le contenu protéique des laits spécialement adaptés aux prématurés est habituellement situé entre 1,8 et 2,6 g/dL, permettant un apport protéique satisfaisant lorsque la ration atteint 170 à 180 mL/kg/j.

I. 2. 4. Besoins en lipides

Les besoins en lipides du prématuré se situent entre 3 et 4 g/kg/j. Ils constituent la principale source d'énergie (les triglycérides représentent 50% du contenu énergétique du lait féminin). Les acides gras issus de leur hydrolyse sont soit oxydés, soit incorporés aux lipides de structure, soit mis en réserve dans le tissu adipeux, selon les besoins. Du fait d'un déficit en lipase pancréatique et en sels biliaires, les lipides sont mal absorbés chez le prématuré et ce, d'autant plus que l'enfant est prématuré. L'absorption des acides gras diminue avec la longueur de leur chaîne carbonée et pour une même longueur de chaîne, les acides gras insaturés sont mieux absorbés que leurs homologues saturés [138, 273]. Les graisses du lait de femme frais sont mieux absorbées (90%) que les graisses du lait de lactarium (la pasteurisation inactivant en partie la lipase du lait). Les laits spécialement adaptés pour les enfants prématurés contiennent pour la plupart des graisses végétales, riches en acides gras insaturés bien absorbés, des acides gras à chaîne intermédiaire (C12 : 0, C14 : 0) et une quantité variable de triglycérides à chaîne moyenne (C8 : 0, C10 : 0). L'absorption totale des graisses de ces laits spécialement adaptés est souvent supérieure à 90%. Les besoins en acides gras essentiels de l'enfant prématuré sont couverts par le lait féminin qui contient de l'acide linoléique, de l'acide alpha-linolénique et leurs dérivés poly-insaturés à très longue chaîne insuffisamment synthétisés chez l'enfant prématuré. Les laits spécialement adaptés sont supplémentés en acide linoléique, en acide alpha-linoléique, mais aussi en acides gras poly-insaturés à très longue chaîne.

I. 2. 5. Besoins en glucides

Les besoins en glucides du prématuré se situent entre 8 et 12 g/kg/j. Le lactose est le sucre dominant du lait féminin (en moyenne 6 à 7g/dL) et fournit environ 40% de l'énergie totale du lait [170]. On ne sait pas s'il existe des besoins spécifiques en glucides et plus particulièrement en lactose, en dehors des arguments théoriques [155]. On sait cependant, que la présence de lactose favorise l'absorption calcique [347] et que par ailleurs, elle contribue chez les enfants nourris au sein, à l'abaissement du pH du contenu distal de l'intestin. Chez le prématuré, l'apport en glucides doit tenir compte des capacités enzymatiques de digestion qui sont limitées dans les premières semaines de vie pour le lactose. Les polymères de glucose sont bien absorbés du fait de la maturation précoce de la gluco-amylase intestinale et ont l'avantage d'une charge osmotique moindre que le lactose ou le glucose ; ceci explique leur utilisation dans les laits adaptés pour prématurés. Compte-tenu du manque de données précises concernant les apports en glucides, ces derniers sont habituellement basés sur la teneur en lactose du lait féminin. Bien que le lactose représente 90% des glucides présents dans le lait humain, ce dernier contient aussi plusieurs centaines de variétés d'oligosides (fructo- et galacto-oligosaccharides), qui auraient un effet prébiotique, favorisant l'implantation d'un microbiote 'bénéfique'. Ces oligosides n'existent ni dans le lait de vache, ni dans les formules lactées pour prématurés.

I. 2. 6. Besoins en calcium et phosphore

Durant le dernier trimestre de la gestation, le fœtus accumule en moyenne 130 mg/kg/j de calcium et 75 mg/kg/j de phosphore. La teneur en minéraux du lait de femme (en moyenne 30 mg/dL de calcium et 15 mg/dL de phosphore) ne permet pas d'obtenir une rétention phospho-calcique comparable à celle du fœtus. Les enfants prématurés de petit poids de naissance alimentés au lait de femme ont une absorption calcique satisfaisante (50 à 80%), une rétention calcique faible (15 à 25 mg/kg/j) ; ils présentent une calciurie élevée du fait d'un déficit d'apport phosphoré qui se traduit également par une phosphorémie basse et une phosphaturie très faible voire nulle. Ceci réalise un véritable syndrome de carence en phosphate avec retentissement sur la minéralisation osseuse (ostéopénie du prématuré). Le phosphore du lait féminin bien absorbé (90% en moyenne) est utilisé préférentiellement pour la croissance cellulaire. Le lait féminin doit être supplémenté en phosphore (9 à 10 mg/dL) [59, 165, 272]

afin d'augmenter la rétention calcique et de normaliser la calciurie. Pour améliorer les bilans phospho-calciques, le lait féminin doit être enrichi en calcium et en phosphore. Une minéralisation osseuse satisfaisante est obtenue chez des prématurés alimentés au lait féminin lorsque les apports reçus en calcium et en phosphore sont respectivement supérieurs à 60 et 100 mg/kg/j.

I. 2. 7. Besoins en électrolytes

◈ *Besoins en sodium*

La perte de poids physiologique qui suit la naissance est due à une perte d'eau qui s'accompagne d'une perte de sodium, avec contraction du secteur extracellulaire. Pendant les premiers jours de vie, les besoins en sodium sont faibles. Ils augmentent ultérieurement du fait d'une certaine immaturité des mécanismes tubulaires de réabsorption et peuvent atteindre 2 à 5 mmol/kg/j (et parfois au-delà chez les plus immatures) à la fin de la première semaine de vie. Cependant, on peut considérer que pendant cette période transitionnelle des 15 premiers jours de vie les hypo ou hypernatrémies du prématuré sont aussi souvent la conséquence d'un déséquilibre hydrique que d'un apport inadéquat en sodium. Pour adapter les apports hydrosodés aux besoins de l'enfant, pendant cette période il est important de contrôler les modifications pondérales ainsi que les dosages sériques et urinaires. En période de croissance stable, les besoins sont habituellement situés entre 2 et 3 mmol/kg/j.

◈ *Besoins en potassium et en chlore*

Le prématuré maintient beaucoup plus facilement son homéostasie en potassium. Les besoins nécessaires pour la croissance sont faibles, de l'ordre de 0,6 à 1 mmol/kg/j. Les besoins en chlore pour la croissance du fœtus sont également faibles, situés entre 0,7 et 1 mmol/kg/j. Les carences en chlore sont donc rares et ont été essentiellement constatées chez des enfants recevant une alimentation contenant peu de chlore (taux < 3 mmol/L) [12]. Les besoins en chlore pendant la phase de croissance du prématuré sont estimés entre 2 et 3 mmol/kg/j.

I. 2. 8. Besoins en vitamines et en oligo-éléments

Parmi les quatorze oligo-éléments reconnus par l'OMS depuis 1973, il est possible d'établir des recommandations que pour neuf d'entre eux : le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, le manganèse, le chrome, le molybdène, l'iode et le fluor. L'apport journalier en vitamines et oligo-éléments tient compte du poids de l'enfant, des réserves de son organisme, de son statut nutritionnel, de son mode d'alimentation et également de sa situation digestive. Chez le prématuré, les apports en oligo-éléments recommandés en nutrition parentérale totale sont réduits par rapport à ceux recommandés en alimentation entérale, du fait d'une moins grande bio-disponibilité des oligo-éléments apportés par voie orale. Par ailleurs, chez le prématuré, les recommandations en oligo-éléments sont plus importantes que celles du nouveau-né à terme et du nourrisson, puisqu'il possède un stock très réduit en oligo-éléments et doit faire face à une croissance rapide. Les apports en vitamines recommandés par différents auteurs et comités de nutrition présentent quelques divergences. Néanmoins, chez le prématuré, les apports en vitamines A, E, C, D, B12 et folates sont très importants. Les apports en vitamines recommandés en alimentation entérale sont comparables à ceux recommandés en nutrition parentérale.

I. 3. Alimentation

Les besoins nutritionnels des enfants prématurés sont plus élevés que ceux des enfants nés à terme et plus difficiles à administrer en raison de l'immaturité des processus métaboliques et digestifs. Ainsi, l'alimentation du prématuré et *a fortiori* du grand prématuré est un défi pour le nutritionniste.

I. 3. 1. Alimentation entérale

Le lait maternel est l'aliment de choix pour les prématurés, comme pour les nouveau-nés à terme. En effet, le lait maternel est le mieux adapté aux capacités physiologiques et à la nutrition de l'enfant, tant sur le plan quantitatif que qualitatif. Outre ses valeurs nutritionnelles, il apporte des facteurs immunologiques (cellules immuno-compétentes,

immunoglobulines en particulier) et non nutritionnels spécifiques (facteurs de croissance, enzymes, nucléotides, acides nucléiques). Il favorise la relation mère-enfant, mais son utilisation peut être contre-indiquée en cas de pathologie de l'enfant (p. ex. galactosémie congénitale) ou de la mère (p. ex. contamination virale du lait). Par ailleurs, comme le lait maternel apporte des quantités insuffisantes de protéines et de phosphore (cf chapitre précédent), celui-ci devra être supplémenté. Une quantité insuffisante de lait maternel ou une composition inadaptée aux besoins du prématuré vont limiter l'utilisation de celui-ci et favoriser l'utilisation d'un lait adapté pour prématuré.

L'industrie propose des laits adaptés aux besoins des prématurés incluant des protéines modifiées à un taux élevé (2 à 2,2 g/100 mL), une composition mixte en glucides (70% lactose et 30% malto-dextrine) et une composition lipidique comportant des triglycérides à chaînes moyennes (30 à 35%) et des acides gras polyinsaturés. Ces préparations apportant 70 à 80 Kcal/100 mL ont montré leur efficacité en terme de croissance vis-à-vis d'une formule classique et sont utilisées jusqu'à ce que l'enfant atteigne un poids de 3,5 kg.

Chez les prématurés de plus de 32 semaines et de plus de 1500 g, l'alimentation orale ou entérale peut être débutée dans les heures suivant la naissance en l'absence de pathologie surajoutée à la prématurité. En revanche, chez les autres enfants prématurés, le repos digestif initial est préconisé en raison de l'immaturité des processus métaboliques et digestifs. Néanmoins, l'introduction précoce d'une alimentation minimale chez ces enfants, à raison de 1 à 2 mL/kg/heure de lait de femme préférentiellement ou d'une formule adaptée, est souhaitable. En effet, l'alimentation entérale précoce stimulerait la synthèse d'hormones digestives favorisant ainsi la maturation de la motricité digestive [31] et le développement normal d'un certain nombre de fonctions du tube digestif [305]. De plus, une alimentation entérale précoce même modérée *(minimal enteral nutrition)* permettrait d'atteindre plus rapidement une alimentation orale complète et réduirait la durée d'hospitalisation, sans toutefois augmenter la prévalence de l'entérocolite ulcéro-nécrosante chez le nouveau-né prématuré [153].

Du fait de l'immaturité de la fonction buccale et de la fonction de vidange gastrique, les prématurés sont alimentés par gavage, par l'intermédiaire d'une sonde oro-gastrique. Le volume de la ration des 24 premières heures d'alimentation entérale est déterminé en fonction

de l'âge gestationnel et du poids de naissance. Le volume est augmenté très progressivement jour après jour et atteint ensuite en moyenne 150 à 200 mL/kg/j.

Durant les premières semaines de vie, le prématuré va devoir doubler voire tripler son poids de naissance. Cependant, l'immaturité des processus métaboliques et digestifs empêche généralement de fournir la totalité des apports par voie digestive et impose une nutrition intraveineuse.

I. 3. 2. Nutrition parentérale

La nutrition parentérale consiste en l'administration d'une solution nutritive hypertonique couvrant l'ensemble des besoins nutritionnels du prématuré. Elle peut être faite par voie veineuse superficielle ou, le plus souvent, par voie veineuse centrale lorsque l'alimentation parentérale est prolongée et/ou que la concentration en glucose dépasse 12% et l'osmolarité du soluté nutritif dépasse 700 mOsm/L. L'alimentation mixte (entérale et parentérale) est nécessaire dans les premiers jours de vie du prématuré ayant à la naissance <32 semaines et/ou un poids de naissance (PN) <1800 g, du fait de l'immaturité digestive. La perfusion intraveineuse apporte la ration hydrique complémentaire et a pour but immédiat de prévenir l'hypoglycémie. Elle est maintenue jusqu'à ce que les apports entéraux soient suffisants. L'alimentation parentérale exclusive devient nécessaire chez les prématurés pathologiques dont l'état clinique contre-indique l'alimentation entérale et chez les prématurés ne tolérant pas l'alimentation entérale (vomissements, résidus gastriques importants ou distension abdominale).

Une solution de nutrition parentérale destinée aux prématurés doit comprendre un apport azoté sous forme d'acides aminés libres lévogyres-cristallins, mais également de l'énergie sous forme de glucose, des électrolytes, des minéraux, des vitamines et des oligo-éléments. Les proportions des différents nutriments doivent être adaptées aux besoins de l'enfant, suivant l'âge postnatal, le poids et les conditions cliniques.

Chez le prématuré, et particulièrement chez le prématuré de très faible poids de naissance, l'instauration d'une nutrition parentérale expose au risque de complications multiples d'ordre mécaniques ou techniques (obstruction, perforation, thrombose….), infectieux, métaboliques

(troubles du métabolisme sodique, phospho-calcique ou encore hyperglycémie) et nutritionnelles. En effet, les expériences chez l'animal ont par exemple démontré qu'une nutrition parentérale exclusive prolongée induisait une atrophie de la muqueuse intestinale associée à une réduction de l'activité des enzymes de la bordure en brosse [291]. Par ailleurs, la nutrition parentérale expose au risque de complications hépatiques (stéatose, cholestase) potentiellement irréversibles.

Compte-tenu de la gravité potentielle des complications induites par la nutrition parentérale, il est 'urgent' de sevrer les enfants prématurés d'une telle nutrition. Le recours à l'alimentation entérale permettrait de résoudre nombre de ces complications, mais son utilisation est limitée par l'immaturité du système digestif du prématuré.

Chez le nouveau-né prématuré, la fonction barrière de l'intestin est immature [259]. Plusieurs constituants de la fonction barrière ne sont pas complètement développés : la flore commensale est pauvre, l'épithélium intestinal est plus perméable que chez l'adulte et le système immunitaire est immature [215]. Une défaillance de la fonction barrière de l'intestin, due à son immaturité, est vraisemblablement impliquée dans la physiopathologie de l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) [121], pathologie du prématuré de survenue heureusement rare (5% des prématurés), mais grevée d'une forte mortalité et morbidité. Bien que la physiopathologie de l'ECUN soit complexe et mal comprise, impliquant des agents infectieux, l'hypoxie et le stress oxydant [225, 226], un démarrage trop rapide de la nutrition pourrait accroître le risque d'ECUN.

Pour nourrir le grand prématuré (PN<1000 g), le néonatologiste est donc confronté à un dilemme : faut-il favoriser au plus vite le sevrage de la nutrition parentérale, du fait des risques (notamment infectieux) de cette technique, ou augmenter aussi vite que possible l'alimentation entérale, malgré le risque d'ECUN lié à une progression trop rapide ?

Tableau 1. Analyse du microbiote fécal du nouveau-né prématuré par des techniques classiques de culture.

Références	**Pays**	**Effectifs**	**Age gestationnel** (semaines)	**Poids de naissance** (grammes)	**Méthodes**
Blakey 1982 [34]	Australie	28	30 (25-36)[a]	1125 (560-1500)	Selles ; 3 premières semaines de vie
Stark et Lee 1982 [289]	Australie	11	33[b] (30-35)	1920 (1440-2300)	Selles ; 4 premières semaines de vie
Rotimi 1985 [258]	Nigeria	23	29 (24-36)	1728 (750-2400)	Selles ; 6 premiers jours
Sakata 1985 [264]	Japon	7	29,5 (25,5-34,7)	1077 (810-1350)	Selles ; 7 premières semaines
Hall 1990 [122]	Angleterre	83	32 (25-33)	1140 (620-2510)	Selles ; J10 et J30
Gewolb 1999 [111]	Etats-Unis	29	26	782	Selles ; J10, J20 et J30
Hällström 2004 [123]	Finlande	99	28,9	1267,5	Selles ; 2 premières semaines
Butel 2007 [46]	France	52	33 (30-36)	1946 (990-2750)	Selles ; 18 premiers jours (J4-J34)

Légende : L'âge gestationnel et le poids de naissance sont exprimés comme moyenne et/ou [a]intervalle entre les valeurs minimales et maximales ou [b]médiane.

II. Le microbiote intestinal du nouveau-né prématuré

A l'interface entre le milieu extérieur et intérieur, le tube digestif (TD) est un long conduit musculo-membraneux de plusieurs mètres qui s'étend de l'orifice buccal à l'anus. Il comprend 7 segments qui sont dans le sens cranio-caudal : la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et l'anus. L'intestin grêle est lui-même subdivisé en duodénum, jéjunum et iléon ainsi que le côlon, qui comprend successivement les portions ascendante, transverse, descendante et sigmoïdienne. Le TD de l'homme héberge en permanence d'importantes populations microbiennes que l'on désigne sous le vocable récent de microbiote (précédemment appelé flore microbienne).

II. 1. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal

II. 1. 1. Culture

Le microbiote intestinal (MI) est un réservoir biologique difficile à explorer, du fait de problèmes évidents d'accessibilité et des contraintes éthiques liées aux études chez l'homme. Dès le début des années 80, grâce au développement de nouvelles conditions de culture, à la maîtrise de l'anaérobiose [107, 130] et au recueil d'échantillons de selles, le microbiote fécal, reflet indirect du microbiote intestinal a pu être décrit chez le nouveau-né prématuré **(Tableau 1)**. Différents auteurs ont ainsi isolé, inventorié et répertorié selon les règles de la taxonomie classique les espèces microbiennes du microbiote fécal cultivable [34, 111, 122, 258, 264, 289]. Les études basées sur la culture ont montré que le MI du nouveau-né prématuré présentait une diversité bactérienne réduite dont les principales espèces bactériennes isolées appartenaient aux genres *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Selon les études, la prévalence et le taux de colonisation par ces différents genres bactériens variaient [193, 324], probablement liés aux différentes conditions de culture et aux différentes caractéristiques des enfants (âge gestationnel, poids de naissance, alimentation, traitements…).

Malgré les nombreux milieux de culture disponibles, une large part des espèces microbiennes du microbiote fécal dominant de l'homme adulte échappe à la culture, induisant

une sous-estimation des populations bactériennes. Suivant les études, la fraction cultivable a pu être estimée entre 10 et 90% du microbiote total [174, 216, 292]. Ainsi, il se peut qu'une large part des espèces microbiennes du microbiote fécal du nouveau-né prématuré échappe également à la culture, expliquant la faible diversité bactérienne rapportée dans la littérature. Bien que la culture soit une méthode expérimentalement lourde et longue qui n'apporte qu'une information incomplète sur la composition et le fonctionnement réels du MI, elle demeure le standard incontournable pour l'identification et la description formelle de nouvelles espèces bactériennes.

II. 1. 2. Modèles animaux

En écologie microbienne, différents modèles animaux ont été développés pour étudier les relations qui existent entre un microbiote et l'hôte. Des animaux à flore contrôlée, maintenus dans des conditions stériles et isolés des autres animaux conventionnels constituent un modèle particulièrement intéressant pour étudier ces relations. On distingue les animaux axéniques dépourvus de germes, les animaux gnotoxéniques hébergeant une ou plusieurs espèces bactériennes identifiées, et les animaux hétéroxéniques porteurs d'un microbiote issu d'une autre espèce.

L'utilisation d'animaux axéniques inoculés avec un microbiote fécal humain permet d'étudier les relations hôte-bactéries dans des conditions environnementales très proches de celles retrouvées chez l'homme. Des auteurs comme Mallett *et al.* ont montré que les microbiotes fécaux humains conservaient leurs caractéristiques bactériologiques et enzymatiques lorsqu'ils étaient implantés chez des animaux axéniques [196].

Les animaux gnotoxéniques constituent un bon outil pour étudier l'influence du microbiote autochtone sur la mise en place de l'immunité, sur le métabolisme nutritionnel de l'hôte ou le rôle de barrière exercé par le microbiote à l'égard des bactéries exogènes [95]. Toutefois, l'utilisation d'animaux gnotoxéniques a ses limites. En effet, même si le microbiote associé est d'origine humaine, la physiologie intestinale présente des différences plus ou moins importantes avec celle de l'homme. Ces études menées sur ces animaux nécessitent des équipements particuliers et un personnel qualifié pour l'élevage des animaux.

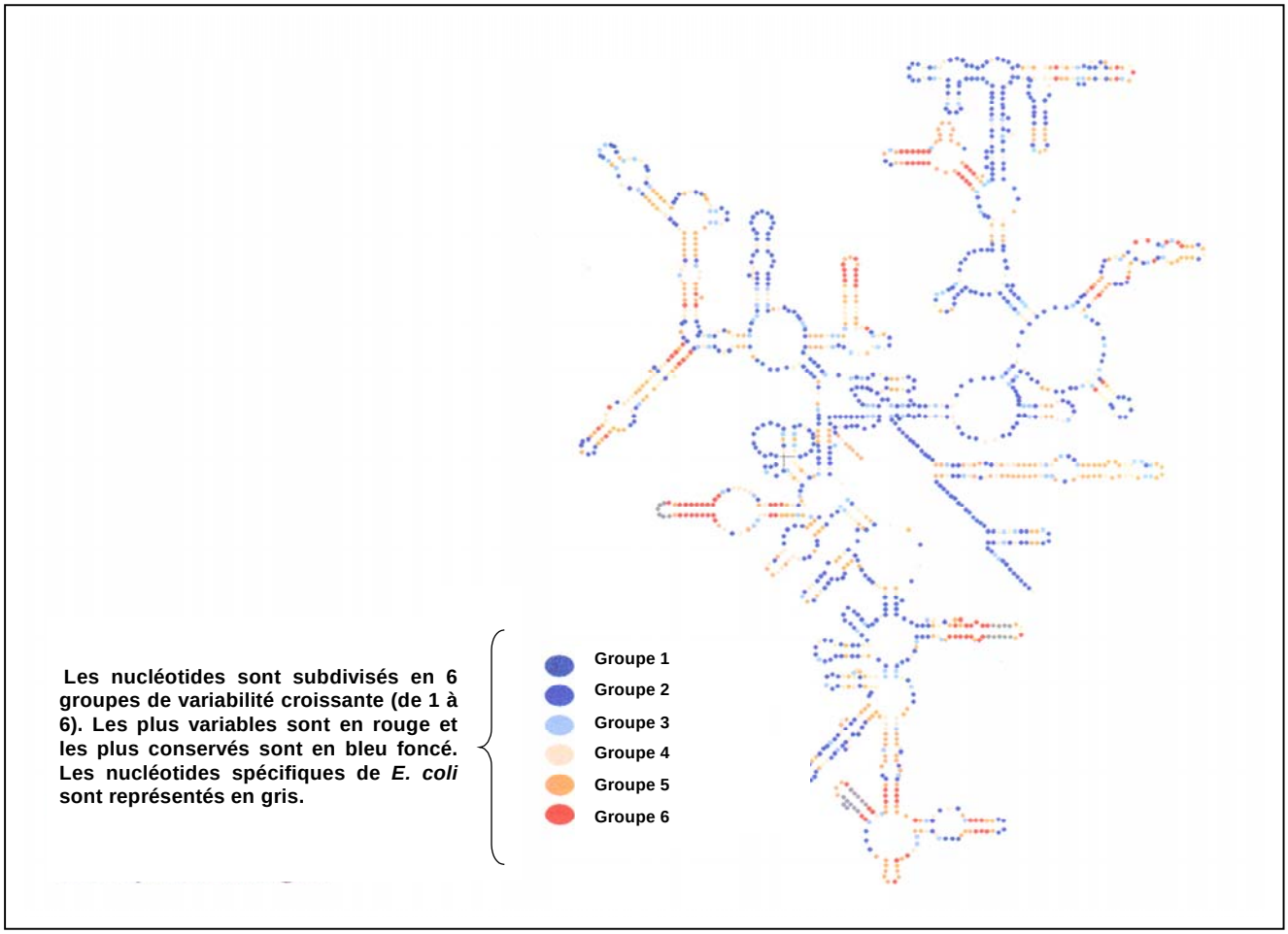

Figure 1. Structure secondaire et variabilité de la molécule d'ARNr 16S de *E. coli*.

II. 1. 3. Méthodes moléculaires

Les techniques impliquant la culture étant trop restrictives, des outils de biologie moléculaire ont été développés en écologie microbienne pour réévaluer la composition et la diversité du MI humain. Ces techniques moléculaires s'appuyant sur la comparaison de séquences d'ARN ribosomal 16 S (ARNr 16S) ont été introduites par Woese en 1969.

◈ *Choix de la cible moléculaire*

Afin de pouvoir identifier et classer phylogénétiquement les micro-organismes sur la base de leurs acides nucléiques, des molécules suffisamment informatives pour permettre des comparaisons statistiquement significatives sont requises. Les ARN ribosomaux possèdent des caractéristiques intrinsèques permettant de répondre à ces exigences. En effet, ce sont des molécules qui sont : 1) ancestrales, entièrement conservées dans leur structure globale, 2) ubiquitaires (présentes dans toutes les cellules vivantes) et naturellement amplifiées (10 000 à 100 000 copies/bactérie), 3) non sujettes à des transferts latéraux de matériel génétique entre micro-organismes contemporains, 4) formées d'une structure mosaïque, avec juxtaposition de régions très conservées et de régions variables, 5) pourvues d'un nombre de monomères suffisant permettant un traitement statistique des analyses de similarité. Les ARNr sont constitués de régions universellement conservées, spécifiques d'une lignée phylogénétique (règne, ordre, famille) et de régions variables, spécifiques d'un genre, d'une espèce, voire même d'une souche **(Figure 1)**. L'analyse comparative de ces différentes régions permet de différencier presque toutes les bactéries d'un écosystème bactérien. Le choix de l'ARNr 16S parmi les ARN ribosomaux résulte d'un compromis. En effet, la taille de la séquence d'ARNr 5S, constitué d'environ 120 nucléotides, permet une étude rapide mais trop peu informative. A l'inverse, l'ARNr 23S, composé d'environ 2500 nucléotides, offre davantage de renseignements mais sa taille élevée augmente la durée et le prix du séquençage. L'ARNr 16S, composé de 1500 nucléotides, est suffisamment informatif et facilement analysable.

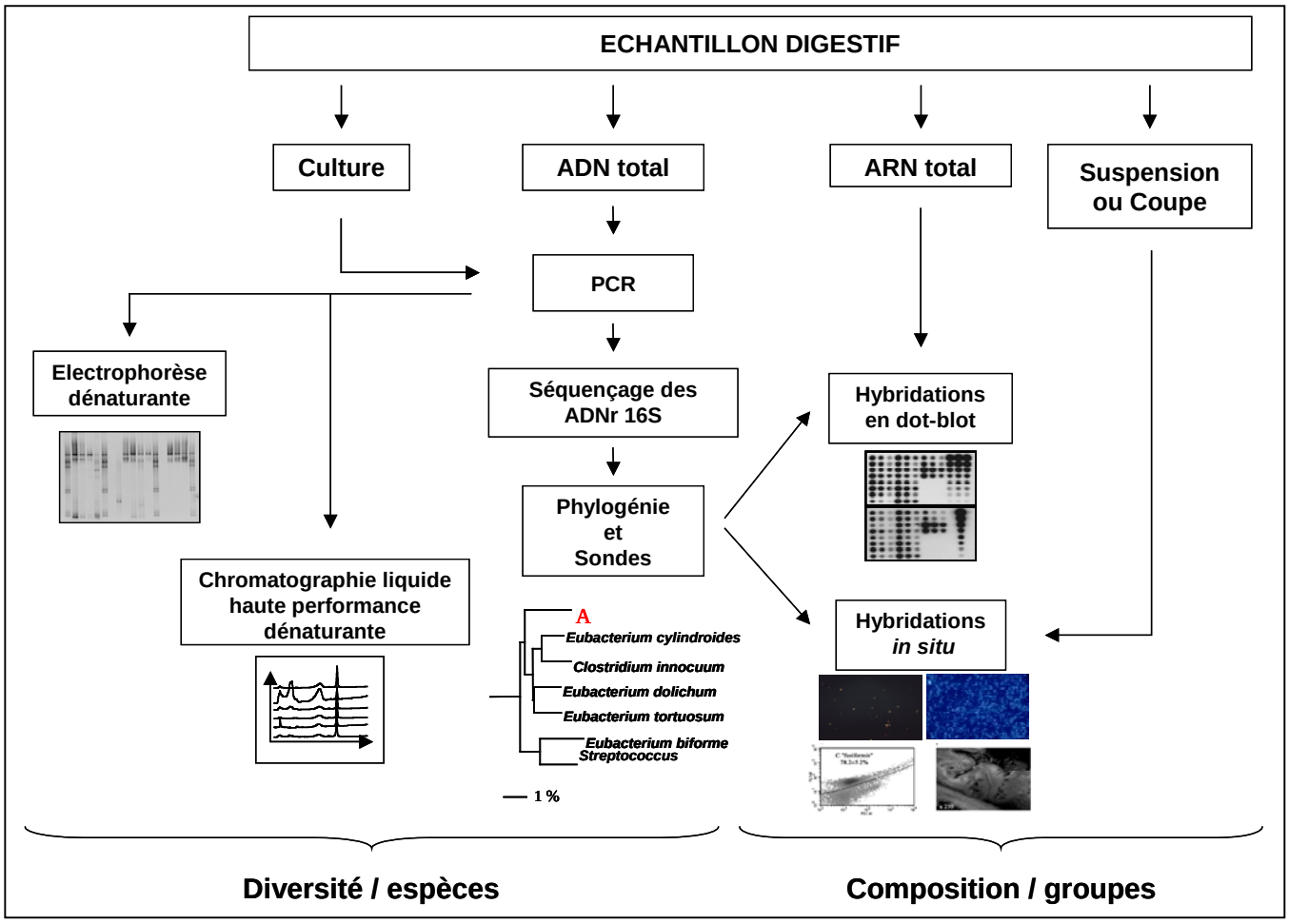

Figure 2. Stratégies d'écologie moléculaire basées sur l'analyse comparée d'ADNr 16S.

◈ *Caractérisation moléculaire du MI humain dominant*

De nombreuses méthodes indépendantes de la culture, basées sur l'ARNr 16S ou son gène codant (ADNr 16S) ont été développées en écologie microbienne [190]. On distingue parmi celles-ci , l'inventaire moléculaire [292, 330], les techniques d'empreinte génétique (électrophorèse dénaturante) [223, 349], la PCR en temps réel (PCR : polymerase chain reaction) [129, 200], l'hybridation *in situ* (FISH : fluorescence *in situ* hybridization) [106, 222, 254], l'hybridation en dot-blot [198, 274] ou la chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC : denaturing high performance liquid chromatography) [113]. L'application de ces méthodes ribosomales peut être divisée en deux grandes approches selon leur niveau de résolution : la première approche s'intéresse à la diversité d'espèces et la seconde, à la composition en grands groupes phylogénétiques du microbiote fécal humain **(Figure 2)**.

Bien que différentes méthodes indépendantes de la culture soient disponibles aujourd'hui, peu d'entre elles ont été appliquées à la caractérisation du MI du nouveau-né prématuré [46, 78, 192, 206, 270] **(Tableau 2)**.

- *Inventaire moléculaire des espèces du MI humain*

L'inventaire moléculaire consiste à réaliser une analyse comparée de séquences d'ADNr 16S directement clonés à partir d'ADN fécal **(Figure 3)**. L'ADN total est extrait de l'échantillon de selles et, par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), une amplification spécifique de l'ADNr 16S bactérien est réalisée. Les amplicons sont ensuite clonés dans un vecteur pour constituer une banque de clones d'ADNr 16S des bactéries présentes dans l'échantillon. Ces ADNr 16S sont séquencés puis analysés au moyen d'outils bio-informatiques. L'analyse comparée des séquences ribosomales permet de déterminer le degré de parenté existant entre les organismes contemporains et de représenter leurs relations évolutives sous forme graphique. La comparaison de ces séquences avec celles stockées dans les banques de données (RDP : Ribosomal Database Project, http//rdp.cme.msu.edu ; Genbanq, www.ncbi.nlm.nih.gov) permet de détecter les nouvelles espèces moléculaires. Dans la littérature, une espèce moléculaire ou OTU (Operational Taxonomic Unit) est définie comme un ensemble de clones et/ou souches bactériennes ayant une similarité de séquences

Tableau 2. Analyse du microbiote fécal du nouveau-né prématuré par des méthodes moléculaires.

Références	**Pays**	**Effectifs**	**Age gestationnel** (semaines)	**Poids de naissance** (grammes)	**Méthodes**
Millar 1996 [206]	Angleterre	32	(24-34)[a]	nd	Selles ; PCR-DGGE nd
Schwiertz 2003 [270]	Allemagne	29	(24-37)	(830-2635)	Selles ; PCR-DGGE 2 premières semaines + J17, J21, J24 et J28
De la Cochetière 2004 [78]	France	12	28[b] (24-29)	927 (540-1480)	Selles ; PCR-TTGE J7et J14
Magne 2006 [192]	France	16	28,5 (27-36)	1265 (640-2300)	Selles ; Inventaire moléculaire + PCR-TTGE (1 seul échantillon/enfant : J5 et J58)
Butel 2007 [46]	France	52	33,4 (30-36)	1946 (990-2750)	Selles ; PCR-TTGE 18 premiers jours (J4-J34)

Légende : L'âge gestationnel et le poids de naissance sont exprimés comme [a]intervalle entre les valeurs minimales et maximales et/ou [b]moyenne, nd=pas de donnée.

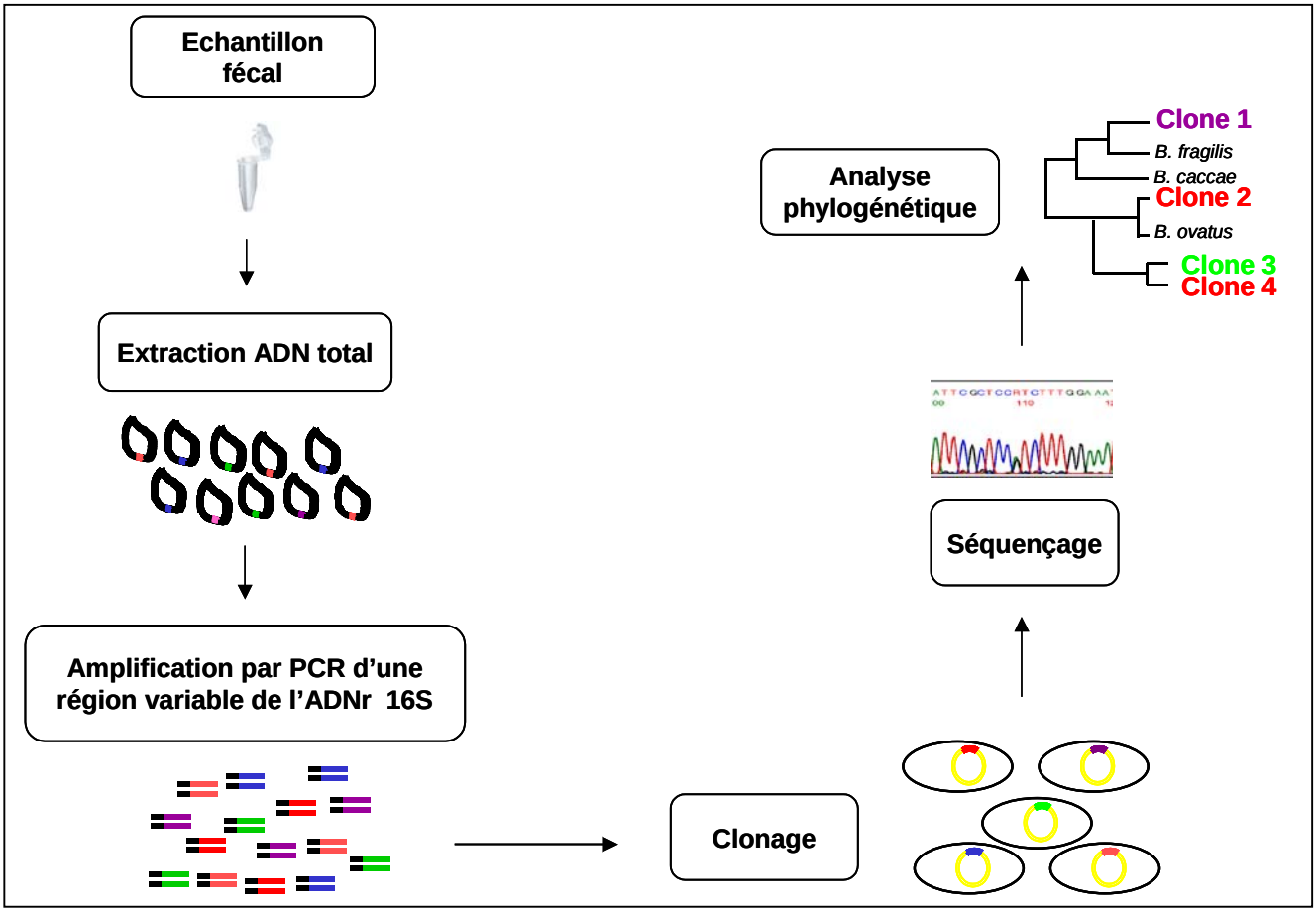

Figure 3. Approche expérimentale de l'inventaire moléculaire.

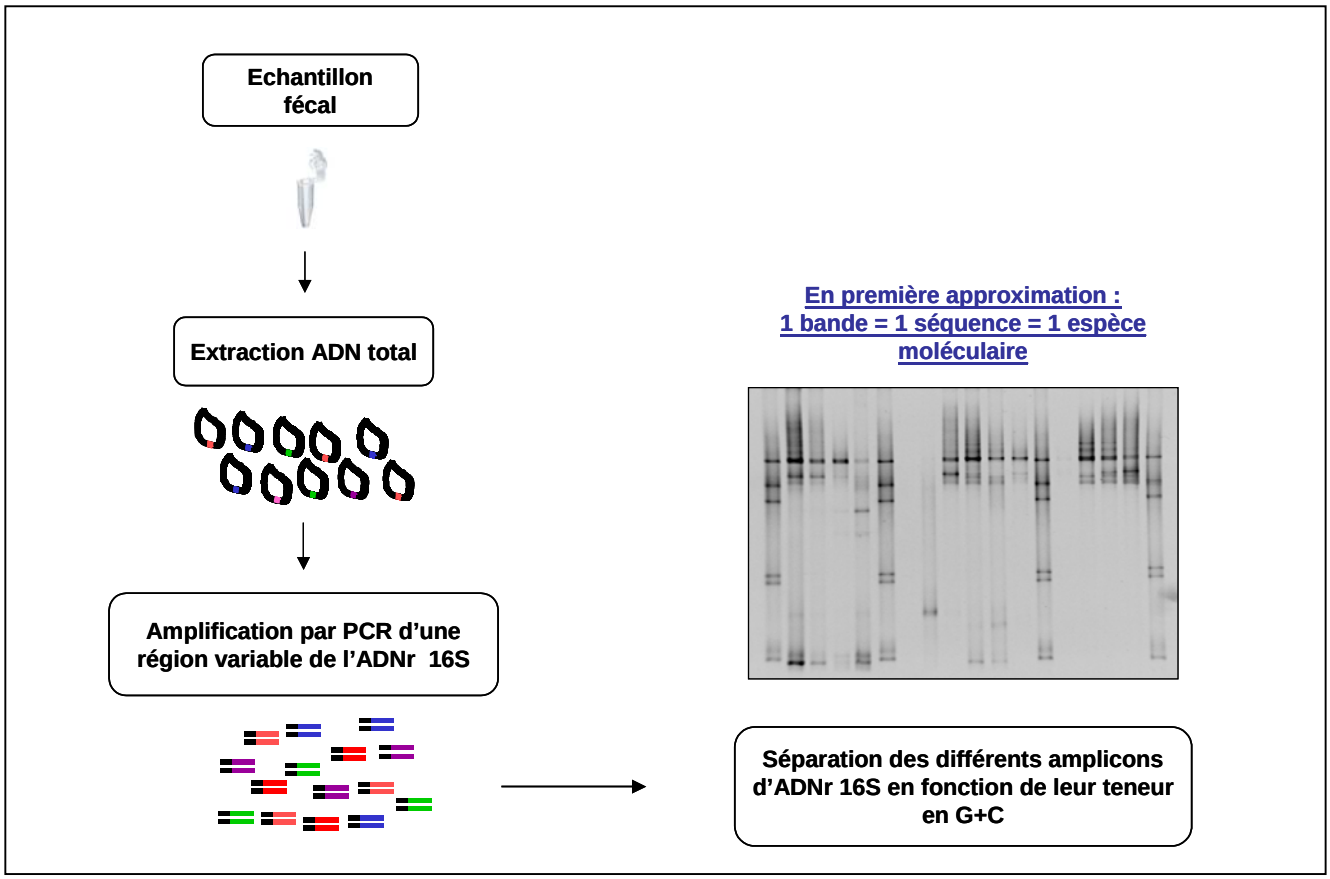

Figure 4. Approche expérimentale de la TTGE.

Tableau 3. Résultats de l'analyse du microbiote fécal de 16 nouveau-nés prématurés sains obtenus par inventaire moléculaire, d'après Magne *et al.* [192].

Groupes bactériens	**% d'enfants colonisés**	**% des clones identifiés**	**Espèces moléculaires (=OTUs) identifiées**
Famille des *Enterobacteriaceae*	62,5	35,8	*E. cloacae, E. coli, K. oxytoca, K. planticola, K. pneumoniae*
Genres Ec, Str et Sta :	87,5	45,1	
Genre *Enterococcus* (Ec)	81,2	29,9	*E. faecium, E. faecalis, E. gallinarum*
Genre *Streptococcus* (Str)	37,5	8,6	*S. parasanguinis, S. bovis*
Genre *Staphylococcus* (Sta)	12,5	6,6	*S. epidermidis*
Ordre des Clostridiales	31,2	10,4	*C. butyricum, C. difficile, C. neonatale, C. tertium, R. productus*
Ordre des Actinomycètes :	31,2	7,3	
Genre *Bifidobacterium*	25	6,9	*B. dentium, B. longum, B. bifidum, B. breve*
Genre *Atopobium*	6,2	0,4	*A. parvulum*
Genres *Veillonella* et *Megasphaera*	18,7	1,4	*V. atypica, V. parvula, Megasphaera sp*

d'ADNr 16S supérieure à 98%. Les séquences, une fois alignées, sont exploitées pour définir des sondes qui seront utilisées par des techniques d'hybridation.

A notre connaissance, une seule étude utilisant cette approche d'inventaire moléculaire a été utilisée pour caractériser le MI des nouveau-nés prématurés [192]. Selon cette approche, Magne *et al.* ont obtenu à partir d'échantillons fécaux de 16 nouveau-nés prématurés sains, 288 clones qu'ils ont classés en 25 espèces moléculaires **(Tableau 3)**. Toutes les espèces moléculaires détectées avaient un représentant dans les collections de souches actuelles et correspondaient à des micro-organismes cultivés [192]. Seule une espèce moléculaire n'a pas pu être clairement identifiée car sa séquence nucléotidique était trop courte. Le MI de ces enfants présentait une diversité moléculaire restreinte, avec en moyenne 3,25 espèces différentes (1-8 espèces moléculaires différentes/enfant). Les principaux groupes bactériens mis en évidence appartenaient à la famille des *Enterobacteriaceae* et aux genres *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*.

La stratégie d'inventaire moléculaire de la diversité d'espèces dominantes apporte une richesse d'information inégalée. Cependant, elle présente des limites méthodologiques liées essentiellement aux biais possibles d'extraction de l'ADN et d'amplification de l'ADNr 16S. Il est ainsi possible que des micro-organismes plus difficiles à lyser soient sous représentés dans les banques d'ADN ribomosique analysées. Par ailleurs, cette approche est peu sensible et seule la fraction dominante du microbiote digestif peut être caractérisée. Enfin, la réalisation d'un inventaire représente un investissement lourd et non applicable à un grand nombre d'échantillons dans un contexte dynamique ou comparatif [85].

- Analyse dynamique de la diversité d'espèces du MI humain : Electrophorèse dénaturante

L'électrophorèse en gradient dénaturant permet l'analyse dynamique dans l'espace et dans le temps du MI **(Figure 4)** [266]. Cette technique consiste, dans un premier temps à extraire l'ADN total des organismes présents dans l'échantillon à analyser. Dans une seconde étape, une région variable spécifique de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR. Les produits de PCR sont ensuite séparés par électrophorèse dénaturante selon leur % en guanosine et cytosine (GC). Le résultat obtenu est un profil électrophorétique sur lequel chaque bande

correspond à une espèce dominante de l'écosystème de départ. Cette technique, applicable à un grand nombre d'échantillons, offre un potentiel d'analyse comparative très attrayant [349].

Quelques études ont caractérisé le MI du nouveau-né prématuré en utilisant cette approche d'électrophorèse en gradient dénaturant [46, 78, 192, 206, 270]. Selon cette approche, différents auteurs [78, 192, 206, 270] ont rapporté que le MI du nouveau-né prématuré présentait une diversité moléculaire restreinte, avec moins d'une quinzaine d'espèces moléculaires. Ces données vont dans le même sens que celles obtenues chez des nouveau-nés prématurés par inventaire moléculaire [192] et par culture [34, 111, 122, 258, 264, 289]. Par ailleurs, toutes les espèces moléculaires identifiées dans le MI des nouveau-nés prématurés par PCR-DGGE avaient un représentant dans les collections de souches actuelles et correspondaient à des micro-organismes cultivés [206]. Selon cette approche d'électrophorèse en gradient dénaturant, les espèces bactériennes les plus fréquemment identifiées appartenaient à la famille des *Enterobacteriaceae*, aux genres *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.

Comme toute technique, la PCR-TTGE ou la PCR-DGGE présente des limites. Notamment les étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification de l'ADNr 16S [85] ainsi que l'hétérogénéité de l'ADNr 16S [102, 231, 265, 314] peuvent introduire des biais possibles dans les résultats. De plus, seuls les micro-organismes en dominance sont détectables par ces techniques. Zoetendal *et al.* ont estimé que l'électrophorèse dénaturante donnait un profil représentant 90 à 99% des bactéries totales d'un écosystème microbien [349]. Enfin, la caractérisation du MI basée sur une seule molécule, l'ADNr 16S, ne peut à elle seule donner une vision globale de ce MI.

II. 2. Mise en place du microbiote intestinal

Dans des conditions normales, le tractus gastro-intestinal (TGI) du nouveau-né est stérile *in utero*. Dans les heures suivant l'accouchement, le nouveau-né est exposé à des milliers de micro-organismes dont quelques espèces s'implanteront. Le TGI du nouveau-né est colonisé à la naissance par le microbiote fécal et vaginal de la mère ainsi que par les bactéries environnementales. Le processus de colonisation est rapide, puisque 48 heures après sa

naissance, le microbiote fécal de l'enfant contient déjà 10^8 ufc/g de selles [219]. Schématiquement, les bactéries qui s'implantent durant les premiers jours de vie sont aérobies-anaérobies facultatifs (staphylocoques, entérocoques et entérobactéries), puis avant la fin de la première semaine de vie, s'implantent des bactéries anaérobies strictes, appartenant aux genres *Bifidobacterium, Bacteroides et Clostridium* [47, 219].

Bien que l'implantation du MI ait été largement étudiée chez le nouveau-né à terme, peu d'études ont été réalisées chez le nouveau-né prématuré [193], population pourtant plus à risque quant aux infections entre autres d'origine gastro-intestinale.

A notre connaissance, une seule étude a décrit chez le nouveau-né prématuré sain, le développement du MI dans les différentes parties du TGI [34]. Les travaux de Blakey *et al.* ont rapporté que le microbiote fécal des nouveau-nés prématurés s'établissait plus rapidement que le microbiote de la gorge et de celui de l'estomac, puisqu' au 4ème jour de vie, 70% des prélèvements fécaux étaient colonisés *versus* 13% des prélèvements au niveau de la gorge et 40% des aspirats gastriques [34]. Ces mêmes auteurs ont montré chez ces enfants que les différents segments du TGI (gorge, estomac et intestin) hébergeaient des populations microbiennes différentes, suggérant que chez le nouveau-né prématuré, différents habitats bactériens (i.e. des espaces anatomiquement définis et occupés par un ou plusieurs groupes d'organismes microbiens) semblaient se succéder de la bouche à l'anus.

II. 2. 1. Mise en place des bactéries intestinales aéro-anaérobies facultatives **(Tableau 4)**

◈ *Entérobactéries*

Dès les premiers jours de vie, les entérobactéries apparaissent dans les selles des nouveau-nés prématurés à des taux élevés [34, 258, 264]. Dans l'étude de Blakey *et al.* contrairement à *Enterobacter spp, E. coli* et *Klebsiella spp* étaient à partir du 4ème jour de vie les espèces les plus fréquemment isolées dans le MI des nouveau-nés prématurés [34]. Dans l'étude de Sakata *et al.* dès le premier jour de vie, les entérobactéries étaient prédominantes dans le MI des nouveau-nés prématurés à un taux de 10^9 ufc/g de selles et restaient prédominantes jusqu'au 20ème jour de vie [264]. Les travaux de Hall *et al.* menés chez des

Tableau 4. Mise en place du MI aérobie anaérobie facultatif chez le nouveau-né prématuré sain à différents âges postnataux (Adapté d'après Westerbeek *et al.* [324]).

Réferences	Entérobactéries				Entérocoques				Staphylocoques				Lactobacilles			
	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem
Blakey 1982 [34] [Australie]	13	44	46	60	7	8	25	20	≥17	≥20	≥18	≥35	7	8	14	25
Stark 1982 [289] [Australie]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rotimi 1984 [258] [Nigeria]	78	100	-	-	≥57	≥91	-	-	≥48	≥77	-	-	13	14	-	-
Sakata 1985 [264] [Japon]	100	100	100	100	100	100	100	100	43	71	86	100	0	0	14	80
Hall 1990 [122] [Angleterre]	-	-	62	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	19
Gewolb 1999 [111] [Etats-Unis]	-	-	14	43	-	-	≥28	≥57	-	-	≥59	≥57	-	-	4	4

Légende : Les données sont exprimées en % d'enfants prématurés ayant des cultures positives.

nouveau-nés prématurés ont rapporté que les coliformes étaient présents à des taux élevés atteignant chez 62% des enfants un taux de 10^8 ufc/g de selles au 10ème jour de vie et, chez 95% des enfants un taux de 10^9 ufc/g de selles au 30ème jour de vie [122]. Par ailleurs, les travaux de Gewolb *et al.* ont rapporté que *K. pneumoniae* était prédominant dans le MI du nouveau-né prématuré au 10ème jour de vie [111]. Dans cette étude, le nombre d'enfants colonisés par *E. cloacae* et *E. coli* augmentait significativement au cours du suivi (<15% des enfants colonisés à J10 *versus* 40% à J30) et au 30ème jour de vie, ces espèces bactériennes étaient prédominantes dans le MI du prématuré [111].

Par les méthodes indépendantes de la culture, les entérobactéries étaient les principales bactéries identifiées durant la 1ère semaine de vie [78, 192, 206, 270] et les principales espèces trouvées étaient *E. cloacae, E. coli, K. oxytoca, K. pneumoniae* et *K. planticola*.

.

◈ *Entérocoques*

Les entérocoques apparaissent également rapidement dans le MI des nouveau-nés prématurés [34, 258, 264]. Dès le premier jour de vie, Sakata *et al.* ont rapporté que les entérocoques étaient prédominants à un taux de 10^9 ufc/g de selles, similaire au taux d'entérobactéries rapporté par ces mêmes auteurs, et restaient prédominants jusqu'au 20ème jour de vie [264]. Bien que Blakey *et al.* aient rapporté une colonisation précoce par les entérocoques, le nombre d'enfants colonisés par ce genre bactérien était beaucoup plus faible durant les premières semaines de vie, comparé aux études de Sakata *et al.* et de Rotimi *et al.* [34, 258, 264]. Dans l'étude de Gewolb *et al.* le nombre d'enfants colonisés par *E. faecalis* augmentait au cours du suivi (29% des enfants colonisés à J10 *versus* 57% à J30), toutefois cette augmentation n'était pas significative statistiquement. Au 30ème jour de vie, cette espèce était prédominante [111].

De même, lors de la caractérisation du MI du prématuré par des méthodes indépendantes de la culture, les entérocoques ont été fréquemment identifiés dans les selles de ces enfants durant les premières semaines de vie [192, 270]. Les espèces les plus souvent trouvées correspondaient à *E. faecium, E. faecalis* et *E. gallinarum*.

◈ *Staphylocoques*

Les staphylocoques apparaissent dès les premiers jours de vie dans le MI des nouveau-nés prématurés [111, 258, 264]. Les espèces les plus fréquemment retrouvées étaient *S. epidermidis* [34, 78, 111, 192, 258], *S. aureus* [34, 78, 258] et *S. haemolyticus* [111, 206]. Dans l'étude de Sakata *et al.* les staphylocoques ont été isolés immédiatement après la naissance dans le MI des prématurés à des taux élevés (10^7 ufc/g de selles) et diminuaient graduellement jusqu'à la septième semaine de vie ($<10^6$ ufc/g de selles) [264]. Avant les quatre premiers jours de vie, Blakey *et al.* ont montré que 17% des nouveau-nés prématurés hébergeaient comme staphylocoques l'espèce *S. epidermidis* [34]. *S. aureus* était isolé après le 4ème jour de vie et le nombre de nouveau-nés prématurés hébergeant cette espèce augmentait au cours du suivi et devenait après le 20ème jour de vie supérieur au nombre de nouveau-nés hébergeant *S. epidermidis* (35% d'enfants colonisés à *S. aureus versus* 15% d'enfants colonisés à *S. epidermidis*) [34]. Par ailleurs, Gewolb *et al.* ont rapporté que *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* étaient prédominants dans le MI des nouveau-nés prématurés au 10ème jour de vie et restaient prédominants au 30ème jour de vie [111].

◈ *Lactobacilles*

Les lactobacilles ont été rarement isolés dans le MI des nouveau-nés prématurés, que ce soit par des techniques dépendantes ou non de la culture [34, 111, 122, 206, 258, 264]. Dans l'étude de Blakey *et al.* 7% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par des lactobacilles avant les 4 premiers jours de vie et 25% après le 20ème jour de vie [34]. Par ailleurs, dans l'étude de Sakata *et al.* seulement 1% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par des lactobacilles au 11ème jour de vie à un taux 10^6 ufc/g de selles *versus* 80% des nouveau-nés prématurés après le 20ème jour de vie à un taux de 10^7 ufc/g de selles [264]. Dans l'étude de Gewolb *et al.* un seul nouveau-né prématuré nourri avec un lait maternel était colonisé par des lactobacilles au 10ème et 30ème jour de vie [111]. De même, dans l'étude de Millar *et al.* un seul enfant a été colonisé par des lactobacilles durant la première semaine de vie [206]. En revanche dans l'étude de Hall *et al.* 14% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par des lactobacilles au 10ème jour de vie à un taux de 10^8 ufc/g de selles *versus* 19% au 30ème jour de vie à un taux de 10^7 ufc/g de selles [122].

Tableau 5. Mise en place du MI anaérobie strict chez le nouveau-né prématuré sain à différents âges postnataux (Adapté d'après Westerbeek *et al.* [324]).

Réferences	Clostridies				*Bacteroides*				Bifidobactéries			
	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem	< 2 j	1 sem	2 sem	> 3 sem
Blakey 1982 [34] [Australie]	≥10	≥20	≥18	≥35	57	44	79	35	-	-	-	-
Stark 1982 [289] [Australie]	20	56	-	25	40	64	-	38	0	55	-	63
Rotimi 1984 [258] [Nigeria]	≥44	≥50	-	-	≥17	≥78	-	-	86	96	-	-
Sakata 1985 [264] [Japon]	0	0	29	57	14	14	29	43	0	43	100	100
Hall 1990 [122] [Angleterre]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	11
Gewolb 1999 [111] [Etats-Unis]	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-	4	4

Légende : Les données sont exprimées en % d'enfants prématurés ayant des cultures positives.

II. 2 .2. Mise en place des bactéries intestinales anaérobies strictes **(Tableau 5)**

◈ *Clostridies*

Les clostridies ont été diversement isolés dans le MI des nouveau-nés prématurés [34, 264]. Dans l'étude de Blakey *et al.* les clostridies étaient rarement isolés durant les 16 premiers jours de vie, puis le nombre de nouveau-nés prématurés colonisés par clostridies augmentait [34]. Avant le 4ème jour de vie, 10% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par *C. butyricum* et 7% par *C. perfringens,* et après le 20ème jour de vie, 30% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par *C. butyricum*, 35% par *C. perfringens* et 25% par *C. difficile*. Dans l'étude de Sakata *et al.* les clostridies étaient plus rarement détectés avec 14% d'enfants colonisés à partir du 11ème jour de vie atteignant un taux de 10^6 ufc/g de selles, mais à la 7ème semaine de vie 80% d'entre eux étaient colonisés à un taux de 10^8 ufc/g de selles [264]. En revanche, dans l'étude de Stark *et al.* les clostridies étaient retrouvés en prédominance dans le MI chez la moitié des nouveau-nés prématurés durant la 1ère semaine de vie [289]. Par ailleurs, Rotimi *et al.* ont rapporté des taux élevés de clostridies qui augmentaient chez les prématurés durant les 6 premiers jours de vie [258].

Par des méthodes indépendantes de la culture, le genre *Clostridium* a été plus rarement identifié : si 30% des enfants étaient colonisés par des clostridies dans l'étude de Magne *et al.* [192], seulement 25% l'étaient dans l'étude de De la Cochetière *et al.* [78] et 16% dans l'étude de Millar *et al.* [206]. Les principales espèces bactériennes identifiées ont été *C. butyricum, C. difficile, C. neonatale, C. tertium, R. productus* (i.e. *C. coccoides*) et *C. perfringens.*

◈ *Bacteroides*

Deux études ont rapporté que durant la 1ère semaine de vie, le TGI des nouveau-nés prématurés était rapidement colonisé par *Bacteroides. spp* [34, 289]. Dans l'étude de Blakey *et al.* 57% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par *Bacteroides,* mais le nombre de prématurés colonisés déclinait ensuite après le 12ème jour de vie [34]. De même, dans l'étude de Stark *et al. Bacteroides* a été fréquemment isolé chez les nouveau-nés prématurés (64%)

durant la 1ère semaine de vie. En revanche, les travaux de Rotimi *et al.* et de Sakata *et al.* ont rapporté que l'émergence de *Bacteroides* était retardée chez le nouveau-né prématuré [258, 264]. Dans l'étude de Sakata *et al.* seulement 14% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés durant la 1ère semaine de vie à un taux de 10^{10} ufc/g de selles *versus* 60% des nouveau-nés prématurés colonisés à un taux de 10^{7} ufc/g de selles à la 7ème semaine de vie [264]. Dans l'étude de Gewolb *et al.* seulement 10% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par *Bacteroides* au 20ème et 30ème jour de vie. Les principales espèces de *Bacteroides* isolées ont été *B. vulgatus*, *B. thetaiomicron*, *B. ovatus* et *B. distasonis* [264].

Aucune étude basée sur des méthodes indépendantes de la culture n'a identifié la présence de *Bacteroides* dans les selles du nouveau-né prématuré durant les premières semaines de vie [78, 192, 206, 270].

◈ *Bifidobactéries*

Les bifidobactéries ont été rarement isolés immédiatement après la naissance [111, 122, 264, 289]. Durant la 1ère semaine de vie, Stark *et al.* ont rapporté que la moitié des nouveau-nés prématurés était colonisée par *Bifidobacterium* à des taux faibles [289] alors que Rotimi *et al.* ont montré que *Bifidobacterium* apparaissait très tôt après la naissance chez le nouveau-né prématuré avec 86% colonisés durant les 2 premiers jours de vie [258]. Dans l'étude de Sakata *et al.* les bifidobactéries étaient détectés chez la moitié des prématurés au 8ème jour de vie à un taux faible atteignant 10^{5} ufc/g de selles, puis étaient retrouvés chez tous les enfants au 14ème jour de vie à un taux de 10^{8} ufc/g de selles et devenaient prédominants chez tous les enfants à partir du 21ème de vie à un taux de 10^{10} ufc/g de selles [264]. Ces derniers auteurs ont suggéré que le retard d'implantation des bifidobactéries chez les prématurés pouvait être relié à la faible consommation de lait maternel. Dans l'étude de Hall *et al.* seulement 7% des nouveau-nés prématurés étaient colonisés par *Bifidobacterium* au 10ème jour de vie à un taux de 10^{9} ufc/g de selles *versus* 11% au 30ème jour de vie à un taux de 10^{9} ufc/g de selles [122]. Dans des études plus récentes, les bifidobactéries étaient rarement identifiés durant le premier mois de vie des nouveau-nés prématurés [46, 111].

Les études basées sur des méthodes indépendantes de la culture ont confirmé le retard d'implantation des bifidobactéries dans le TGI du nouveau-né prématuré [46, 78, 192, 206, 270]. Dans l'étude de Butel *et al.* 34% des nouveau-nés prématurés ont été colonisés par des bifidobactéries à un âge moyen de 11 ± 6 jours de vie [46], 25% des enfants dans l'étude de Magne *et al.* [192], 3% dans l'étude de Millar *et al.* [206] et aucun enfant dans l'étude de Schwiertz *et al.* [270] et de De la Cochetière *et al.* [78]. Les principales espèces de bifidobactéries étaient *B. longum, B. bifidum, B. breve* et *B. dentium*.

II. 2. 3. Autres genres bactériens aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies stricts et levures

D'autres micro-organismes ont été occasionnellement isolés à partir du MI du nouveau-né prématuré, incluant par exemple *Pseudomonas spp* [34, 111, 264] tel que *P. aeruginosa* [111], *Enterobacter spp* [34, 111] tels que *E. cloacae* et *E. aerogenes* [111], *Veillonella spp* [Sakata 1985, 111, 192, 264, 289], *Proteus spp* [34], *Serratia spp* [111], *Propionobacterium spp* [111], *Corynebacterium spp* [111], *Hafnia spp* [206], *E. americana* [206], *Eubacterium spp* [206], *Streptococcus spp* [192, 206] tels que *S. parasanguinis* [192], *S. bovis* [192] et *S. salivarius* [206]. Par ailleurs, des levures on été également retrouvées [111, 264].

En conclusion, peu d'études récentes ont décrit l'implantation du MI chez le nouveau-né prématuré. Ces études ont rapporté que le TGI de ces enfants était colonisé rapidement par *Staphylococcus*, puis par *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* et *Clostridium*, et plus tardivement par *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Ces données suggèrent que le TGI du prématuré se colonise à la naissance principalement avec les bactéries environnementales et dans une moindre mesure, avec le microbiote fécal et vaginal de la mère. Comparé au nouveau-né à terme, l'implantation du MI chez le nouveau-né prématuré est anormale. Les conséquences cliniques de l'implantation d'un tel MI chez le prématuré sont actuellement mal connues ; les fonctions physiologiques du MI incluant l'effet barrière et la stimulation adéquate du système immunitaire intestinal pourraient être altérées. L'altération de l'effet de barrière responsable de la résistance à la colonisation par des bactéries à potentialité pathogène et/ou multirésistantes aux antibiotiques pourrait être responsable de pathologies à point de départ digestif comme l'ECUN [47] où la colonisation bactérienne est un des éléments de la physiopathologie [162], ou favoriser l'implantation de

micro-organismes à potentialité pathogène à haut niveau et augmenter ainsi le risque de translocations bactériennes à point de départ digestif [72].

II. 3. Facteurs intervenant sur le développement du microbiote intestinal

De nombreux éléments peuvent influencer l'établissement du MI, parmi lesquels l'âge gestationnel de naissance, le mode d'accouchement, l'environnement, le régime alimentaire ainsi que l'antibiothérapie administrée à la mère en *per partum* et/ou à l'enfant après la naissance.

II. 3. 1. Age gestationnel

Quelques rares études ont comparé le MI du nouveau-né prématuré et du nouveau-né à terme, confirmant que le MI du nouveau-né prématuré s'implantait tardivement et était caractérisé par une diversité bactérienne restreinte [122, 264, 270, 289].

L'influence de l'âge gestationnel du prématuré sur l'implantation du MI n'a été que très rarement étudiée. Dans l'étude de Gewolb *et al.* l'âge gestationnel n'était pas corrélé avec le nombre d'espèces bactériennes fécaux au $10^{ème}$ et $30^{ème}$ jour de vie [111]. Cependant, il se peut que l'effet âge gestationnel n'ait pas été mis en évidence dans cette étude car l'âge gestationnel des prématurés variait trop peu (24-29 SA). Dans une étude plus récente réalisée sur des enfants d'âge gestationnel variant entre 30 et 36 SA, Butel *et al.* ont rapporté que l'âge gestationnel des enfants avait une influence significative sur la colonisation intestinale par *Bifidobacterium* [46]. Ces auteurs ont défini deux seuils d'implantation des bifidobactéries : un premier seuil défini par un âge gestationnel de naissance de 32,9 SA et un deuxième seuil défini par un âge gestationnel corrigé de 34 SA, suggérant qu'un certain degré de maturation digestive serait nécessaire pour l'implantation de ce genre bactérien.

II. 3. 2. Mode d'accouchement

L'implantation du MI chez le nouveau-né à terme né par césarienne est différente de celle observée chez l'enfant né par voie basse. Les premières bactéries rencontrées par les enfants nés par césarienne appartiennent principalement aux bactéries de l'environnement. Les premières bactéries à s'implanter sont toujours anaérobies facultatives (entérobactéries, entérocoques et staphylocoques), mais le microbiote anaérobie strict s'implante beaucoup plus tardivement ; ce retard portant principalement sur les genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides*, bactéries d'origine entérique [25, 117, 184].

Chez le prématuré, le mode d'accouchement n'aurait pas d'influence sur la composition et la cinétique d'implantation du MI chez le nouveau-né prématuré [46, 111, 122, 264]. Les travaux de Sakata *et al.* ont montré que les bifidobactéries apparaissaient au même moment dans les selles de prématurés nés par voie basse (10,7 ± 3,1 jours de vie) et des prématurés nés par césarienne (10,5 ± 2,9 jours de vie) [264]. Dans une étude plus récente, Butel *et al.* ont confirmé que la colonisation par *Bifidobacterium* n'était pas corrélée avec le mode d'accouchement [46]. De plus, les travaux de Hall *et al.* ont montré que le mode d'accouchement n'avait pas d'influence sur la prévalence, ni sur le taux de colonisation des coliformes, des lactobacilles et des bifidobactéries dans le TGI des nouveau-nés prématurés, au 10ème et 30ème jour de vie [122]. Par ailleurs, Gewolb *et al.* ont montré que le mode d'accouchement n'affectait pas chez le nouveau-né prématuré le nombre d'espèces bactériennes fécales au 10ème jour de vie [111]. Toutefois, Rotimi *et al.* ont rapporté que le mode d'accouchement avait une influence sur le MI du nouveau-né prématuré durant les 3 premiers jours de vie [258]. Bien que ces auteurs n'aient pas rapporté de différence significative entre le taux d'isolement des entérobactéries et des entérocoques, ils notaient un retard général de colonisation par *Bacteroides spp* et clostridies chez les prématurés nés par césarienne, comparés aux enfants nés par voie basse.

II. 3. 3. Environnement et conditions d'hygiène

Les études menées chez le nouveau-né à terme indiquent que l'environnement ainsi que les conditions d'hygiène entourant l'accouchement influencent la colonisation intestinale. En effet, des différences de MI ont été rapportées entre des enfants nés à terme dans des pays en

voie de développement et des pays développés, entre des enfants nés en milieu rural et urbain, et entre des enfants nés à la maison et à l'hôpital [2, 279].

A notre connaissance, seules deux études ont rapporté que l'environnement entourant l'enfant influençait le MI du nouveau-né prématuré [122, 270]. Les travaux de Hall *et al.* ont montré que le nombre de nouveau-nés prématurés colonisés par des lactabocilles était moins élevé chez des prématurés placés en couveuse fermée, comparés à des prématurés placés en couveuse ouverte (8% à un taux de 10^8 ufc/g de selles *versus* 50% à un taux 10^8 ufc/g de selles) [122]. Par ailleurs, Schwiertz *et al.* ont montré que les communautés bactériennes dominantes du MI de nouveau-nés prématurés devenaient très similaires entre les enfants après la 2ème semaine de vie [270].

II. 3. 4. Antibiotiques

Les antibiotiques sont connus pour influencer le MI du nouveau-né [47]. Quelques études ont été réalisées chez le nouveau-né prématuré mettant en évidence l'influence de l'antibiothérapie anté et postnatale sur le MI de ces enfants [26, 34, 39, 46, 111, 122, 270]. Blakey *et al.* ont montré que l'administration parentérale de pénicilline seule ou de pénicilline associée à de la gentamicine durant les 4 premiers jours de vie réduisait chez le nouveau-né prématuré traité l'incidence de *Clostridium sp*, de *Pseudomonas sp* et de *Lactobacillus sp*, avant le 12ème jour de vie, et augmentait l'incidence de *Clostridium sp* et de *Pseudomonas sp* après le 12ème jour de vie, par rapport aux prématurés non traités [34]. Dans cette étude, aucun enfant traité n'a été colonisé par *Lactobacillus*. Par ailleurs, Bennet *et al.* ont rapporté que le traitement de prématurés avec des antibiotiques par voie intraveineuse, tels que benzylpénicilline, cloxacilline, flucloxacilline, ampicilline, céfuroxime, céfoxitine et gentamicine conduisait à la diminution de germes anaérobies et à l'augmentation de *Klebsiella spp*, mais pas des autres bactéries à gram- [26]. Dans cette étude, la colonisation par *C. difficile* et *C. perfringens* était plus faible chez les enfants traités, par rapport aux enfants non traités. Les travaux de Hall *et al.* ont montré que le traitement de nouveau-nés prématurés avec des antibiotiques en intraveineuse réduisait significativement l'incidence de la colonisation par des lactobacilles au 10ème jour de vie, par rapport aux prématurés non traités (7% à un taux de 10^8 ufc/g de selles *versus* 33% à un taux de 10^8 ufc/g de selles) [122]. Gewolb *et al.* ont rapporté chez des nouveau-nés prématurés que durant le premier mois de

vie, la durée de l'antibiothérapie était inversement corrélée avec le nombre d'espèces bactériennes (r=0.491, p=0.007) et le nombre total de bactéries (r=0.482, p=0.008) dans les échantillons fécaux [111]. En revanche, ces mêmes auteurs ont montré que l'antibiothérapie anténatale ne semblait pas affecter le MI du nouveau-né prématuré. De même, Butel *et al.* ont rapporté que la colonisation intestinale par *Bifidobacterium* n'était pas influencée par l'antibiothérapie anténatale, ni même par l'antibiothérapie postnatale [46]. Dans l'étude de Bonnemaison *et al.* des nouveau-nés prématurés et à terme traités avec de l'amoxicilline et de la nétilmicine étaient colonisés à des niveaux élevés par *K. oxytoca* et *E. coli* résistants à l'amoxicilline, mais à des taux plus faibles que d'habitude [39]. Dans cette même étude, les auteurs ont rapporté que des nouveau-nés prématurés traités avec de l'amoxicilline, de la nétilmicine et du céfotaxime étaient rapidement colonisés à staphylocoques à des taux plus élevés que d'habitude.

II. 3. 5. Alimentation

L'effet du type d'alimentation (lait maternel ou lait artificiel) sur l'établissement du MI a été étudié de façon extensive chez le nouveau-né à terme. La majorité des études menées chez ces enfants a montré que le MI des nouveau-nés allaités était différent de celui des nouveau-nés nourris avec un lait artificiel [57, 160, 219, 124]. Notamment, le microbiote fécal des enfants nourris au sein est dominé par des bifidobactéries et des entérobactéries, tandis que les enfants nourris avec un lait artificiel développaient un microbiote plus complexe avec apparition en dominance de genres bactériens anaérobies du microbiote d'adulte.

En revanche, l'effet de l'alimentation sur le MI du prématuré a été très peu étudié [34, 111]. Dans l'étude de Blakey *et al.* la colonisation intestinale était retardée avec un nombre restreint d'espèces bactériennes au-delà du 4ème jour de vie chez 43% des nouveau-nés prématurés recevant immédiatement après la naissance une nutrition parentérale, comparés à 12,5% des nouveau-nés prématurés recevant une alimentation entérale [34]. Gewolb *et al.* ont montré que les profils de colonisation étaient similaires entre les nouveau-nés prématurés nourris avec un lait maternel et ceux nourris avec une formule infantile [111]. Toutefois, le MI se diversifiait uniquement chez les nouveau-nés prématurés nourris avec un lait maternel entre le 10ème et le 30ème jour de vie. Dans l'étude de Butel *et al.* l'implantation des

bifidobactéries n'a pas été influencée par le type de lait administré (formule pour prématurés/lait maternel) [46].

II. 4. Fonctions du microbiote intestinal

Le MI exerce de nombreuses fonctions physiologiques qui pour la plupart sont bénéfiques pour l'hôte. Parmi les grandes fonctions, citons la fermentation des substrats disponibles au niveau du côlon, les interactions avec les cellules épithéliales, le rôle de barrière à la colonisation par des micro-organismes pathogènes, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal.

II. 4. 1. Métabolisme bactérien

C'est principalement au niveau du côlon que s'exprime l'activité métabolique du MI. Une quantité de 10^8 germes/mL ou g de contenu intestinal serait requis pour que les bactéries exercent un effet significatif sur l'hôte. Par leur nombre et leur variété, les micro-organismes colonisant le TD de l'homme sont dotés d'un potentiel enzymatique énorme. Le métabolisme bactérien assure des transformations biochimiques qui ont des effets multiples sur la nutrition et la santé de l'hôte.

Peu de données sont disponibles aujourd'hui sur l'activité métabolique du microbiote colique du nouveau-né prématuré [10, 98, 156, 287, 296, 323]. La présence d'acides gras à chaîne courte (AGCC) dans les selles de ces enfants suggère que le MI en place est capable de fermenter les glucides, les protéines non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif ainsi que les sécrétions endogènes représentées par les mucopolysaccharides, les débris cellulaires ou encore les enzymes [66, 98]. Dans l'étude de Favre *et al.* les concentrations en AGCC étaient significativement corrélées avec l'âge gestationnel des prématurés [98]. Ces auteurs ont rapporté que les concentrations en AGCC chez ces enfants nourris avec un lait de mère étaient significativement plus faibles chez ceux ayant un âge gestationnel <33 SA que ceux ayant un âge gestationnel >33 SA (7 µmol/g de selles *versus* 24 µmol/g de selles).

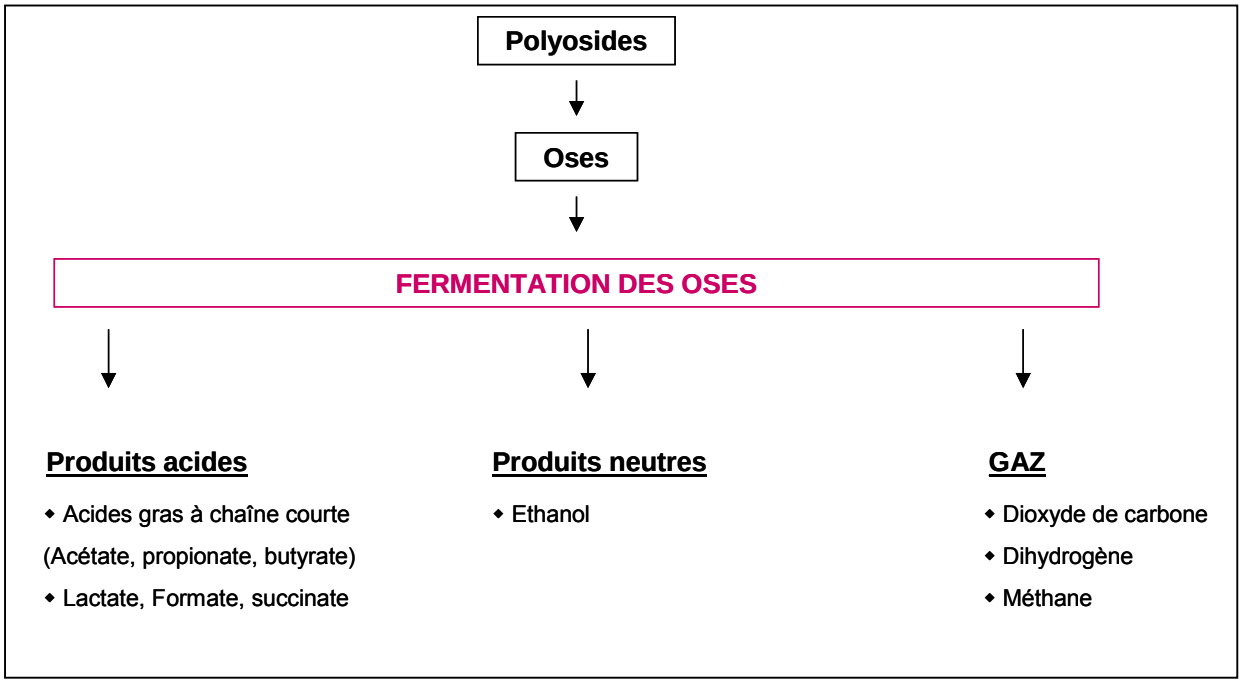

Figure 5. Principaux produits de dégradation des glucides par le microbiote colique.

◈ *Métabolisme glucidique*

Le microbiote colique intervient au niveau du métabolisme glucidique, notamment dans la dégradation des polyosides et la fermentation des oses **(Figure 5)**. Chez le nouveau-né prématuré, la digestion du lactose (principal glucide présent dans le lait) est limitée par la maturation tardive de la lactase [227]. Par conséquent, le lactose ne peut pas être digéré en totalité au niveau de l'intestin grêle. Ce lactose non digéré sera fermenté par le microbiote colique [154, 157]. La dégradation anaérobie des polyosides dans le côlon est un processus complexe qui implique la contribution de plusieurs groupes bactériens possédant des activités métaboliques variées et complémentaires. Les polyosides sont hydrolysés par des bactéries hydrolytiques, aboutissant à la libération de fragments osidiques plus petits. La fermentation des oses par les micro-organismes hydrolytiques et glycolytiques, produisent principalement des acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que l'acétate, le propionate et le butyrate, et dans une moindre mesure, des gaz comme le dihydrogène, le dioxyde de carbone et le méthane, de l'éthanol et de l'énergie. La production d'AGCC fournit de l'énergie aux micro-organismes nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires et exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte en lui fournissant une source alternative d'énergie [182], un mécanisme d'absorption d'eau dans le côlon [261] et un agent inhibiteur contre des agents pathogènes [99]. Par ailleurs, le butyrate représente chez l'adulte entre 60 et 70% de l'apport énergétique des cellules épithéliales coliques et, est essentiel au maintien de l'intégrité de la muqueuse [66].

◈ *Métabolisme azoté*

Le microbiote colique intervient au niveau du métabolisme azoté, notamment dans la dégradation des protéines et peptides, et la fermentation des acides aminés. Dans le côlon, les protéines et les peptides constituent la principale source azotée pour le MI. Par conséquent, les bactéries doivent hydrolyser ces polymères pour disposer des carbones et de l'azote qui les composent. Les protéines sont hydrolysées par des protéases (enzymes protéolytiques), conduisant à la libération de peptides plus petits. Un grand nombre d'espèces bactériennes coliques possèdent une activité protéolytique, telles que les bactéries appartenant aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Bien que très peu étudiés, les peptides auraient un rôle important au sein de

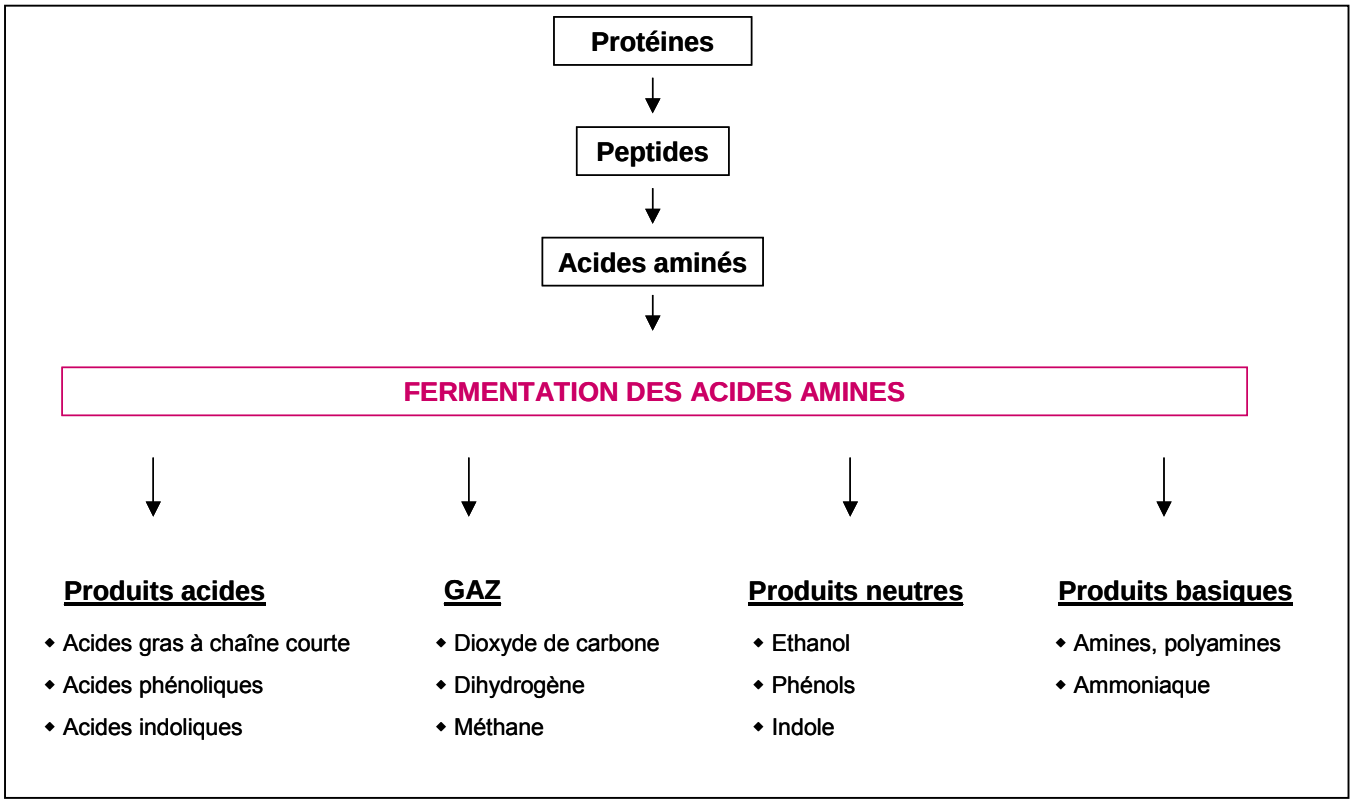

Figure 6. Principaux produits de dégradation des protéines par le microbiote colique.

l'écosystème colique, en stimulant la croissance de certaines espèces bactériennes intestinales. La fermentation des acides aminés implique une variété de réactions d'oxydation et de réduction dont les accepteurs finaux d'électrons sont divers (acides gras insaturés, autres acides aminés…). Parmi ces différentes réactions, la voie réductrice de désamination des acides aminés, conduisant à la formation d'AGCC et d'ammoniaque, apparaît comme celle majoritairement empruntée par les espèces coliques. L'acétate, le propionate et le butyrate sont les principaux métabolites produits. Par ailleurs, le métabolisme des acides aminés génère d'autres métabolites, tels que des phénols, des acides di-carboxyliques, des acides gras ramifiés, des composés phénoliques et indoliques, des amines, des polyamines et des gaz comme du dihydrogène et du dioxyde de carbone **(Figure 6)**. Certains de ces composés ont des effets indésirables pour l'hôte. Par exemple, l'ammoniaque provenant principalement de la désamination des acides aminés est un composé potentiellement toxique pour l'hôte, car ce métabolite peut 1) altérer à faible concentration (6 à 10 mM) la morphologie et le métabolisme intermédiaire des cellules intestinales et augmenter la synthèse d'ADN et 2) être impliqué dans des mécanismes d'initiation du cancer colique. Une augmentation de la formation des composés phénoliques et indoliques issus de la dégradation des acides aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine) a été rapportée dans diverses pathologies chez l'homme, en particulier dans le cas de cancer colique [189]. Les amines issus principalement de la décarboxylation des acides aminés sont reconnus comme potentiellement toxiques pour l'hôte et pourraient jouer un rôle important dans diverses affections telles que dans les gastro-entérites infantiles [105, 189]. Les polyamines jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie colique [185].

II. 4. 2. Modifications des caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'intestin

Le MI a des effets sur la structure, le renouvellement et le fonctionnement de l'intestin [275]. Ces effets ont été mis en évidence par l'étude comparée d'animaux axéniques (dépourvus de germes) avec des animaux conventionnels.

Comparés aux animaux conventionnels, les animaux axéniques présentent une couche de mucus plus importante, une paroi intestinale anormalement mince et des villosités plus longues et plus minces [28]. Après introduction d'un microbiote chez des animaux initialement axéniques, les caractéristiques morphologiques de l'intestin retournent à la

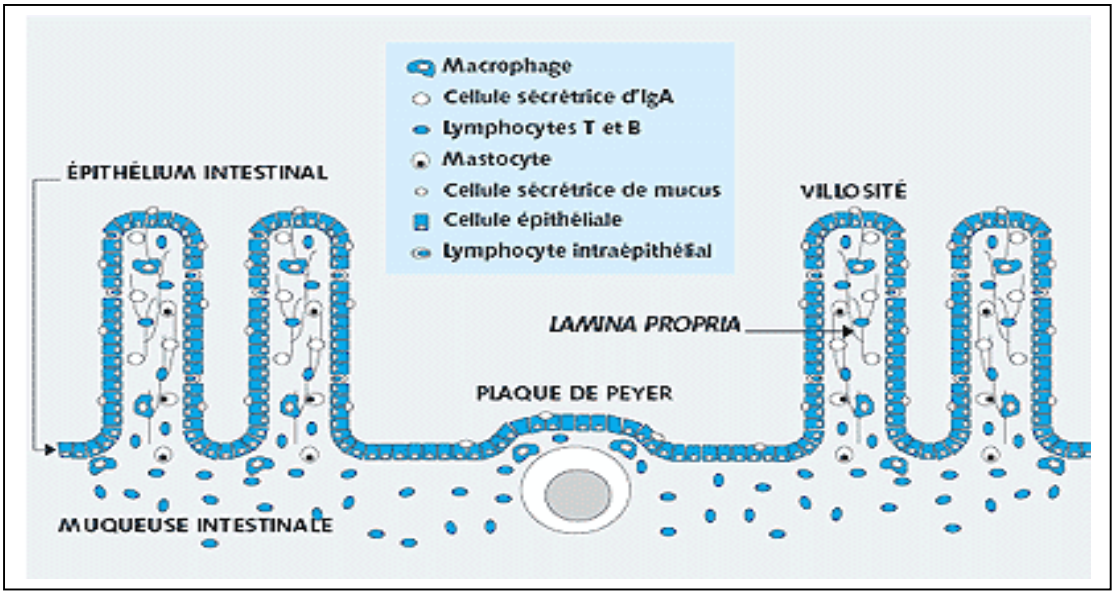

Figure 7. Schéma du système immunitaire intestinal.

normale. En l'absence de bactéries, le renouvellement de l'épithélium colique est ralenti. Alam *et al.* ont rapporté un ralentissement de la multiplication cellulaire dans les cryptes coliques et une réduction du nombre de cellules par crypte d'environ 20% chez l'animal axénique, par rapport à l'animal conventionnel [5].

Chez l'animal axénique, la vascularisation des villosités intestinales est réduite par rapport à l'animal conventionnel et la colonisation par *Bacteroides thetaiotaomicron* de souris initialement axéniques stimule l'angiogénèse intestinale, via une augmentation de l'expression de l'angiogenin-3, une protéine de l'hôte impliquée dans l'activité angiogénique [127, 288]. Par ailleurs, Schumann *et al.* ont montré chez des rats que les traitements antibiotiques à large spectre donnés en période néonatale affectaient l'expression de multiples gènes de la muqueuse colique [269].

Le MI est également capable de moduler l'expression génique des cellules de l'hôte. En effet, la comparaison de profils d'expression génique de l'intestin grêle distal de souris axéniques et conventionnelles a montré que le MI était capable de moduler positivement ou négativement l'expression d'une centaine de gènes codant des protéines impliquées dans le transport des nutriments, dans le métabolisme des enzymes impliquées dans la production d'énergie cellulaire, dans la fonction de barrière de l'épithélium, dans la réponse aux hormones, dans la composition de la matrice cellulaire et dans les voies de transduction du signal [127]. Ainsi, le MI est impliqué dans de nombreuses fonctions intestinales incluant l'absorption des nutriments, le renforcement de la fonction de barrière de l'épithélium, la maturation intestinale postnatale, la motilité intestinale ou encore l'angiogénèse.

Enfin, comparés aux animaux conventionnels, les animaux axéniques ont besoin de 20 à 30% de calories supplémentaires pour maintenir leur masse corporelle [335]. Des études récentes suggèrent que le MI contribue à l'absorption par l'hôte des glucides et des lipides [16, 284] et régule la lipolyse (et donc la masse grasse de l'hôte) [17].

II. 4. 3. Education et stimulation du système immunitaire intestinal

Le système immunitaire intestinal (SII) est essentiellement situé dans l'intestin grêle et le côlon **(Figure 7)**. Les réponses immunes élaborées au niveau du SII sont adaptées au milieu

intestinal et ont pour but 1) de favoriser la tolérance orale, en empêchant l'organisme d'induire des réponses immunes spécifiques vis-à-vis du microbiote résident et des protéines alimentaires et 2) de développer des réponses protectrices cellulaire et humorale envers les bactéries, les virus et les parasites entéropathogènes [221].

La réponse humorale est réalisée essentiellement grâce à la sécrétion d'anticorps (Ac) spécifiques des muqueuses. Sécrétés dans la lumière intestinale, les Ac appartenant à la classe des immunoglobulines A (IgA) jouent un rôle important dans la protection des muqueuses envers les micro-organismes commensaux et pathogènes. Ils forment des immuns-complexes avec l'antigène, bloquant l'adhésion des bactéries pathogènes, la multiplication virale dans l'entérocyte et neutralisent les entérotoxines. La réponse cellulaire fait intervenir des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) qui permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal.

Les études menées sur des animaux axéniques et conventionnels ont permis de mettre en évidence *in vivo*, le rôle joué par le MI sur le système immunitaire.

Les bactéries intestinales favorisent le développement cellulaire du système immunitaire intestinal et systémique. Comparées à des souris conventionnelles, les souris axéniques présentent de multiples déficits immunitaires avec une atrophie des plaques de Peyer contenant peu de centres germinatifs, un nombre réduit de lymphocytes B et T, une rareté des plasmocytes à IgA [217], une réduction du nombre de LIE exprimant le CD4+αβ ou CD8+αβ [20, 120], un faible taux d'anticorps naturels (IgG et IgA) [334], une production limitée de cytokines et une hyporéactivité des macrophages et des polynucléaires neutrophiles [217]. La colonisation du tube digestif de la souris axénique avec un microbiote de souris conventionnelle adulte provoque en trois semaines l'activation du SII (augmentation du nombre de plasmocytes à IgA, de lymphocytes T et de LIE) [217]. La présence du MI induit l'expression des molécules de classe II au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle [201]. Chez l'animal axénique, la rate et les ganglions lymphatiques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées [191].

Les bactéries intestinales ont également un pouvoir immunomodulateur sur les réponses immunes spécifiques, puisqu'elles sont capables de moduler la réponse anticorps spécifique IgA, la tolérance orale et les réponses humorales et cellulaires [217]. Moreau *et al.* ont

montré que les bifidobactéries ont un effet adjuvant sur la quantité des IgAs anti-rotavirus et augmentent le nombre de cellules sécrétrices dans la muqueuse intestinale des nouveau-nés [218]. Inversement, il est décrit un effet inhibiteur sur ce type de réponse par *E. coli*. Gaboriau *et al.* ont rapporté que l'ingestion simultanée d'entérotoxines et d'ovalbumine par des souris axéniques et conventionnelles empêche chez ces 2 modèles l'établissement de la tolérance [109]. Une étude cinétique menée en parallèle a montré cependant, qu'avec le temps, les phénomènes de suppression se rétablissent mais uniquement chez les souris conventionnelles. Ce résultat met en évidence l'importance que revêt le microbiote intestinal dans la protection de l'individu contre les processus pathologiques [109].

II. 4. 4. Effet de barrière

En contact avec le milieu extérieur, le TD constitue une porte d'entrée pour les pathogènes. Le MI exerce un effet de barrière contre ces attaques potentielles de l'environnement. Le microbiote dominant s'oppose à l'implantation des bactéries en transit, en sécrétant des bactériocines, en produisant des acides gras volatils (inhibition de la croissance bactérienne) et/ou en occupant des récepteurs ou encore en inhibant la production ou les effets des toxines bactériennes.

L'utilisation d'animaux gnotoxéniques, porteurs de flores simplifiées, a permis d'appréhender certains mécanismes sous jacents à l'effet de barrière. Raibaud *et al.* ont rapporté que l'effet de barrière peut aboutir soit à une élimination totale de la souche ingérée (effet de barrière drastique), soit à un équilibre dynamique entre deux souches, l'une dominant l'autre (effet de barrière permissif) [249]. Certaines espèces bactériennes dominantes s'opposeraient à l'implantation et à la multiplication des bactéries exogènes. Dabard *et al.* ont notamment rapporté que la ruminococcine A, produite par *R. gnavus*, est active contre des clostridies pathogènes et des bactéries phylogénétiquement proches de *R. gnavus* [71]. L'effet de barrière peut s'exercer soit entre bactéries appartenant à des espèces différentes (effet de barrière inter-spécifique) soit entre bactéries appartenant à une même espèce (effet de barrière intra-spécifique).

Le microbbiote très simplifié du nouveau-né prématuré peut laisser supposer un effet barrière peu ou pas efficace favorisant les infections à point de départ digestif.

Tableau 6. Effets des prébiotiques observés chez le nouveau-né prématuré, à travers des études prospectives et randomisées.

Prébiotiques			Lait	Prématurés		Effets observés	Références
Nature	Dose	Durée	Type	Effectifs	AG (SA)		
FOS	0,4 g/dL	14 jours	FI (Pl + Pr)	56	< 34	Composition du MI **(1)** Consistance des selles **(0)** Fréquence des selles **(1)** Gain de poids **(1)**	Kapiki 2007 [151] [Grèce]
GOS/FOS (90%/10%)	1 g/dL	14 jours	FI (Pl + Pr)	20	< 28	Transit gastro-intestinal **(1)** Viscosité et pH des selles **(1)** Gain de poids **(0)**	Mihatsch 2006 [205] [Allemagne]
GOS/FOS (90%/10%)	1 g/dL	28 jours	FI (Pl + Pr) LH (Ref)	25	< 32	Composition du MI **(1)** Gain de poids **(0)**	Knol 2005 [164] [Allemagne]
GOS/FOS (90%/10%)	1 g/dL	28 jours	FI (Pl + Pr) LH (Ref)	42	< 32	Composition du MI **(1)** Consistance des selles **(1)** Fréquence des selles **(1)** Gain de poids **(0)**	Boehm 2002 [37] [Allemagne]

Légende : GOS=Galacto-oligosaccharides, FOS=Fructo-oligosaccharides, FI=Formule infantile pour prématuré, LH=Lait humain, Pl=Placebo, Pr=Prébiotiques, Ref=Référence, AG=Age gestationnel, SA=Semaines d'aménorrhée, **(1)** : oui, **(0)** : non.

II. 5. Modulation du microbiote intestinal

II. 5. 1. Prébiotiques

Le concept de prébiotiques a été introduit par Gibson et Roberfroid en 1995 [112]. Selon leur définition, les prébiotiques sont des composants alimentaires non digestibles qui affectent de façon bénéfique la santé de l'hôte, en stimulant de manière sélective, au niveau du côlon, la croissance et/ou l'activité d'une espèce ou d'un nombre limité d'espèces bactériennes.

Le lait humain, propice au développement d'un MI bénéfique pour la santé de l'hôte [168], possède une composition complexe en oligosaccharides (OS) [104, 286] dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas encore pleinement comprises. Des auteurs comme Newburg *et al.* ou Kunz *et al.* ont identifié les OS du lait humain comme étant des facteurs prébiotiques [169, 229]. Etant donné la complexité structurale des OS, aucune formule infantile ne contient d'OS identiques à ceux du lait humain. Afin de reproduire l'effet prébiotique du lait humain, différents types d'OS ont été testés chez l'homme pour leur effet bifidogène [36]. Les OS sélectionnés sont des galacto- et fructo-oligosaccharides (GOS et FOS). Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses études menées chez le nouveau-né à terme, et dans une moindre mesure chez le nouveau-né prématuré [37, 151, 164, 205].

Dans le présent mémoire, seules les études prospectives et randomisées ont été inclues **(Tableau 6)**. Les prébiotiques utilisés ont été des oligosaccharides de type FOS et/ou GOS. Les doses de prébiotiques utilisées étaient comprises entre 0,4 g/dL et 1 g/dL et étaient administrées le plus souvent dès le début de l'alimentation entérale, pendant deux à quatre semaines. Aucune étude prébiotique réalisée chez le nouveau-né prématuré n'a rapporté d'effets néfastes pour la santé de ces enfants. Les effets prébiotiques étudiés concernaient la composition du MI [37, 151, 164], les caractéristiques des selles [37, 151, 205], le transit gastro-intestinal [37, 151, 205] et le gain de poids [37, 151, 164, 205].

◈ *Effets des prébiotiques sur la composition du MI*

La supplémentation d'une formule infantile en OS a favorisé le développement d'un MI dominé par des bifidobactéries [37, 151, 164], similaire à celui d'un nouveau-né prématuré nourri avec un lait humain [37]. Dans l'étude de Kapiki *et al.* au 7ème jour de vie, le pourcentage de nouveau-nés prématurés colonisés par des bifidobactéries était significativement plus élevé dans le groupe supplémenté en FOS que dans le groupe contôle (90% *versus* 70%), ainsi que le taux de colonisation (9,5 $\log_{10}$ ufc/g de selles *versus* 9,02 $\log_{10}$ ufc/g de selles) [151]. Toutefois dans cette étude, l'augmentation des bifidobactéries est peu importante (< 1 log) et la question se pose de savoir si cette augmentation a une significativité biologique. Dans l'étude de Boehm *et al.* le taux de colonisation par des bifidobactéries était significativement plus élevé chez les prématurés nourris avec une formule infantile supplémentée en GOS/FOS que chez les prématurés nourris avec la même formule infantile non supplémentée (10^{10} ufc/g de selles *versus* 10^8 ufc/g de selles) [37]. En outre, le taux de colonisation était similaire entre les prématurés nourris avec une formule infantile supplémentée et ceux nourris avec un lait humain (environ 10^9 ufc/g de selles). Il faut cependant relever que dans ces 2 études le taux de colonisation des bifidobactéries chez ces enfants prématurés était élevé. Knol *et al.* dans une population de nouveau-nés prématurés avec une colonisation par les bifidobactéries de plus faible niveau ont rapporté qu'au 28ème jour de vie le pourcentage d'enfants colonisés par des bifidobactéries était significativement plus élevé dans le groupe supplémenté en GOS/FOS que dans le groupe non supplémenté (34,5% *versus* 5,2%) avec un taux de colonisation également significativement plus élevé (10^9 ufc/g de selles *versus* 10^8 ufc/g de selles) [164].

Par ailleurs, l'augmentation des bifidobactéries dans le TGI du nouveau-né prématuré a été associée à une réduction du nombre de bactéries potentiellement pathogènes [151, 164]. Dans l'étude de Kapiki *et al.* l'augmentation des bifidobactéries chez les prématurés supplémentés en FOS était associée au 7ème jour de vie avec une diminution significative d'*E. coli* (10^8 ufc/g de selles *versus* 10^{10} ufc/g de selles) et des entérocoques (10^8 ufc/g de selles *versus* 10^9 ufc/g de selles), par rapport aux prématurés non supplémentés [151]. Knol *et al.* ont montré que la supplémentation orale en GOS/FOS réduisait au 28ème jour de vie, le pourcentage de prématurés colonisés par des bactéries potentiellement pathogènes (0,5% *versus* 2,6%) et réduisait également le taux de colonisation par ces bactéries (10^7 ufc/g de selles *versus* 10^8 ufc/g de selles), comparés aux prématurés non supplémentés [164].

La croissance des bifidobactéries associée à une diminution des bactéries pathogènes impliquerait divers mécanismes qui ne sont pas encore pleinement élucidés, parmi lesquels : la diminution ou la compétition vis-à-vis des substrats, la prévention d'adhésion des bactéries pathogènes à la surface des cellules épithéliales, la génération d'un environnement physiologique restrictif à travers la synthèse d'acides gras à chaîne courte et la diminution du pH, la production de composés antimicrobiens ou encore l'interaction MI et système immunitaire intestinal qui peut lutter contre les pathogènes. La réduction du nombre de bactéries pathogènes dans le microbiote fécal du nouveau-né prématuré nourri avec une formule infantile supplémentée en OS, laisse penser que ces composés prébiotiques pourraient protéger ces enfants contre d'éventuelles infections d'origine digestive.

◈ *Effets des prébiotiques sur le transit gastro-intestinal et sur les caractéristiques des selles*

Trois études prospectives et randomisées, menées chez le nouveau-né prématuré ont montré que le transit gastro-intestinal était amélioré par la supplémentation orale en prébiotiques [37, 151, 205]. Les travaux de Kapiki *et al.* et de Boehm *et al.* ont rapporté que comparée au groupe contrôle, la fréquence des selles était augmentée dans le groupe prébiotique, au 7ème jour de vie (3,05 selles/jour *versus* 2,3 selles/jour) [151] et au 28ème jour de vie (2,2 selles/jour *versus* 1,3 selles/jour) [37], respectivement. Par ailleurs, Boehm *et al.* ont montré que la fréquence des selles dans le groupe prébiotique nourri avec une formule infantile était similaire à celle du groupe référence nourri avec un lait humain [37]. Enfin, les travaux de Mihatsch *et al.* ont rapporté que comparée à des prématurés non supplémentés, la différence de temps de transit intestinal entre le 1er et le 14ème jour de vie était améliorée chez des prématurés supplémentés en GOS/FOS (6 heures *versus* -9 heures) [205]. Le temps de transit rapporté par ces mêmes auteurs au 14ème jour de vie avait tendance à être plus faible dans le groupe prébiotique, comparé au groupe contrôle (14 (3,5-32,5) heures *versus* 25,6 (4,5-51,2) heures).

L'amélioration du transit gastro-intestinal est associée dans deux études avec une modification des caractéristiques des selles [37, 205]. Les travaux de Mihatsch *et al.* ont rapporté au 14ème jour de vie, que la supplémentation orale en GOS/FOS chez le prématuré

Tableau 7. Effets des probiotiques observés chez le nouveau-né prématuré, à travers des études prospectives et randomisées.

Probiotiques			Lait	Prématurés			Effets observés	Références
Nature	Dose	Durée	Type	Effectifs	AG (SA)	PN (g)		
B. lactis (BB12)	1,6.10^9 ufc/jour 4,8.10^9 ufc/jour	[J1-J3] [J4-J21]	FI	69	<37	nd	Composition du MI **(1)**	Mohan 2006 [209] [Allemagne]
B.breve	1.10^9 ufc (2 fois/jour)	Hospitalisation	nd	19	<35	nd	Système Immunitaire **(1)**	Fujii 2006 [108] [Japon]
L. casei (LGG)	6.10^9 ufc/jour	Début d'alim. entérale-pendant 6 semaines	LH	80	nd	<1500	Colonisation Candida **(1)** Tolérance gastro-intestinale **(0)**	Manzoni 2006 [197] [Italie]
B. infantis *S. thermophilus* *B. bifidus*	1,05.10^9 ufc (1 fois/jour)	Début d'alim. entérale-jusqu'à la 36 sem d'âge corrigé	LH/FI	145	<34	<1500	Tolérance gastro-intestinale **(0)** Gain de poids **(tendance)** Incidence et sévérité de l'ECUN **(1)**	Bin-Nun 2005 [33] [Israël]
L. acidophilus *B. infantis*	125 mg/Kg/dose (2 fois/jour)	De J7- jusqu'à la sortie de l'hôpital	LH	367	nd	<1500	Incidence et sévérité de l'ECUN **(1)**	Lin 2005 [180] [Taïwan]
S. boulardii	10^9 ufc/Kg (2 fois/jour)	Début d'alim. entérale-pendant 30 jours	FI	87	28-32	nd	Composition du MI **(1)**	Costalos 2003 [62] [Grèce]
LGG	10^9 ufc (2 fois/jour)	Début d'alim. entérale-pendant 14 jours	LH/FI	71	32	<2000	Composition du MI **(1)**	Agarwal 2003 [3] [Etats-Unis]

Légende : FI=Formule infantile pour prématuré, LH=Lait humain, AG=Age gestationnel, SA=Semaines d'aménorrhée, PN=Poids de naissance, g=grammes, nd=pas de donnée, **(1)** : oui, **(0)** : non.

Tableau 7 (suite). Effets des probiotiques observés chez le nouveau-né prématuré, à travers des études prospectives et randomisées.

Probiotiques			Lait	Prématurés			Effets observés	Références
Nature	Dose	Durée	Type	Effectifs	AG (SA)	PN (g)		
L. rhamnosus (LGG)	6.10^9 ufc (1 fois/jour)	Début d'alim. entérale-jusqu'à la sortie de l'hôpital	FI	585	<33	<1500	Incidence de l'ECUN **(tendance)** Infections urinaires **(0)** Sepsis bactériennes **(0)**	Dani 2002 [74] [Italie]
B. breve	5.10^8 ufc (1 fois/jour)	Début d'alim. entérale-jusqu'à J28	LH/FI	91	nd	<1500	Tolérance gastro-intestinale **(1)** Volume d'air aspiré/estomac **(1)** Gain de poids **(0)**	Kitajima 1997 [159] [Japon]
B. longum BB536	5.10^8 ufc (1 fois/jour)	Début d'alim. entérale-pendant 8 semaines	LH/FI	10	nd	nd	Composition du MI **(1)**	Akiyama 1994 [4] [Japon]
LGG	10^8 ufc (2 fois/jour)	Début d'alim. entérale-pendant 14 jours	LH/FI	20	≤33	nd	Composition du MI **(0)** Gain de poids **(0)**	Millar 1993 [207] [Angleterre]
LGG	10^8 ufc (2 fois/jour)	Début d'alim. entérale-pendant 21 jours	LH/FI	20	≤33	nd	Métabolisme du MI **(1)**	Stansbridge 1993 [287] [Angleterre]

Légende : FI=Formule infantile pour prématuré, LH=Lait humain, AG=Age gestationnel, SA=Semaines d'aménorrhée, PN=Poids de naissance, g=grammes, nd=pas de donnée, **(1)** : oui, **(0)** : non.

diminuait significativement la viscosité et le pH des selles (viscosité=31,8 N *versus* 157,5 N et pH=5,1 *versus* pH=6,2) [205]. Dans l'étude de Boehm *et al.* la consistance des selles était significativement diminuée au 28ème de jour de vie chez les prématurés nourris avec une formule infantile supplémentée en GOS/FOS, comparés aux prématurés nourris avec la même formule infantile non supplémentée (score=2,7 *versus* 3,5) et était similaire avec celle de prématurés nourris avec un lait humain [37].

◈ *Effets des prébiotiques sur le gain de poids*

Parmi les études prébiotiques prospectives et randomisées, menées chez le prématuré, une seule étude a rapporté que le gain de poids était modifié par la supplémentation orale en prébiotiques [151]. Dans l'étude de Kapiki *et al.* le gain de poids moyen au 14ème jour de vie était significativement plus faible dans le groupe supplémenté en FOS que dans le groupe non supplémenté (22,8 ± 6 g/jour *versus* 27,4 ± 7 g/jour) [151].

II. 5. 2. Probiotiques

La définition du terme « probiotique » (signifiant « pour la vie ») a évolué au cours du temps et de la réflexion des chercheurs et des industriels. D'après la définition de la FAO/WHO, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont un bénéfice santé pour l'hôte [97].

Les probiotiques les plus souvent utilisés sont des bactéries lactiques ou des levures vivantes. Les souches probiotiques utilisées chez l'homme sont principalement isolées du MI humain. Elles doivent ne présenter aucune toxicité pour l'hôte, exercer un effet potentiel bénéfique pour la santé répondant aux demandes du consommateur et/ou aux attentes de santé publique, se multiplier en quantité importante en vue d'une production à grande échelle et survivre et s'adapter dans le produit fini. Les probiotiques sont sélectionnés selon leur capacité à survivre dans le tractus gastro-intestinal.

Chez le nouveau-né prématuré, les probiotiques utilisés sont des bactéries lactiques vivantes appartenant aux genres *Bifidobacterium* (*B. longum* BB536, *B. lactis*, *B. breve*, *B.*

infantis, B. bifidus) [4, 33, 108, 159, 180, 209], *Lactobacillus* (*L. casei, L. acidophilus, L. rhamnosus* GG) [3, 74, 180, 197, 207, 287], *Streptococcus* (S. *thermophilus*) [33], des levures vivantes (*S. boulardii*) [62] et *E. coli* [183, 251]. Dans le présent mémoire, seules les études prospectives et randomisées ont été inclues **(Tableau 7)**. Les doses de probiotiques utilisées chez le nouveau-né prématuré étaient en général comprises entre 10^8 et 6.10^9 bactéries par jour et étaient administrées le plus souvent dès le début de l'alimentation entérale, pendant deux, trois voire six semaines de vie ou jusqu'à la sortie de l'hôpital. Aucune étude de supplémentation en probiotiques réalisée chez le nouveau-né prématuré n'a rapporté d'effets néfastes pour la santé de ces enfants. Au contraire, les probiotiques utilisés étaient bien tolérés et exerçaient divers effets bénéfiques pour la santé du nouveau-né prématuré.

Les effets probiotiques étudiés concernaient la composition et le métabolisme du MI [3, 4, 62, 207, 209, 287], la colonisation intestinale par *Candida sp* [197], la tolérance gastro-intestinale [33, 159, 197], le gain de poids [33, 159], l'incidence et la sévérité de l'entérocolite ulcéro-nécrosante [33, 74, 180], le système immunitaire [108], les infections urinaires et les sepsis bactériennes [74].

◈ *Effets des probiotiques sur la composition et le métabolisme du MI*

Chez le nouveau-né prématuré, la supplémentation orale en probiotiques augmente le nombre de bifidobactéries [4, 62, 209]. Les travaux de Mohan *et al.* ont montré que la supplémentation orale en *B. lactis* (souche Bb12) augmentait significativement le nombre de bifidobactéries fécales (10^8 ufc/g de selles *versus* 10^5 ufc/g de selles) [209]. Dans l'étude de Costalos *et al.* la supplémentation orale en *S. boulardii* augmentait également significativement le nombre de bifidobactéries fécales (10^3 ufc/g de selles *versus* 10^2 ufc/g de selles) [62]. De même, dans l'étude de Akiyama *et al.* le nombre de bifidobactéries était augmenté par la supplémentation orale en *B. longum* BB536 [4]. En revanche, Millar *et al.* ont rapporté que la supplémentation orale en LGG n'avait pas d'effet sur l'incidence et le nombre d'espèces bactériennes intestinales [207].

L'augmentation des bifidobactéries a été associée à une réduction du nombre de bactéries pathogènes [62, 209]. Dans l'étude de Mohan *et al.* l'augmentation du nombre de bifidobactéries chez le prématuré supplémenté en *B. lactis* était associée à une diminution

significative du nombre d'entérobactéries (10^8 ufc/g de selles *versus* 10^9 ufc/g de selles), du nombre de *Clostridium* (10^5 ufc/g de selles *versus* 10^6 ufc/g de selles) [209], et sans réduction du nombre de micro-organismes résistants aux antibiotiques [209]. Dans l'étude de Costalos *et al.* l'augmentation du nombre de bifidobactéries chez le prématuré supplémenté en *S. boulardii* était associée à une réduction significative du nombre de *E. coli* ($2,67 \pm 0,045$ $\log_{10}$ ufc/g de selles *versus* $2,75 \pm 0,058$ $\log_{10}$ ufc/g de selles) et du nombre d'entérocoques ($2,14 \pm 0,359$ $\log_{10}$ ufc/g de selles *versus* $2,19 \pm 0,138$ $\log_{10}$ ufc/g de selles) [62]. Toutefois dans cette étude, la réduction du nombre d'*E. coli* et d'entérocoques était très faible et donc très certainement sans significativité biologique.

Les travaux de Manzoni *et al.* ont montré que l'incidence de colonisation par *Candida sp* était plus faible chez les prématurés supplémentés en *L. casei* que chez les prématurés non supplémentés (23,1% *versus* 48,8%) [197]. De plus, le niveau de colonisation de *Candida sp* était significativement plus faible dans le groupe probiotique que dans le groupe témoin.

Outre l'effet bénéfique de la supplémentation orale en probiotiques, sur l'implantation des bifidobactéries et de certaines bactéries pathogènes, il semble que l'apport de probiotiques chez le nouveau-né prématuré puisse modifier le métabolisme du MI. Les travaux de Stansbridge *et al.* (issus de l'étude de Millar *et al.* [207]) ont montré que les proportions fécales d'éthanol entre le 1er et le 28ème jour de vie chez des prématurés supplémentés en LGG étaient augmentées, comparées à la population contrôle, et ce, sans modifier les profils d'AGCC fécaux [287].

Agarwal *et al.* ont montré que la réponse de l'hôte vis-à-vis de la supplémentation orale en LGG était dépendante de l'âge gestationnel, de l'âge postnatal ainsi que de l'exposition aux antibiotiques [3]. Ces auteurs ont rapporté qu'au 21ème jour de vie, 21% des prématurés de moins de 1500 g étaient colonisés par LGG comparés à 47% des prématurés de plus de 1500 g au 8ème jour de vie. Par ailleurs dans cette étude, la supplémentation orale en LGG entraînait uniquement chez les enfants de moins de 1500 g une augmentation de la diversité bactérienne au 7ème jour de vie, qui continuait à augmenter au 14ème et 21ème jour de vie. Et enfin, aucun prématuré ayant reçu des antibiotiques n'était colonisé par LGG. Manzoni *et al.* ont rapporté que la réponse de l'hôte vis-à-vis de la supplémentation orale en *L. casei* était dépendante du poids de naissance [197]. Ces auteurs ont montré que le nombre de *Candida sp* était significativement réduit chez les prématurés ayant un poids de naissance compris

entre 1001 et 1500 g supplémentés en *L. casei*, comparés à des prématurés de même poids non supplémentés (15% *versus* 43%), mais cette réduction n'était pas significative chez des prématurés ayant un poids inférieur à 1000 g (42% *versus* 61%) [197].

◈ *Effets des probiotiques sur la tolérance gastro-intestinale et le gain de poids*

Les travaux de Bin-Nun *et al.* ont montré que la supplémentation orale en *B. infantis, S. thermophilus* et *B. bifidus* chez des nouveau-nés prématurés ayant une alimentation entérale similaire à celle de nouveau-nés prématurés non supplémentés n'améliorait pas significativement le délai d'obtention de l'alimentation entérale totale dans cette population (définie comme 100 mL/Kg/jour) [33]. En effet, le délai pour atteindre une alimentation entérale exclusive (ie, couvrant la totalité des besoins) était de 14,6 ± 8,7 jours dans le groupe probiotiques et de 17,5 ± 13,6 jours dans le groupe témoin. Par ailleurs, le gain de poids total observé à la 6ème semaine de vie avait tendance à être plus élevé dans le groupe probiotiques, comparé au groupe contrôle (gain de poids cumulé 691 ± 208 g *versus* 594 ± 239 g). De même, Manzoni *et al.* ont montré que le délai d'obtention de l'alimentation entérale exclusive était similaire chez des nouveau-nés prématurés supplémentés en *L. casei* et chez des nouveau-nés prématurés non supplémentés (15 ± 8 jours *versus* 17 ± 9 jours) [197]. Contrairement aux deux études précédentes, Kitajima *et al.* ont rapporté chez des prématurés dont la colonisation par *B. breve* était prouvée durant les deux premières semaines de vie, que l'alimentation entérale était mise en place plus précocément et avec des volumes plus importants par la suite, comparés à des prématurés non colonisés par *B. breve* [159]. Ces mêmes auteurs ont montré que la supplémentation orale en *B. breve* chez le nouveau-né prématuré n'améliorait pas le gain de poids entre la 4ème et 8ème semaine de vie, comparé au groupe contrôle [159]. Toutefois, le gain de poids était amélioré entre la 4ème et 8ème semaine de vie, chez les nouveau-nés colonisés par *B. breve*, comparés aux nouveau-nés non colonisés. De plus, ces mêmes auteurs ont rapporté que le volume d'air aspiré par l'estomac était significativement moins élevé durant les 4 premières semaines de vie dans le groupe probiotique, comparé au groupe témoin.

◈ *Effets des probiotiques sur l'incidence et la sévérité de l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN)*

Seules trois études prospectives et randomisées ont étudié chez le nouveau-né prématuré, l'influence de la supplémentation orale en probiotiques sur l'incidence et la sévérité de l'ECUN [33, 74, 180]. Les travaux de Dani *et al.* ont rapporté pour la première fois, que l'incidence de l'ECUN avait tendance à être moins élevée chez des prématurés supplémentés en LGG par rapport à des prématurés non supplémentés (1,4% *versus* 2,7%) [74]. Depuis ces travaux pionniers, deux autres études ont clairement démontré l'effet bénéfique d'une supplémentation orale en probiotiques sur l'incidence et la sévérité de l'ECUN [33, 180]. Lin *et al.* ont montré que l'incidence et la sévérité de l'ECUN étaient significativement réduites chez les prématurés supplémentés en *L. acidophilus* et *B. infantis* [180]. Dans cette étude, l'incidence de l'ECUN était de 5% dans le groupe probiotique et de 12,8% dans le groupe contrôle et la sévérité de l'ECUN était plus faible dans le groupe probiotique que dans le groupe contrôle (1,1% de stades II et III *versus* 5,3%). De même, Bin-Nun *et al.* ont rapporté que la supplémentation orale en *B. infantis, S. thermophilus* et *B. bifidum* chez le nouveau-né prématuré réduisait significativement l'incidence et la sévérité de l'ECUN, par rapport aux enfants non supplémentés [33]. Dans le groupe probiotique, l'incidence de l'ECUN était de 4% et la sévérité moyenne était à un stade de 1,3 ± 0,5 tandis que dans le groupe témoin, ces valeurs étaient respectivement de 16,4% et 2,3 ± 0,5. Il est à noter que dans ces deux dernières études [33, 180], l'incidence de l'ECUN était particulièrement élevée dans les groupes témoins, par rapport aux données de la littérature.

◈ *Effets des probiotiques sur le système immunitaire*

Une seule étude prospective et randomisée, réalisée chez le nouveau-né prématuré a rapporté l'effet des probiotiques sur le système immunitaire systémique [108]. Fujii *et al.* ont montré qu'au 28ème jour de vie, les taux sériques de TGF-β1 étaient significativement plus élevés chez les nouveau-nés prématurés supplémentés en *B. breve* que chez les nouveau-nés prématurés non supplémentés et que l'expression de Smad 3 (i.e. facteur de transcription, impliqué dans la voie de signalisation de TGF-β) était significativement améliorée dans le groupe probiotique, comparé au groupe contrôle [Fujii 2006]. Au vu de ces données, la supplémentation orale en *B. breve* pourrait potentiellement diminuer les réactions inflammatoires et allergiques chez ces enfants.

Tableau 8. Concentrations de citrulline rapportées dans différents fluides et tissus biologiques chez l'homme sain (Adapté d'après Curis *et al.* [67]).

Fluides ou tissus biologiques	Populations	Concentrations	Références
Plasma	Nouveau-nés	14-32[a]	Lepage 1997 [178]
		16 ± 5[b]	Dickinson 1965 [83]
	Enfants	31 ± 2	Rhoads 2005 [253]
		17-39	Lepage 1997 [178]
		12-30	Scriver 1965 [271]
	Adultes	22,8-41,9	Papadia 2007 [241]
		17 ± 6	Jianfeng 2005 [139]
		32 ± 7	Zhang 2004 [346]
		34 ± 1	Alteheld 2004 [7]
		36 ± 10	Martens-Löbenhoffer 2003 [199]
		40 ± 10	Crenn 2000 [65] et Crenn 2003 [64]
		25 ± 2	Lau 2000 [176]
		38 ± 8	Le Boucher 1997 [177]
		36 ± 7 ; 31 ± 7	Fekkes 1995 [100]
		27-38	Castillo 1993 [55]
		28 ± 11	Feste 1992 [103]
		32 ± 3	Van Eijk 1988 [312]
		33 ± 8	Kamoun 1983 [149]
Urine	Adultes	<4	Neveux 2004 [228]
		4,0 ± 4,3	Martens-Löbenhoffer 2003 [199]
Liquide amniotique	Foetus	<40	Jauniaux 1999 [137]
Liquide céphalo-rachidien	Adultes	1,5 ± 0,5	Neveux 2004 [228]
		1,5-21,6	Wiesinger 2001 [327]
Cerveau	Adultes	0,02-0,1	Perry 1982 [245]
Muscle	Adultes	170 ± 13	Alteheld 2004 [7]

Légende : Les concentrations de citrulline sont exprimées en µmol/L, excepté pour le cerveau où les concentrations sont exprimées en µmol/g. Les résultats sont donnés comme [a]intervalle entre les concentrations minimales et maximales ou comme [b]moyenne ± écart-type.

III. La citrulline

La citrulline, dont le nom est dérivé du latin *citrullus*, ou acide L-amino-2 uréido-5 valérique est un acide-α-aminé à 6 carbones possédant une chaîne latérale polaire et un groupement uréido **(Figure 8)**. Ses propriétés physico-chimiques et sa réactivité sont connues et ont été récemment décrites par Curis *et al.* [67].

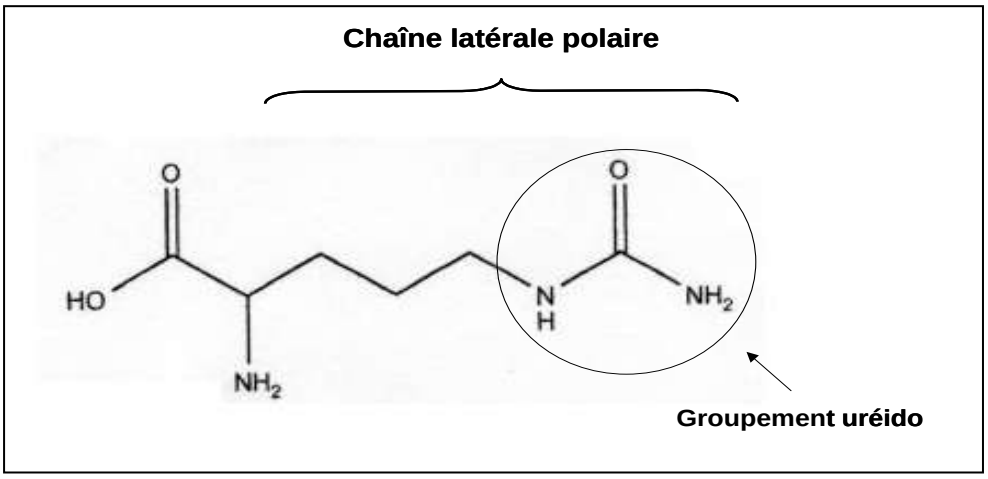

Figure 8 . Formule développée de la citrulline.

La citrulline est classée parmi les acides aminés non essentiels car elle est synthétisée de façon endogène par l'organisme. C'est un acide aminé libre, non incorporé dans les protéines qui est présent dans de nombreux fluides et tissus biologiques tels que le plasma, les urines, le liquide amniotique, le liquide céphalo-rachidien, le muscle ou encore le cerveau **(Tableau 8)**.

Bien qu'il n'existe pas de codon pour la citrulline, des résidus citrullyl peuvent être retrouvés dans des protéines qui sont principalement impliquées dans la kératinisation épidermale (trichohyaline, kératine, filaggrine) ou dans le système nerveux (myéline) [67]. La présence de résidus citrullyl proviendrait d'une modification post-translationnelle de résidus arginyl, via l'action d'une protéine-arginyl déiminase, selon la réaction suivante : Arginyl + H2O → Citrullyl + NH_4^+.

Tableau 9. Principales méthodes utilisées pour quantifier la citrulline chez l'homme (Adapté d'après Curis *et al.* [67]).

Méthodes		Références
Aspect statique du métabolisme de la citrulline		
Méthodes générales	HPLC[1]-OPA[2] (Van Eijk 1988 [312])	Van Eijk 1988 [312]
	HPLC-OPA (Van Eijk 1993 [311])	Van de Poll 2007 [307, 308]
	HPLC (Fangnan 2004 [96])	Jianfeng 2005 [139]
	RPC[3]-PITC[4]	Papadia 2007 [241]
	RPC-OPA + IEC-OPA (Fekkes 1995 [100])	Fekkes 1995 [100]
	RPC-OPA (Wu 1993 [338])	Rhoads 2005 [253]
	RPC-OPA (Zhang 2004 [346])	Zhang 2004 [346]
	RPC-PTC[5] (Feste 1992 [103])	Feste 1992 [103]
	RPC	Alteheld 2004 [7]
	IEC[6]-NIN[7]	Crenn 2000 [65] et Crenn 2003 [64]
	IEC-NIN	Lepage 1997 [178]
	IEC-NIN	Le Boucher 1997 [177]
	IEC-NIN	Jauniaux 1999 [137]
	IEC	Blijlevens 2004 [35]
	IEC	Pappas 2002 [242]
	IEC	Gondolesi 2002 [115]
	IEC	Neveux 2004 [228]
	IEC	Parvy 1988 [243]
	IEC	Dickinson 1965 [83]
	IEC	Scriver 1965 [271]
Méthodes spécifiques	IEC-DAM[8] (Kamoun 1983 [149])	Kamoun 1983 [149]
Aspect cinétique du métabolisme de la citrulline		
Méthodes utilisant des traceurs	HPLC-MS[9] (Martens-Löbenhoffer 2003 [199])	Martens-Löbenhoffer 2003 [199]
	HPLC-MS (Van Eijk 1999 [310])	Van de Poll 2007 [308]
	GC[10]-MS (Castillo 1993 [55])	Castillo 1993 [55]
	GC-MS (Castillo 1993 [55])	Lau 2000 [176]
	H RMN[11]	Silberstein 2002 [278]
	N RMN	Engelke 2004 [89]

Légende : [1]Chromatographie liquide haute performance, [2]O-phtaldialdéhyde, [3]Chromatographie en phase reverse, [4]Phenyl-isothiocyanates, [5]Phénylthiocarbamyl, [6]Chromatographie échangeuse d'ions, [7]Ninhydrine, [8]Méthode au diacétyl monoxime, [9]Spectrométrie de masse [10]Chromatographie gazeuse et [11]Résonnance magnétique nucléaire.

III. 1. Méthodes d'analyse de la citrulline

Depuis le début des années 80, de nombreuses méthodes de dosage ont été proposées pour quantifier la citrulline dans des échantillons biologiques. Parmi celles-ci, on distingue d'une part, les méthodes fournissant un aspect statique du métabolisme de la citrulline et d'autre part, les méthodes fournissant un aspect cinétique du métabolisme de la citrulline **(Tableau 9)**.

III. 1. 1. Aspect statique du métabolisme de la citrulline

La citrulline a été principalement quantifiée chez l'homme à partir de méthodes générales de dosage des acides aminés. Ces méthodes décrites dans le **tableau 9** utilisent des méthodes de séparation telles que la chromatographie liquide haute performance ou la chromatographie échangeuse d'ions, couplées soit à des méthodes de détection colorimétrique (p.ex. après réaction avec la ninhydrine), soit de détection fluorescence (p.ex. après réaction avec l'orthophtaldialdéhyde, le phénylthiocarbamyl ou le phenyl-isothiocyanate), ou de détection en ultra-violet. Bien qu'il existe des méthodes de dosage spécifiques de la citrulline [149, 163], seule la chromatographie échangeuse d'ions couplée à une méthode de détection en fluorescence après réaction avec du diacétylmonoxime a été utilisée chez l'homme [149]. Toutes les méthodes de quantification citées précédemment fournissent une image statique du métabolisme de la citrulline.

III. 1. 2. Aspect cinétique du métabolisme de la citrulline

L'élaboration de méthodes non invasives utilisant des traceurs aux isotopes stables, a permis de dépasser les données statiques et d'explorer facilement et sans danger l'aspect cinétique du métabolisme de la citrulline chez l'homme. Les principales méthodes utilisées décrites **tableau 9** font appels aux méthodes de chromatographie liquide haute performance ou de chromatographie gazeuse couplées à la spectrométrie de masse.

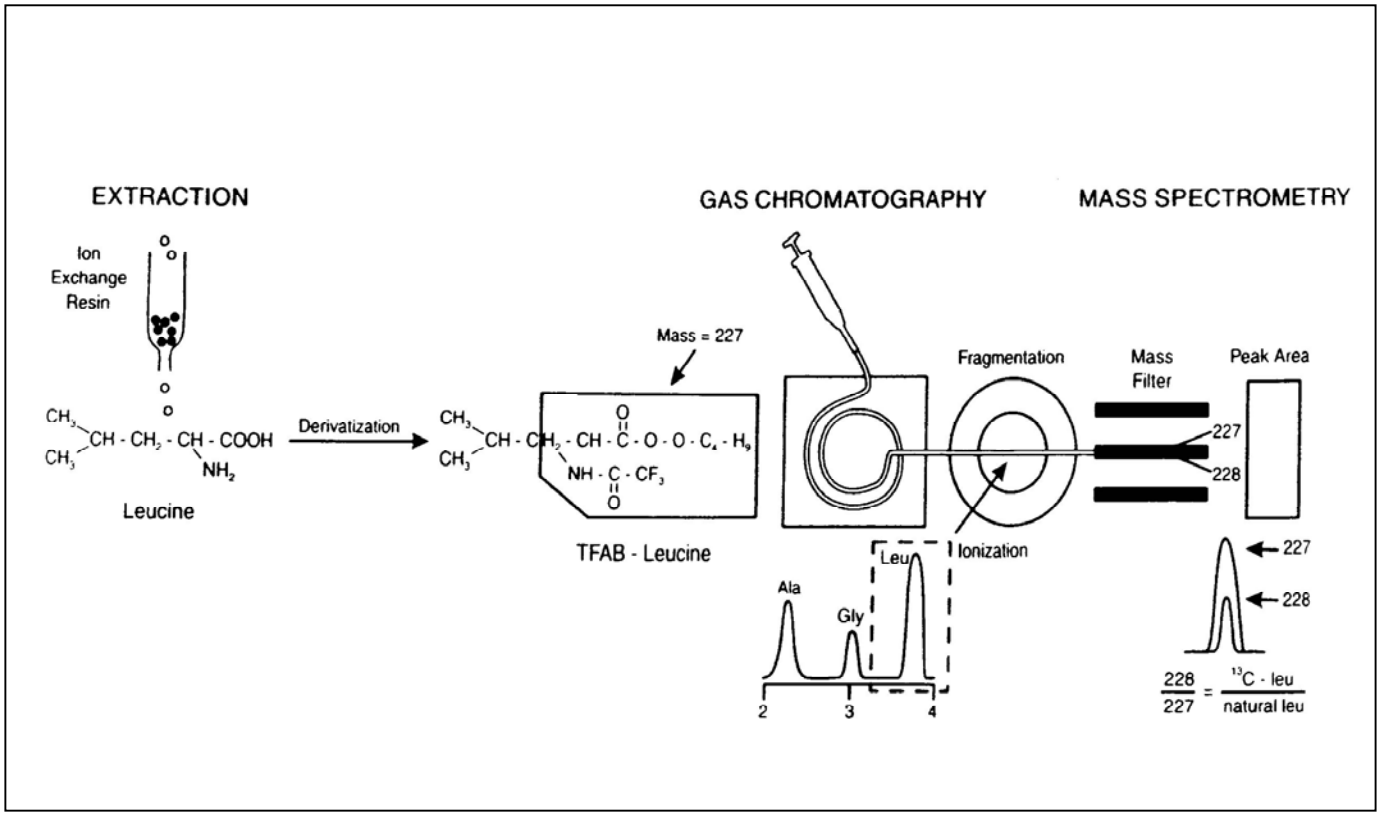

Figure 9. Principe d'analyse de la leucine par GC-MS en ionisation d'impact électronique, sous forme de dérivé trifluoroacétyl-butyl-ester (TFAB-leucine).

La chromatographie en phase gazeuse est une technique qui permet de séparer au sein d'une matrice complexe des molécules de nature et de volatilité très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Couplée à la spectrométrie de masse qui est une technique d'analyse qualitative et quantitative, la GC-MS permet entre autres l'analyse d'acides aminés.

◈ *Appareils de chromatographie gazeuse (GC)*

Le chromatographe se compose de quatre parties distinctes : 1) un four (type chaleur tournante) qui permet une programmation de température ajustable, 2) un système d'injection (manuelle ou automatique à l'aide d'un échantillonneur) qui permet d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser, 3) une colonne (capillaire ou remplie) sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer selon leurs affinités avec la phase stationnaire et 4) un système de détection qui permet de mesurer le signal émis par les différentes molécules.

◈ *Appareils de spectrométrie de masse (MS)*

Le spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes : 1) une source d'ions, enceinte dans laquelle les ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé, 2) un analyseur qui permet de trier chacune des espèces ioniques issues de la source d'ions en fonction de leur rapport masse (m)/charge (z) et 3) un détecteur qui permet de collecter les ions en fonction de leur rapport m/z et de mesurer l'intensité du signal qui leur correspond. L'enregistreur qui est relié au détecteur convertit les informations en spectre de masse.

◈ *Principe d'analyse d'un acide aminé par GC-MS*

Pour être analysés en GC-MS, les acides aminés d'un mélange subissent plusieurs étapes **(Figure 9)**. Tout d'abord, les acides aminés sont « isolés » de leur milieu en utilisant le principe de la chromatographie échangeuse d'ions. Par exemple, les acides aminés d'un mélange ionisés positivement à pH acide sont déposés sur des micro-colonnes remplies de

résine cationique (chargée négativement). Seules les molécules chargées positivement regroupant les acides aminés vont se lier avec les particules négatives de la résine cationique. Cette étape permet de « nettoyer » l'échantillon en éliminant les composés neutres ou chargés négativement. Après « rinçage » abondant à l'eau ou avec un acide faible, le pH est élevé brutalement, pour détacher les acides aminés de la résine et les recueillir en bas des colonnes. Afin d'être analysables en phase gazeuse à des températures « raisonnables », les acides aminés sont ensuite dérivés chimiquement pour les rendre plus volatils. Les parties les plus polaires de ces molécules sont « masquées » : l'hydrogène de ces groupes est remplacé par des radicaux hydrocarbonés après estérification.

L'échantillon contenant les acides aminés dérivés est d'abord introduit en tête de colonne du GC par l'intermédiaire d'une micro-seringue traversant un septum (i.e. pastille en caoutchouc) pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée injecteur. L'injecteur est traversé par un gaz vecteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Une fois rendus volatils, les acides aminés vont être emportés par le gaz vecteur (p. ex. par un flux d'hélium) le long de la colonne du GC et vont se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire. Celle-ci va provoquer un phénomène de rétention chromatographique avec les différents composés. Plus le composé aura d'affinité pour la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne. Les différents composés de l'échantillon seront élués à un temps de rétention caractéristique de leur structure particulière, défini comme le temps qui s'écoule entre l'injection et l'apparition du signal maximal du soluté au niveau du détecteur. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent le détecteur, i.e. le spectromètre de masse dans le cas de la GC-MS.

Dans le spectromètre de masse, les composés vaporisés entrent dans la source de l'appareil, où ils vont être ionisés. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation. L'ionisation par impact électronique (EI) est la plus couramment utilisée en spectrométrie de masse organique. L'ionisation EI utilise une source constituée d'un filament porté à haute température (2000°C) qui émet des électrons. Ceux-ci sont accélérés et vont entrer en collision avec les molécules gazeuses de la source : lors du choc, un électron est arraché de la molécule, la transformant en un ion chargé positivement. Celui-ci peut ensuite se fragmenter suivant son énergie interne, produisant des fragments ionisés positivement de masses caractéristiques. Après ionisation, les ions produits vont être accélérés, puis séparés selon leur

rapport m/z dans l'analyseur de masse. Et enfin, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur sera détecté et transformé en un signal utilisable par le détecteur. Selon le mode d'acquisition sélectionné, tous les ions d'une molécule pourront être détectés (mode scan) ou seuls quelques ions définis préalablement pourront être détectés (mode SIM). Le deuxième mode d'acquisition est plus sensible que le premier et est utilisé lors de l'analyse quantitative d'une molécule connue. Le spectromètre fournira au cours du temps deux séries de données : d'une part un comptage du nombre d'ions détectés, et simultanément une grandeur physique indicatrice de la masse de ces ions. Les ions de chaque masse apparaîtront avec une certaine distribution et la surface sous la courbe obtenue sera proportionnelle au nombre d'ions détectés. Chaque composé possèdera ainsi un spectre d'ions qui lui sera propre.

◈ *Quantification d'un acide aminé par GC-MS*

- *Etalon interne*

Du fait de multiples facteurs de variabilité dans l'efficacité de la dérivation, de l'ionisation, et du rendement de la détection, l'amplitude du signal obtenu lors de l'analyse d'un composé en GC-MS n'est pas très reproductible, même pour un même échantillon, d'une injection à la suivante. Par conséquent, il est impossible de quantifier un composé par rapport à un composé de référence injecté séparément (étalon externe). L'utilisation d'un étalon interne, ajouté à chaque échantillon, permet de s'affranchir de ces causes d'erreur, et confère une bonne reproductibilité aux mesures. Cette approche est basée sur la comparaison du signal correspondant au produit à quantifier avec celui d'un composé de référence appelé étalon interne. Ce dernier doit posséder des propriétés physico-chimiques les plus proches possibles des propriétés de la molécule à doser. Il doit être pur, stable, être extrait et dérivé avec un rendement proche de celui du composé d'intérêt, ne pas être déjà présent naturellement dans la matrice à doser et être inerte vis-à-vis des substances composant l'échantillon. On distingue trois types d'étalon interne, parmi lesquels les analogues de structures marqués aux isotopes stables, les homologues de structures et les composés de la même classe chimique.

La molécule à doser et l'étalon interne subiront les mêmes étapes d'extraction et de dérivation, vaporisation et ionisation, ce qui aboutira à des pertes des deux composés dans

des proportions similaires. Ainsi, leur rapport restera inchangé tout au long de la procédure. Pour obtenir le maximum d'avantages possibles de cette approche, l'étalon interne devra être ajouté le plus tôt possible dans le protocole d'extraction et d'analyse du composé d'intérêt.

- *Calcul de concentration*

La méthode consiste dans un premier temps à réaliser des mesures sur des échantillons standards contenant une même quantité connue d'étalon interne et des quantités croissantes du composé à doser. A l'aide de ces résultats, une courbe de calibration est établie. Elle permet d'obtenir une relation linéaire entre le rapport des intensités des signaux (surface des pics chromatographiques) correspondant à la substance à analyser (p. ex. : l'acide aminé d'intérêt) et l'étalon interne, sur l'axe des y, et le rapport molaire des quantités de la substance à doser et l'étalon interne, sur l'axe des x.

Relation mathématique obtenue :

$$R(M/M+x) = R_0 + k \times ([\text{substance à analyser}]/[\text{étalon interne}])$$

où : R(M/M+x) est le rapport entre la surface de pic de l'ion de masse M représentatif de la substance à analyser (acide aminé d'intérêt) et la surface de pic de masse M+x représentatif de l'étalon interne dans le standard,

R_0 est le rapport des pics M/M+x dans l'acide aminé d'intérêt naturel (non marqué),

[substance à analyser]/[étalon interne], le rapport molaire des quantités de la substance à analyser (acide aminé d'intérêt) et de l'étalon interne dans le standard,

et k, la pente de la droite de régression.

Dans un second temps, les mesures sont réalisées sur des échantillons inconnus auxquels une quantité constante d'étalon interne est ajoutée avant de les traiter suivant le protocole d'analyse établi. Sur la courbe de calibration établie, la quantité de substance à doser dans chaque échantillon inconnu va pouvoir être calculée.

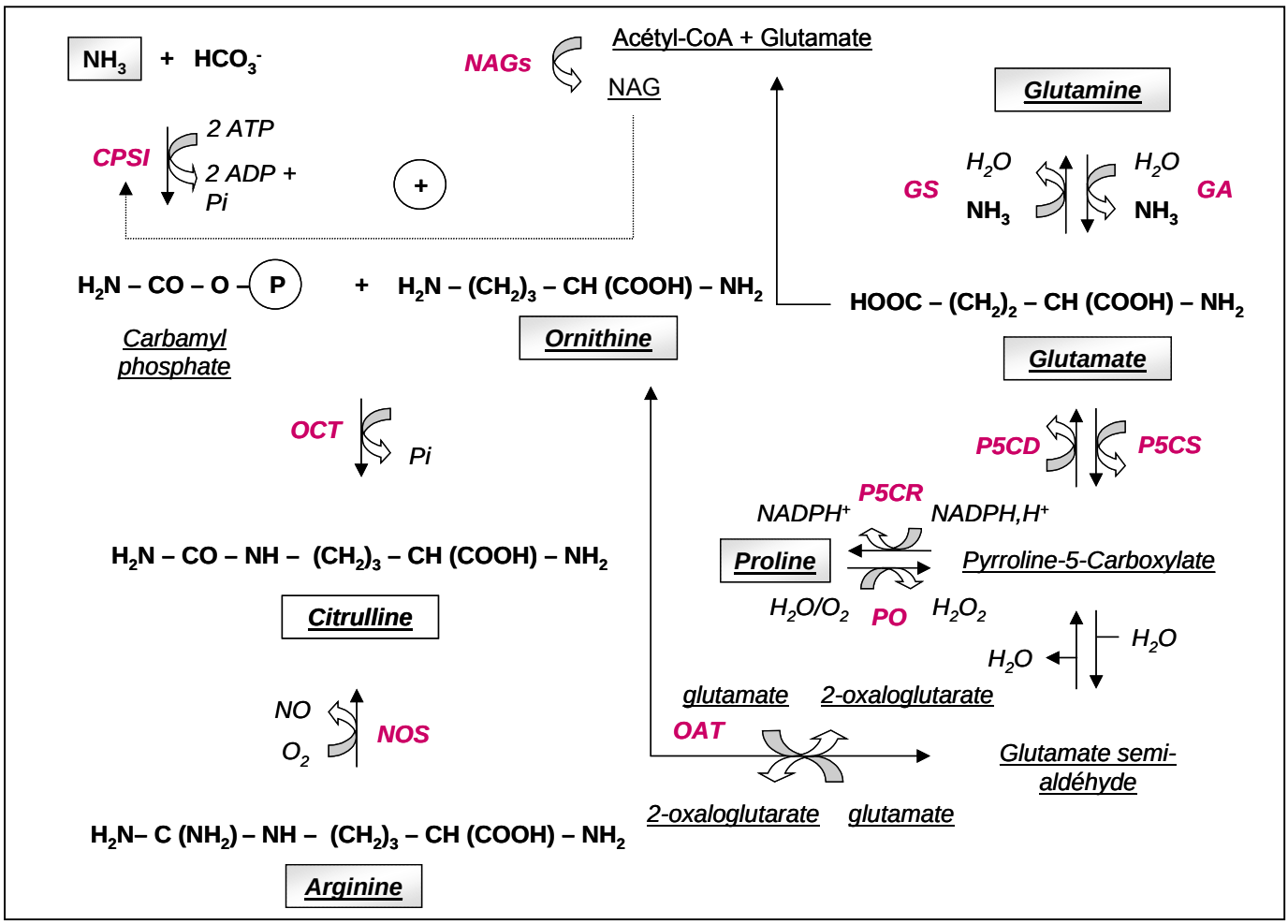

Figure 10. Principales voies de biosynthèse de la citrulline.

Légende : CPSI : carbamyl phosphate synthase de type I, OCT : ornithine carbamyl transférase, NOS : monoxyde d'azote synthase, NAG : N-acétyl glutamate, NAGs : N-acétyl glutamate synthase, GS : glutamate synthase, GA : glutaminase, P5CD : pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase, P5CS : pyrroline-5-carboxylate synthase, P5CR : pyrroline-5-carboxylate réductase, PO : proline oxydase, OAT : ornithine amino transférase.

Détail du calcul :

D'après la relation $R(M/M+x) = R_0 + k \times ([\text{substance à analyser}]/[\text{étalon interne}])$:
On obtient tout d'abord la relation (1),

$$R(M/M+x) - R_0 = k \times ([\text{substance à analyser}]/[\text{étalon interne}]),$$

puis la relation (2),

$$(R(M/M+x) - R_0)/k = ([\text{substance à analyser}]/[\text{étalon interne}])$$

et enfin la relation (3),

$$[(R(M/M+x) - R_0)/k] \times [\text{étalon interne}] = [\text{substance à analyser}].$$

Connaissant les valeurs de $R(M/M+x)$, R_0, k et [étalon interne], il sera ainsi possible de déterminer [substance à analyser] à partir de la relation (3).

III. 2. Métabolisme de la citrulline

III. 2. 1. Voies de biosynthèse de la citrulline

La glutamine est le principal acide aminé impliqué dans la biosynthèse de la citrulline. D'autres acides aminés tels que le glutamate, la proline et l'arginine peuvent être également des précurseurs de citrulline. De même, l'ammoniaque, issu de la dégradation de composés azotés (protéines, acides aminés, purines et pyrimidines) peut être un autre précurseur de citrulline **(Figure 10)**.

◈ *Synthèse de la citrulline à partir de l'ammoniaque*

La synthèse de citrulline à partir de l'ammoniaque a lieu dans la matrice mitochondriale des hépatocytes et des entérocytes. Trois enzymes mitochondriales participent à sa biosynthèse, parmi lesquelles : la carbamyl phosphate synthase de type I (CPSI), l'ornithine carbamyl transférase (OCT) et la N-acétyl-glutamate synthase (NAGs). La CPSI utilise une molécule de bicarbonate et d'ammoniaque, ainsi que deux molécules d'ATP pour former une molécule de carbamyl phosphate (CP). Cette enzyme nécessite la présence du N-acétyl glutamate (NAG), comme activateur spécifique. Le NAG est formé par la NAGs, à partir

d'une molécule de glutamate et d'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). Sous l'action de l'OCT, le radical carbamyl du CP est transféré sur une molécule d'ornithine pour former une molécule de citrulline. L'OCT est présente principalement dans le foie et la muqueuse intestinale, toutefois son activité est faible dans l'intestin, juste nécessaire pour la production de citrulline.

◈ *Synthèse de la citrulline à partir de la glutamine et du glutamate*

La synthèse de citrulline à partir de la glutamine et du glutamate a lieu dans la matrice mitochondriale des hépatocytes et des entérocytes. La glutamine subit l'action d'une glutaminase (GA), enzyme liée à la face interne de la membrane mitochondriale, qui hydrolyse la glutamine en une molécule d'ammoniaque (précurseur de citrulline) et une molécule de glutamate (activateur de la NAGs). Dans les entérocytes, le glutamate peut être un précurseur de citrulline par la voie de la pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS). Wakabayashi et Jones ont identifié dans la muqueuse intestinale, la pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) qui peut convertir le glutamate en pyrroline-5-carboxylate (P5C) [322]. En revanche, dans le foie, la conversion du glutamate en P5C est quasi inexistante car l'activité de l'enzyme P5CS est faible [143]. La P5C est ensuite spontanément convertie en glutamate semi-aldéhyde (GSA), puis transformée en ornithine par l'action de l'ornithine amino transférase (OAT). L'ornithine ainsi produite réagit avec une molécule de CP sous l'action de l'OCT pour former une molécule de citrulline.

◈ *Synthèse de la citrulline à partir de l'arginine*

La synthèse de la citrulline à partir de l'arginine a lieu au niveau du cytosol des cellules possédant la NO synthase (NOS), notamment dans les cellules endothéliales, mais aussi dans les macrophages et l'ensemble des tissus, puisque le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur ubiquitaire. Il existe trois isoformes de la NOS : la forme neuronale (nNOS), la forme endothéliale (eNOS), et la forme inductible (iNOS). Les nNOS et eNOS sont des protéines constitutives alors que la iNOS qui n'est pas exprimée normalement ou seulement très peu, est induite dans les macrophages lors d'une inflammation. Toutes les NOS utilisent le même mécanisme pour synthétiser le NO à partir de l'arginine et requièrent du NADPH,

FMN et bioptérine comme cofacteurs [203]. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation de la citrulline et du NO, à partir de l'arginine. Cependant, le premier mécanisme décrit par Hibbs *et al.* impliquant la désimination hydrolytique de l'arginine pour former la citrulline et l'ammoniaque, avec une oxydation ultérieure de l'ammoniaque pour former le NO n'a pas été retenu. Seul, le second mécanisme décrit par Marletta *et al.* et Tayeh *et al.* impliquant la formation d'un composé hydroxyl arginine via l'intervention d'une mono-oxygénase NADPH dépendante, suivi d'un remaniement électronique et du clivage du lien hémolytique, conduit à la formation d'une molécule de NO et d'un amino acide carbodiimide, qui après hydratation forme la citrulline. L'étude de Kwon *et al.* réalisée sur des macrophages en culture, incubés avec de la L-arginine, du NADPH, du FAD, du tétrahydrobioptérine et du dithiothréitol dans de l'$H_2{}^{18}O$ et du $^{16}O_2$ suggère que l'atome d'oxygène incorporé dans le groupement uréido de la citrulline proviendrait du dioxygène et non de l'eau.

Chez l'adulte sain, des études réalisées à l'aide de ^{15}N arginine ont montré que, bien que plus de 50% de la production de NO (environ 1 $\mu mol.kg^{-1}.h^{-1}$) provienne de l'arginine plasmatique, la conversion en NO représente 1% du flux total d'arginine, contre 15% pour la conversion d'arginine en urée [53]. La conversion d'arginine en citrulline ne représenterait qu'une source mineure de citrulline, environ 10% de la production totale de citrulline (environ 10 $\mu mol.kg^{-1}$.h-1) et 90% de la production totale de citrulline provenant de la glutamine métabolisée dans l'intestin [53].

Chez l'homme, l'excrétion urinaire de nitrates (NO_2) et nitrites (NO_3) est un bon indicateur de la quantité de citrulline synthétisée par cette voie. En effet, la réaction catalysée par la NOS produit une molécule de NO pour chaque molécule de citrulline produite. Le NO n'est pas mesurable directement puisque sa demi-vie n'est que de quelques secondes. Cependant, le NO qui est transformé en NO_2 et NO_3 peut être quantifié via le dosage de ces composés qui sont stables et excrétés en totalité dans les urines.

◈ *Synthèse de la citrulline à partir de la proline*

De par son implication dans le métabolisme de l'ornithine et de la glutamine, la proline peut être impliquée dans la synthèse de citrulline. La conversion de la proline en glutamate ou en ornithine via la formation du P5C a été démontrée dans les tissus de mammifères *in*

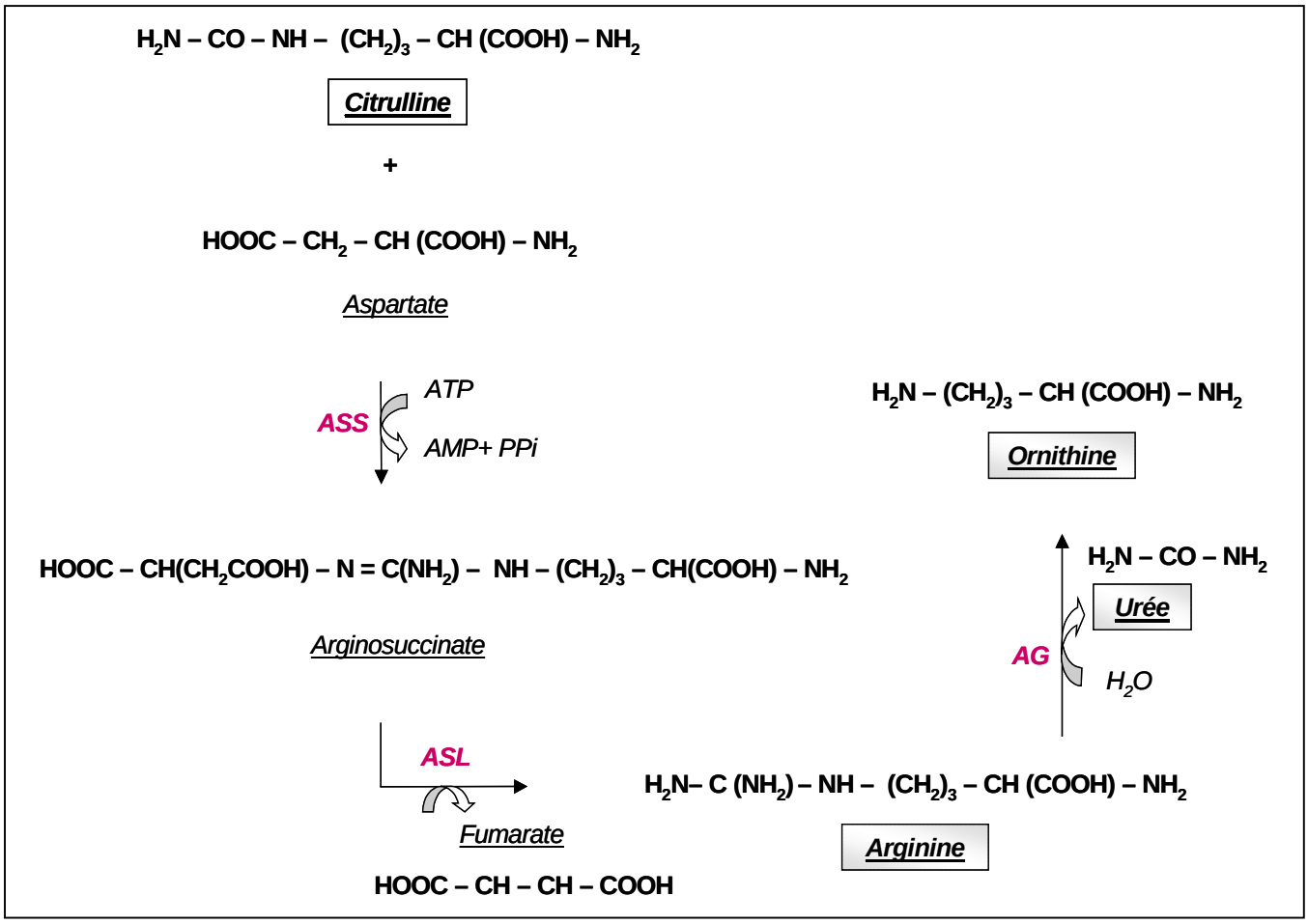

Figure 11. Principales voies de dégradation de la citrulline.

Légende : ASS : argino-succinate synthase, ASL : argino-succinate lyase, AG : arginase.

vivo et *in vitro* [1, 101, 210]. Sous l'action de la proline oxydase (PO), une enzyme mitochondriale liée à la membrane interne [43, 142], la proline est transformée en une molécule de P5C. Cette dernière peut être convertie en glutamate ou en ornithine. La conversion de la P5C en glutamate est catalysée par la pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase (P5CD) de localisation à la fois cytosolique et mitochondriale [280] et la conversion de la P5C en ornithine qui a été mise en évidence dans le foie et les reins de mammifère [143] est catalysée par l'enzyme mitochondriale ornithine amino transférase (OAT). Cette seconde voie de conversion est une voie mineure de dégradation de la proline. Dans l'intestin, les activités PO et P5CD sont faibles. Ainsi, la conversion de la proline en glutamate est quasi inexistante dans ce tissu [144]. En revanche, l'intestin, tissu cible de la glutamine, convertit le glutamate en proline. L'activité de l'enzyme cytosolique pyrroline-5-carboxylate réductase (P5CR) est importante. Dans le foie, les activités enzymatiques transformant la proline en P5C, et la P5C en ornithine sont élevées. Par ailleurs, les concentrations élevées en P5CD indiquent que la synthèse de glutamate à partir de P5C est importante dans le foie. Par contre, la réaction inverse est peu importante car l'activité de l'enzyme pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) liée à la membrane mitochondriale interne est faible [143].

III. 2. 2. Voies de dégradation de la citrulline

La citrulline est utilisée dans deux principales voies métaboliques : 1) la synthèse *de novo* d'arginine et 2) la synthèse d'urée intra-hépatique **(Figure 11)**.

◈ *Synthèse* de novo *d'arginine*

La conversion de la citrulline en arginine implique deux enzymes cytosoliques : l'argino-succinate synthase (ASS) et l'argino-succinate lyase (ASL). Ces deux enzymes sont retrouvées chez l'homme, dans le cytosol des hépatocytes, des entérocytes, des cellules rénales et des cellules possédant la NOS. Sous l'action de l'ASS, la citrulline se condense avec une molécule d'aspartate pour former une molécule d'arginosuccinate (AS), avec consommation de deux liaisons phosphates riches en énergie d'une molécule d'ATP. L'AS est clivée par l'ASL pour donner une molécule d'arginine et de fumarate.

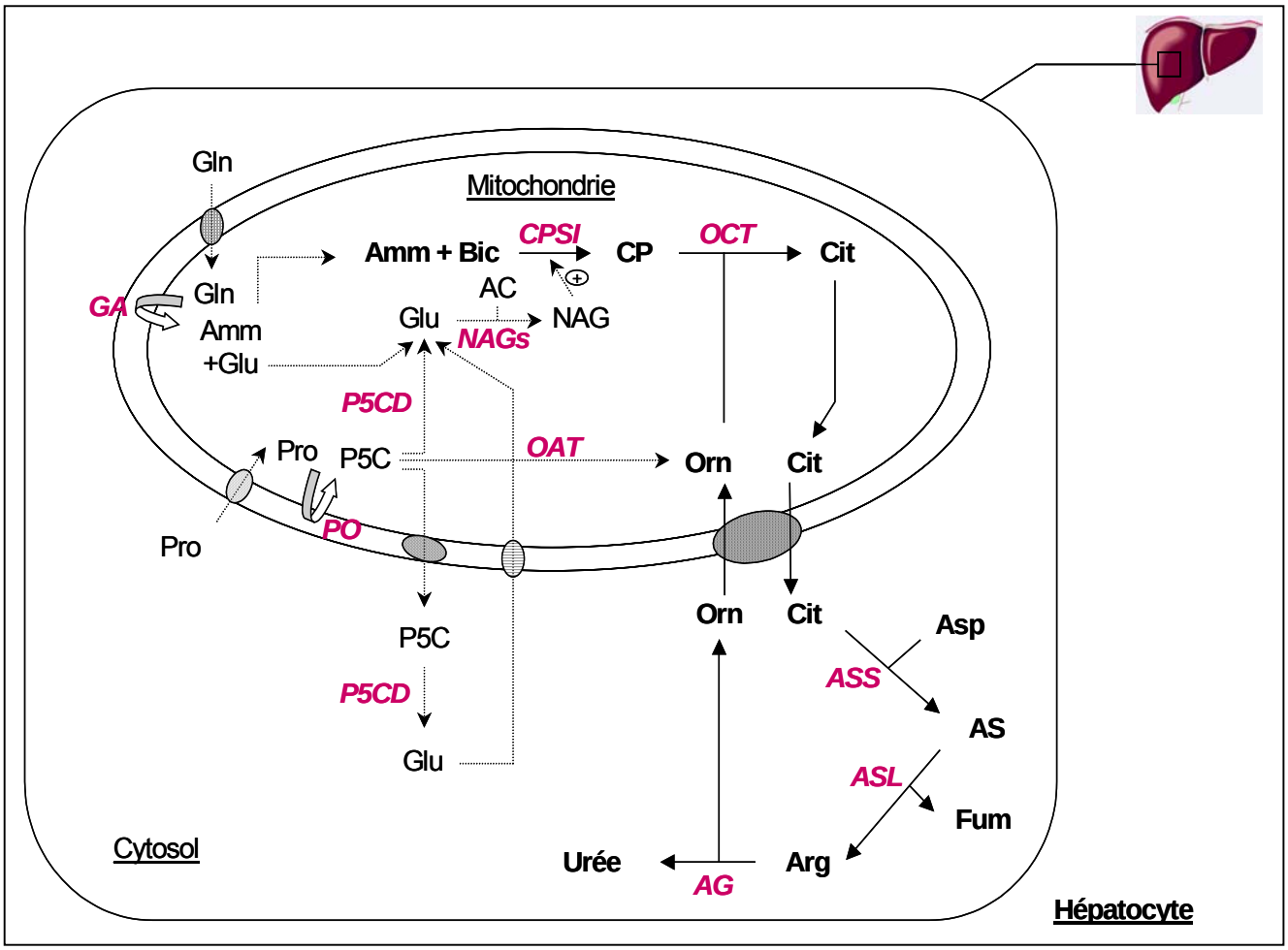

Figure 12. Le foie : Un tissu producteur et utilisateur de citrulline.

Légende : CPSI : carbamyl phosphate synthase de type I, OCT : ornithine carbamyl transférase, GA : glutaminase, P5CD : pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase, NAGs : N-acétyl glutamate synthase, OAT : ornithine amino transférase, PO : proline oxydase, ASS : argino-succinate synthase, ASL : argino-succinate lyase, AG : arginase, Gln : glutamine, Glu : glutamate, NAG : N-acétyl glutamate, Amm : ammoniaque, Pro : proline, P5C : pyrroline-5-carboxylate, Orn : ornithine, Bic : bicarbonate, CP : carbamyl phosphate, Cit : citrulline, Asp : aspartate, AS : argino-succinate, Fum, fumarate, Arg : arginine.

◈ *Synthèse d'urée*

La conversion de la citrulline en urée utilise les deux enzymes cytosoliques ASS et ASL, et fait intervenir une troisième enzyme cytosolique, l'arginase (AG). Cette enzyme est présente dans le cytosol des hépatocytes (Arginase de type I) et des entérocytes (Arginase de type II). Quel que soit le type d'arginase (I ou II), cette enzyme réalise l'hydrolyse de l'arginine pour former une molécule d'urée et d'ornithine. L'urée est éliminé dans les urines, tandis que l'ornithine réalimente le cycle de l'urée.

III. 2. 3. Le foie : Tissu producteur et utilisateur de citrulline

Dans le foie, la citrulline est un intermédiaire métabolique impliqué dans l'élimination d'un composé toxique, l'ammoniaque, en un autre non toxique, l'urée. Le foie est le seul tissu permettant la synthèse d'urée à partir d'ammoniaque (Cycle de l'urée) **(Figure 12)**, car lui seul, possède les enzymes CPSI, NAGs, OCT, ASS, ASL et AG. La citrulline est synthétisée dans la matrice mitochondriale des hépatocytes à partir de l'ammoniaque mais également à partir de la glutamine, du glutamate, de la proline et de l'ornithine selon les réactions décrites dans les chapitres précédents. La synthèse *de novo* d'ornithine ne semble pas exister dans les mitochondries de ces cellules, bien qu'une synthèse ait été rapportée dans des hépatocytes isolés. L'ornithine cytosolique rejoint la matrice mitochodriale des hépatocytes, par un système de transport assurant un échange équimolaire avec la citrulline. La citrulline formée dans la matrice mitochondriale des hépatocytes rejoint le cytosol où elle subira l'action des enzymes ASS, ASL et AG pour former une molécule d'urée et d'ornithine. L'urée ainsi formée, rejoint la circulation sanguine pour être ensuite éliminée dans les urines, tandis que l'ornithine réalimentera le cycle de l'urée. Dans des conditions normales, le foie est incapable d'exporter la citrulline dans la circulation sanguine [332]. Dans ce tissu, le métabolisme de la citrulline est strictement compartimenté et n'est pas relié avec les autres voies métaboliques impliquant la citrulline [67].

A court terme, la synthèse de la citrulline hépatique dépend de deux facteurs : d'une part, de l'activité de la CPSI et d'autre part, de la disponibilité en ornithine. L'activité intra-mitochondriale de la CPSI semble être régulée 1) par la concentration de deux de ses substrats : l'ATP et l'ammoniaque ; 2) par la concentration en NAG, son activateur

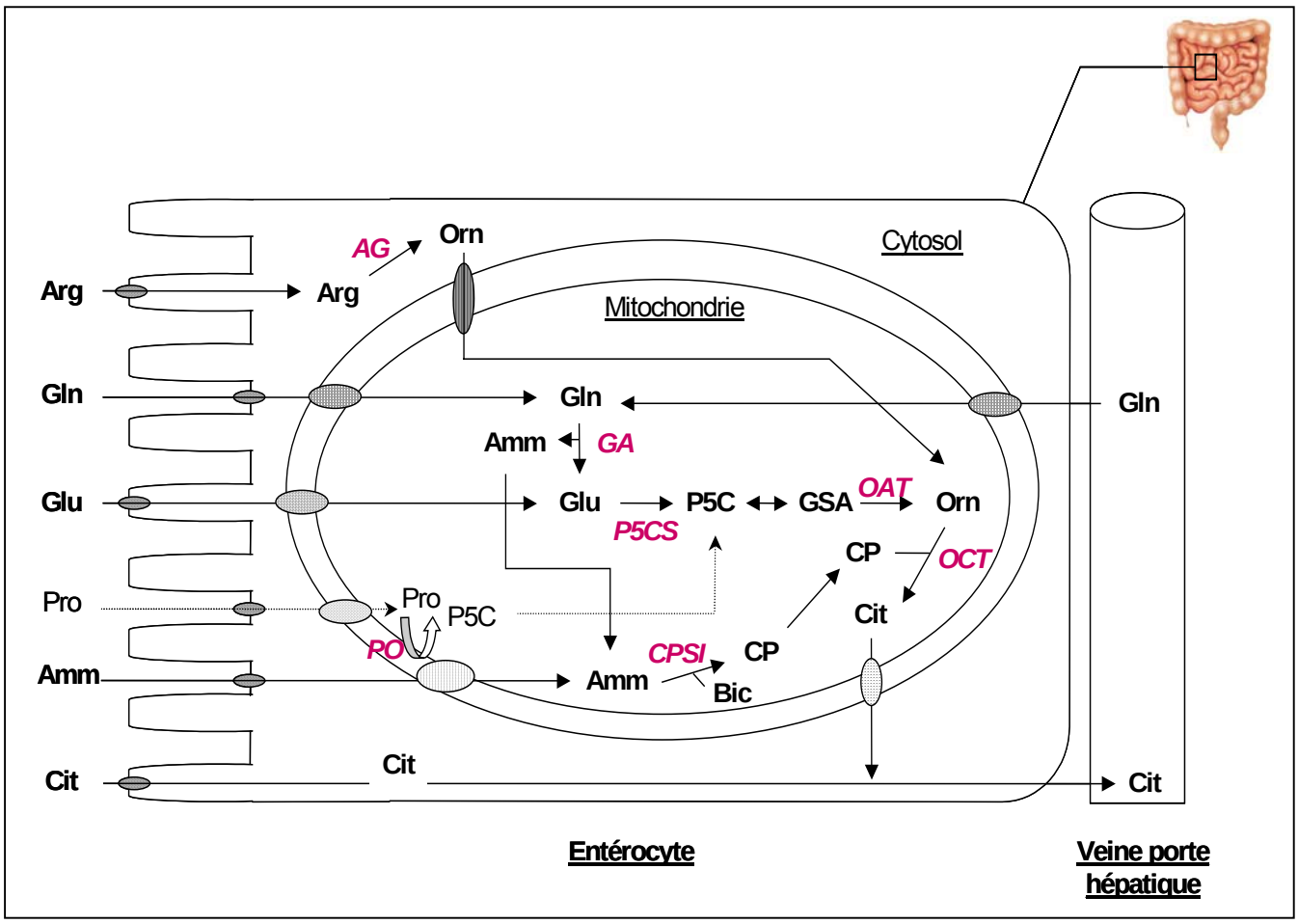

Figure 13. L'intestin : Principal tissu producteur de citrulline.

Légende : AG : arginase, GA : glutaminase, CPSI : carbamyl phosphate synthase de type I, OAT : ornithine amino transférase, OCT : ornithine carbamyl transférase, P5CS: pyrroline-5-carboxylate synthase, PO : proline oxydase, Arg : arginine, Gln : glutamine, Glu : glutamate, Pro : proline, Amm : ammoniaque, Cit : citrulline, Orn : ornithine, P5C : pyrroline-5-carboxylate, GSA : glutamate semi-aldéhyde, Bic : bicarbonate, CP : carbamyl phosphate.

allostérique et 3) par la présence de certains acyls CoA. De nombreux auteurs suggèrent que l'ornithine aurait un effet direct sur l'activité de la CPSI. En réalité, l'ornithine régulerait la synthèse de la citrulline via la modulation intra-mitochondriale de l'activité de l'OCT.

III. 2. 4. L'intestin : Tissu producteur de citrulline

L'intestin est le principal site de synthèse de la citrulline circulante. Dans cet organe, la citrulline est essentiellement produite à partir de la glutamine et du glutamate, et dans une moindre mesure à partir de l'ammoniaque, de la proline et de l'arginine [68]. Les acides aminés cités précédemment sont apportés par l'hydrolyse des protéines alimentaires dans la lumière intestinale ou extraits de la circulation sanguine (cas de la glutamine) **(Figure 13)**. La glutamine circulante provient de la protéolyse (30% du flux de la glutamine) ou d'une synthèse *de novo*. En effet, l'organisme est capable de synthétiser de la glutamine, et ce, principalement au niveau du muscle squelettique et dans une moindre mesure, au niveau du cerveau, du tissu adipeux, du tissu cardiaque et des poumons. Les entérocytes métabolisent entre 25 et 33% de la glutamine artérielle, 66% de la glutamine luminale et 96% du glutamate luminal [337]. Les études pionnières de Windmueller et Spaeth ont rapporté que la citrulline constituait un des produits finaux du métabolisme de la glutamine intestinal et que 30% de l'azote α-aminé de la glutamine métabolisé dans l'intestin se retrouvait dans la citulline [333]. La citrulline intestinale ne peut pas être utilisée *in situ*, car l'activité des deux enzymes qui la catabolisent (ASS et ASL) est très faible dans l'intestin [131, 320]. Par conséquent, la citrulline intestinale est relarguée comme telle dans la circulation sanguine. La citrulline circulante sera principalement captée par les reins et dans une moindre mesure, par les cellules contenant la NOS (cellules endothéliales, lymphocytes, macrophages ou cellules nerveuses) pour être transformée en arginine [55, 332]. En revanche, le foie ne semble pas capable de capter la citrulline circulante en condition physiologique [332]. Cependant, deux récentes études réalisées chez l'homme adulte malade (i.e. cas de cancer colorectal et de maladies malignes gastro-intestinales) ont montré que le foie était capable de capter la citrulline circulante [307, 308]. La question se pose de savoir si ce résultat peut être transposé chez l'homme sain ?

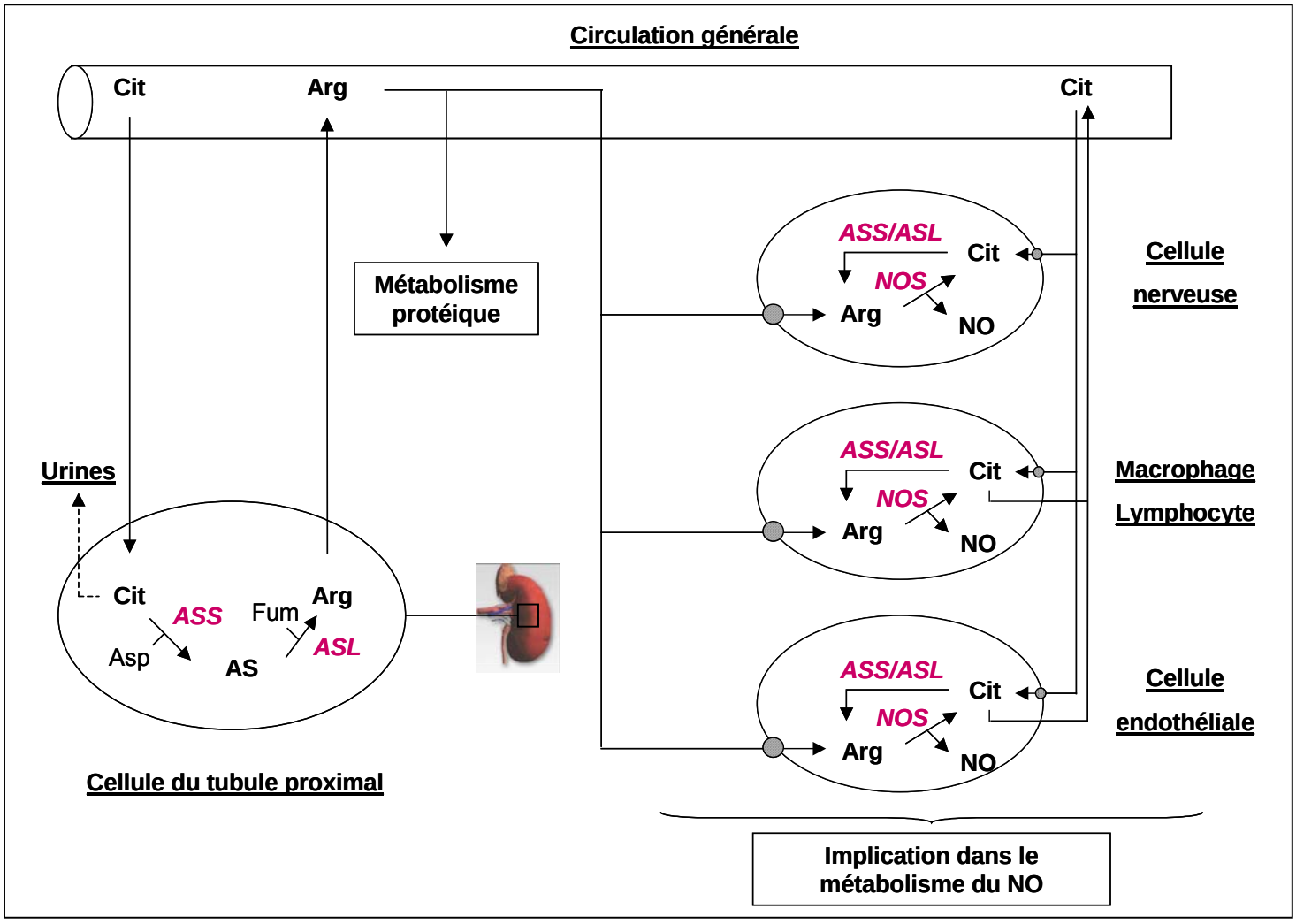

Figure 14. Les reins et cellules possédant la NOS : Tissus utilisateurs de citrulline.

Légende : ASS : argino-succinate synthase, ASL : argino-succinate lyase, NOS : monoxyde d'azote synthase, Cit : citrulline, Asp : aspartate, AS : argino-succinate, Arg : arginine, NO : monoxyde d'azote.

III. 2. 5. Les reins : Tissus utilisateurs de citrulline

En condition physiologique, le rein semble être le seul organe capable, de transformer quantitativement la citrulline circulante en arginine **(Figure 14)**. Environ 83% de la citrulline libérée par l'intestin est métabolisé par les reins, représentant 35% de la citrulline circulante [332]. La conversion de la citrulline en arginine a lieu au niveau des cellules du tubule proximal [82, 179] et fait intervenir les enzymes cytosoliques ASS et ASL. Le fait que l'arginine soit produite au niveau des cellules du tubule proximal a son importance, car l'arginine pourra être aussitôt réabsorbé par ces cellules et libérée dans la veine rénale, et donc dans la circulation générale. L'arginine synthétisé à partir de la citrulline représente 60% de la synthèse *de novo* d'arginine dans l'organisme, mais seulement 5 à 15% de la citrulline circulante [220]. Le taux de synthèse de l'arginine va dépendre essentiellement de la quantité de citrulline relarguée par l'intestin [82].

L'arginine ainsi produite par les reins sera impliquée dans divers voies métaboliques où elle sert non seulement de précurseur pour la synthèse protéique, mais également de précurseur pour la synthèse de NO [54], de polyamines [21, 70], de créatine [244] et d'agmatine [220]. Par ailleurs, l'arginine stimule les sécrétions d'hormones tels que l'insuline, la prolactine, le glucagon [21, 70, 317] et joue un rôle clé dans l'homéostasie azotée en modulant l'uréogénèse [69].

Le cycle inter-organe « arginine-citrulline-arginine » est un moyen pour l'organisme de protéger l'arginine alimentaire contre toute dégradation excessive par le foie en urée et ornithine, via l'activité de l'arginase hépatique [76] et de réguler correctement l'uréogénèse, suivant la consommation en protéines. La citrulline pourrait maintenir l'homéostasie protéique du corps humain, spécialement dans des situations où la consommation en protéines est faible [320].

III. 2. 6. Les autres tissus utilisateurs de citrulline

D'autres tissus, tels que les cellules nerveuses, les lymphocytes, les macrophages ou encore les cellules endothéliales sont capables de capter de façon non significative la

Tableau 10. Variations des concentrations de citrulline plasmatique [Cit_p] chez l'homme, en condition pathologique.

Références	Populations	Effectifs					[Cit_p] (µM)					*p*
		SGC	MC	TI	R	Sains	SGC	MC	TI	R	Sains	
Crenn 2000 [65] [France]	Adultes	57	-	-	-	51	20 ± 13[a]	-	-	-	40 ± 10	*<0,001*
Rhoads 2005 [253] [Etats-Unis]	Enfants	24	-	-	-	21	18,1 ± 2,3	-	-	-	31 ± 2	*<0,05*
Jianfeng 2005 [139] [Chine]	Enfants/Adultes	22	-	-	-	33	5,94 ± 2,65	-	-	-	16,8 ± 5,97	*<0,001*
Crenn 2003 [64] [France]	Adultes	-	42	-	-	51	-	24 ± 13	-	-	40 ± 10	*<0,001*
Papadia 2007 [241] [Angleterre]	Adultes	27	6	-	-	6	(3,9-34,0)[b] *	(15,0-39,6)	-	-	(22,8-41,9)*	**< 0,05*
Pappas 2002 [242] [Etats-Unis]	Enfants/Adultes	-	-	7	-	-	-	-	(12,5-28,2)	-	-	*nd*
Gondolesi 2002 [115] [Etats-Unis]	nd	-	-	9	-	-	-	-	17,5 ± 13,3	-	-	*nd*
Blijlevens 2004 [35] [Pays-Bas]	Adultes	-	-	-	32	-	-	-	-	(9,9-14,5)	-	*nd*
Lutgens 2005 [188] [Pays-Bas]	Adultes	-	-	-	23	-	-	-	-	23,6 ± 2,4	-	*nd*

Légende : SGC : Syndrome du grêle court, MC : Maladie coeliaque, TI : Transplantation intestinale, R : Radiothérapie. Les valeurs de citrulline plasmatique sont exprimées en [a]moyenne ± écart-type ou en [b]intervalle entre les valeurs minimales et maximales.

citrulline relarguée par l'intestin (environ 17% de la citrulline relarguée), pour régénérer *in situ* l'arginine **(Figure 14)**.

III. 3. Variations des taux de citrulline plasmatique

III. 3. 1. En condition non pathologique

Quelques rares études ont rapporté que l'âge avait une influence sur la concentration de citrulline plasmatique qui est plus faible chez les enfants et nouveau-nés que chez l'adulte **(Tableau 8)**. Par ailleurs, les travaux de Rabier *et al.* ont rapporté chez l'homme que la citrullinémie diminuait légèrement après la prise d'un repas riche en protéines et revenait au niveau de base quatre heures plus tard [248].

III. 3. 2. En condition pathologique

Les taux de citrulline plasmatique résultent de la différence entre la synthèse intestinale et l'utilisation rénale. Les taux de citrulline plasmatique augmentent dans toutes les situations où sa transformation en urée ou en arginine est diminuée [248]. Ces modifications peuvent résulter 1) d'un déficit enzymatique en ASS, ASL ou arginase ; 2) d'un défaut du transporteur de la lysine (intolérance aux protéines avec lysinurie) ; 3) d'une insuffisance rénale chronique ou 4) d'une défaillance hépatocellulaire. A l'inverse, la diminution de la citrulline plasmatique peut être liée à une synthèse défectueuse de la citrulline. La diminution de la synthèse de citrulline reflète soit une moindre activité d'une des enzymes mitochondriales contrôlant sa synthèse intestinale à partir de la glutamine (CPSI, OCT, NAGs, P5CS), soit une destruction de la muqueuse intestinale [248]. Le **tableau 10** illustre quelques exemples où la citrulline plasmatique est diminuée en condition pathologique (syndrome du grêle court, maladie coeliaque, transplantation intestinale, thérapies radio-induites).

Tableau 11. La citrulline plasmatique [Cit_p] : Un marqueur de masse et de fonctionnement intestinal chez l'homme.

Références	Populations	Cut-off [Cit_p] (µM)	Diagnostic du test	Précision du test			
				Se (%)	Sp (%)	VPP (%)	VPN (%)
Crenn 2000 [65] [France]	Adultes	30	Sains *versus* SGC	77	75	76	77
		20	SGC/TIPP *versus* SGC/TIT	92	90	95	86
Rhoads 2005 [253] [Etats-Unis]	Enfants	19	SGC/NP- *versus* SGC/NP+	94	67	-	-
Crenn 2003 [64] [France]	Adultes	30	Sains *versus* MC/AVP	70	80	41	93
		20	MC/LMDP *versus* MC/LMND	95	90	88	96
		10	MC/LMDD *versus* MC autres	90	100	100	98
Papadia 2007 [241] [Angleterre]	Adultes	23	Sains *versus* Pathologies intestinales	88	72	-	-
		12	IF/PI (long. < 50 cm) *versus* INF/PI (long. < 50 cm)	95	96	-	-
		21	PI/NP- *versus* PI/NP+	83	87	-	-

Légende : SGC : Syndrome du grêle court, TIPP : Troubles intestinaux permanents persistants, TIT : Troubles intestinaux transitoires, MC : Maladie coeliaque, NP- : Absence de sevrage de la nutrition parentérale, NP + : Sevrage de la nutrition parentérale, LMDP : Lésions mucosales destructrices proximales, LMND : Lésions mucosales non destructrices, LMDD : Lésions mucosales destructrices diffuses, PI : Pathologies intestinales, IF : Intestin grêle fonctionnel, INF : Intestin grêle non fonctionnel.

III. 4. Intérêt de la citrulline

III. 4. 1. Un index de fonctionnement rénal

En condition physiologique, le rein semble être le seul organe capable, de transformer quantitativement la citrulline circulante en arginine. Par conséquent, toute défaillance rénale pourra être associée avec une hypercitrullinémie. En effet, Levillain *et al.* ont montré chez des rats ayant subi différents degrés de néphrectomie que la citrulline plasmatique était corrélée avec le degré d'insuffisance rénale [179]. Par ailleurs, chez l'homme, Ceballos *et al.* ont rapporté que la citrulline plasmatique augmentait avec la progression de la défaillance rénale et qu'il y avait une bonne corrélation entre la citrulline et la créatinine plasmatique [56]. Ces résultats suggèrent que, chez des sujets ayant une fonction intestinale normale, la citrulline plasmatique pourrait être un bon marqueur du fonctionnement rénal et spécialement du fonctionnement des cellules du tubule proximal.

III. 4. 2. Un index de masse et de fonctionnement intestinal

De récentes études menées chez l'homme suggèrent que la citrulline plasmatique pourrait être utilisée comme un index de masse et de fonctionnement de l'intestin grêle **(Tableau 11)**.

◈ Chez des patients atteints du syndrome du grêle court

Chez des adultes atteints de syndrome du grêle court (i.e. longueur de l'intestin grêle résiduel <150 cm, après résection étendue), Crenn *et al.* ont montré que la citrulline plasmatique (Cit_p) était corrélée non seulement avec la longueur résiduelle de l'intestin grêle mais également avec sa capacité à absorber les graisses [65]. Par ailleurs, ces auteurs ont montré que le dosage de la citrulline plasmatique pouvait servir de test permettant de différencier parmi les patients atteints de syndrome du grêle court (SGC), ceux qui présentent une insuffisance intestinale définitive (persistant deux ans après la résection intestinale) de ceux qui ont une insuffisance intestinale transitoire et une adaptation de l'intestin grêle

résiduel suffisante pour être sevrés de nutrition intraveineuse deux ans après la résection **(Tableau 11)**.

Les travaux de Rhoads *et al.* [253] menés chez des enfants atteints du SGC sont en accord avec ceux obtenus par Crenn *et al.* [65]. Dans cette étude, la citrulline plasmatique était corrélée avec la longueur résiduelle de l'intestin grêle mais également avec le % des calories entérales tolérées. Ces derniers auteurs ont montré que le dosage de la citrulline plasmatique pouvait servir de test pour différencier les enfants atteints du SGC qui peuvent être sevrés de la nutrition parentérale de ceux qui ne peuvent pas l'être **(Tableau 11)**.

Les travaux de Jianfeng *et al.* [139] menés chez des enfants et adultes atteints du SGC vont dans le même sens que ceux précédemment décrits. La citrulline plasmatique était corrélée avec la longueur et la surface résiduelle de l'intestin grêle. Dans cette étude, la citrulline plasmatique était également corrélée avec l'excrétion urinaire de D-xylose, marqueur de la fonction d'absorption du grêle, et avec la capacité digestive à absorber les protéines.

De même, chez des adultes SGC, Papadia *et al.* ont récemment rapporté que la citrulline plasmatique était positivement corrélée avec la longueur résiduelle de l'intestin grêle et avec l'excrétion urinaire de D-xylose [241]. Par ailleurs, dans cette étude, la citrulline plasmatique n'était pas corrélée avec l'inflammation intestinale et la perméabilité intestinale, mais était négativement corrélée avec la nécessité d'une nutrition parentérale. Ces auteurs ont montré que le dosage de la citrulline plasmatique pouvait servir pour différencier les sujets sains d'adultes présentant des pathologies intestinales (p. ex. Crohn, Maladie coeliaque), mais également parmi les adultes présentant des pathologies intestinales, différencier 1) ceux ayant un intestin grêle fonctionnel de ceux ayant un intestin grêle non fonctionnel et 2) ceux pouvant être sevrés de la nutrition parentérale de ceux ne pouvant pas l'être [241] **(Tableau 11)**.

Les travaux de Luo *et al.* [186] menés chez des adultes atteints du SCG ont rapporté que la citrulline plasmatique était positivement corrélée avec la longueur résiduelle de l'intestin grêle et constituait un indicateur de la longueur de l'intestin grêle chez ces patients. Cependant, contrairement aux études précédentes [65, 139, 253], ces auteurs n'ont mis en

évidence aucune corrélation entre la citrulline plasmatique et la capacité digestive à absorber différents nutriments.

◈ *Chez des patients atteints de la maladie coeliaque*

Chez des adultes atteints de la maladie coeliaque (MC), Crenn *et al.* [64] ont rapporté que la citrulline plasmatique était corrélée avec la trophicité de la muqueuse intestinale. Dans cette étude, le dosage de la citrulline plasmatique a été proposé comme test pour différencier les sujets sains de patients atteints de la MC présentant une atrophie villositaire partielle, mais également les patients atteints de la MC ayant des lésions mucosales destructrices proximales de ceux ayant des lésions non destructrices et les patients atteints de la MC ayant des lésions mucosales destructrices diffuses des autres patients atteints de la MC. De plus, ces auteurs ont rapporté que le dosage de la citrulline plasmatique représentait le meilleur test biologique pour prédire l'atrophie villositaire **(Tableau 11)**.

◈ *Chez des patients ayant subi une transplantation intestinale*

Chez des patients ayant subi une transplantation intestinale, Gondolesi *et al.* [115] et Pappas *et al.* [242] ont montré que la citrulline plasmatique pouvait être utilisée comme un marqueur de la fonction du greffon intestinal. En effet, dans cette population, la citrulline plasmatique des patients ayant des biopsies intestinales fonctionnelles était significativement supérieure à celle associée à des biopsies intestinales dysfonctionnelles (19,3 ± 13,6 µM *versus* 7,8 ± 4,7 µM) et il existait une corrélation négative significative entre la citrulline plasmatique et le degré de rejet de greffe intestinale [115]. Pappas *et al.* ont rapporté chez des patients ayant reçu une greffe intestinale, que les concentrations de citrulline plasmatique diminuaient significativement avec le degré de rejet de greffe intestinale et par conséquent avec la masse entérocytaire non fonctionnelle [242].

◈ *Chez des patients ayant subi des lésions intestinales induites par radiothérapie*

Chez des patients ayant des lésions intestinales radio-induites, Lutgens *et al.* [188] ont montré que la citrulline était corrélée avec la perte cellulaire épithéliale. Par ailleurs, chez des patients atteints d'hémopathies malignes ayant reçu une thérapie myéloablative, la citrulline plasmatique était négativement corrélée avec les tests de perméabilité intestinale [35].

III. 4. 3. Un agent thérapeutique potentiel

Dans les situations caractérisées par une réduction de la masse intestinale active (syndrome du grêle court, maladie coeliaque, lésions intestinales induites par radiothérapie), le site principal de synthèse de la citrulline est grandement réduit. Différents auteurs ont rapporté que dans ces situations, les taux de citrulline et d'arginine circulants étaient significativement diminués [64, 65, 80, 239, 321], suggérant que l'arginine devenait un acide aminé essentiel. Dans ce contexte, la supplémentation avec de l'arginine serait une solution intéressante pour restaurer le pool d'arginine circulant. Cependant, le fait que l'arginine soit captée et fortement métabolisée par le foie remet en question cette stratégie thérapeutique. La citrulline pourrait être un bon candidat pour restaurer les taux d'arginine circulants, puisqu'elle sert de précurseur principal d'arginine et qu'elle échappe à la captation par le foie. Les travaux de Osowska *et al.* menés chez des rats ayant subi une résection intestinale massive (80%) confirment cette hypothèse [239]. En effet, en utilisant un modèle de rats ayant subi une résection intestinale massive, ces auteurs ont démontré que la supplémentation d'une alimentation entérale avec de la citrulline (1g/Kg/j) augmentait significativement le pool d'arginine circulant et ce, de façon plus efficace qu'une supplémentation isomolaire en arginine (1g/Kg/j) [239]. Par ailleurs, ils ont montré que cette supplémentation en citrulline restaurait la balance azotée.

Chez les personnes âgées dénutries, la masse protéique musculaire est réduite, et la synthèse protéique musculaire est insuffisamment augmentée en période post-prandiale, alors que le métabolisme des acides aminés dans l'aire splanchnique est augmenté, par rapport à de jeunes sujets adultes sains [38]. Cette importante extraction des acides aminés par le territoire splanchnique chez les personnes âgées conduit à des taux d'acides aminés circulants inadéquats en période post-prandiale. Comme l'hyperaminoacidémie (avec l'insuline) est

l'un des principaux facteurs stimulant la synthèse protéique musculaire, l'augmentation insuffisante des acides aminés plasmatiques en période post-prandiale entraînerait une altération de la synthèse protéique [240]. Avec l'utilisation d'acides aminés échappant à l'extraction splanchnique, il serait possible de délivrer des quantités plus adéquates d'azote aux tissus périphériques, en particulier le muscle, et par conséquent d'y augmenter la synthèse protéique. La citrulline semble être un bon candidat. Les travaux de Ducheman *et al.* et de Osowska *et al.* confirment cette hypothèse [88, 239]. En utilisant un modèle de rats âgés dénutris, Osowska *et al.* ont montré que la supplémentation de l'alimentation entérale en citrulline améliorait la synthèse protéique musculaire protéique (+90%) et le contenu protéique musculaire (+20%).

Les études menées récemment chez des rats montrent clairement que la supplémentation entérale en citrulline améliore dans des conditions spécifiques la balance azotée ainsi que le statut protéique [88, 238, 239]. La question se pose de savoir comment la citrulline, un acide aminé non incorporé dans les protéines peut stimuler la synthèse protéique musculaire? Moinard et Cynober suggèrent que la stimulation de la synthèse protéique par la citrulline pourrait se faire soit de façon indirecte, par la capacité de la citrulline à générer de l'arginine, stimulant la sécrétion d'insuline et d'hormone de croissance ou par le fait que la citrulline constitue un apport d'azote aux muscles, soit de façon directe, par le fait que la citrulline aurait un effet de signal stimulant la transduction [211]. Des résultats obtenus après l'incubation de muscle isolé chez le rat en présence de fortes concentrations de citrulline (2,5 mM) suggèrent que la citrulline serait capable de stimuler directement la synthèse protéique [214] et que son action ne serait pas reliée à la production d'autres acides aminés, puisque les profils d'acides aminés musculaires mis en évidence restaient inchangés après prise orale de citrulline [212]. Le mécanisme d'action impliquerait mTOR, une protéine-clé dans la régulation de la synthèse protéique [213].

Outre l'utilisation de la citrulline dans la résection inestinale et la dénutrition, la citrulline pourrait être utile sur le plan thérapeutique en cas de désordre du métabolisme du NO ou en cas d'hyper-ammoniémie [67].

IV. La calprotectine

La calprotectine, appelée initialement protéine leucocyte L1 a été isolée pour la première fois en 1980 dans des granulocytes [94]. Depuis sa découverte, elle a eu plusieurs noms incluant MRP8/MRP14 (MIF related protein) [234, 285], CFA (Cystic fibrosis associated antigen) [87, 331], calgranuline A/B [329], S100 a/S100 b [86, 87] ou encore S100 A8/S100 A9 [125]. Le terme calprotectine a été proposé en 1990, quand Steinbakk *et al.* lui découvrirent une activité antimicrobienne et une capacité à lier le calcium [290].

Les propriétés physico-chimiques de la calprotectine sont connues depuis le début des années 90 [93]. La calprotectine est une protéine de 36,5 kDa ayant la capacité de lier le zinc et le calcium [224, 250]. Cette protéine est un hétéro-trimère composé de deux chaînes lourdes de 14 kDa et d'une chaîne légère de 8 kDa, liées par des liaisons non covalentes [29, 73, 92]. La calprotectine est particulièrement résistante à la chaleur et à la protéolyse, en présence de calcium [92, 224].

La calprotectine est une protéine ubiquitaire. Elle a été retrouvée chez l'homme dans de nombreux types cellulaires (granulocytes neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules épithéliales, kératinocytes, lignées cellulaires pancréatiques, cellules glandulaires trachéales), tissus (peau, poumon, tube digestif, muqueuse orale, muqueuse utérine) et fluides biologiques (plasma, fluide cérébro-spinal, fluide oral, urine, selles, fluide synovial) [141]. Elle est essentiellement présente au niveau des myélomonocytes et des kératinocytes. Dans le cytosol des granulocytes neutrophiles (GN), la calprotectine est abondante (5-15 mg/mL), représentant 5% des protéines totales et 60% des protéines cytosoliques [30, 94].

La calprotectine possède de nombreuses fonctions biologiques incluant par exemple, sa capacité à s'associer aux structures du cytosquelette [58, 152], son implication dans la transduction du signal intracellulaire [58, 119], ses propriétés antimicrobienne et antiprolifférative [40, 141, 187, 208, 282, 283, 290], sa capacité à réguler les processus inflammatoires [42, 285] ou encore sa capacité à réguler l'apoptose [132, 345].

Plusieurs auteurs ont rapporté que la calprotectine exerçait des propriétés antimicrobienne et antiprolifférative *in vitro* et *in vivo* [40, 141, 187, 208, 282, 283, 290]. Par exemple, Steinbakk *et al.* ont montré que la calprotectine à des concentrations comprises entre 4 et 128

mg/L inhibait *in vitro* la croissance des germes *Candida spp* et *Cryptococcus neoformans* et, inhibait également *in vitro* la croissance de germes tels que *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* à des concentrations comprises entre 64 et 256 mg/L [290]. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que cette protéine avait des propriétés antifongiques lorsque sa concentration était 2 à 4 fois supérieure à celle nécessaire pour inhiber la croissance de *Candida spp* et *Cryptococcus neoformans*. Sohnle *et al.* ont rapporté que la calpotectine inhibait efficacement la croissance de *Candida albicans* et qu'elle possédait une activité statique à l'égard de nombreux autres germes pathogènes, incluant *Aspergillus fugamitus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* [283]. D'après les données de la littérature, la calprotectine exercerait son activité antimicrobienne après avoir été libérée au niveau du site infecté par la lyse des granulocytes neutrophiles [318]. De par son affinité élevée à lier le zinc, elle inhiberait l'activité et la prolifération microbienne en diminuant les concentrations locales en zinc [40, 281, 282]. Ainsi, la calprotectine pourrait assurer la défense de l'hôte en contrôlant la croissance de micro-organismes pathogènes ayant échappé à la phagocytose par les neutrophiles.

De par son abondance dans le cytosol des granulocytes neutrophiles et de par ses propriétés intrinsèques, la calprotectine semble jouer un rôle central dans la régulation des processus inflammatoires [42, 285].

IV. 1. Méthodes d'analyse de la calprotectine fécale

Deux méthodes ont été proposées pour quantifier la calprotectine fécale [257, 304]. Dans le début des années 90, Roseth *et al.* ont développé une méthode d'extraction et de quantification de la calprotectine fécale [257]. De nombreuses études cliniques ont utilisé cette technique, rapportant une valeur diagnostique de la mesure de calprotectine fécale [141, 166, 202, 256]. Cependant, cette méthode manquait de sensibilité et présentait un risque élevé de contamination car la procédure d'extraction réalisée sur 5 g de selles comprenait une étape d'homogénéisation avec un mixeur mécanique en tube ouvert. Récemment, une nouvelle méthode (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italy) simplifiée utilisant entre 50 et 100 mg de selles et des tubes fermés a été développée par Ton *et al.* [304]. Ces auteurs ont montré clairement les avantages de cette nouvelle méthode avec un risque de contamination peu

élevé, une sensibilité améliorée et une bonne reproductibilité [304]. Par ailleurs, ils ont démontré que la meilleure efficacité de la procédure d'extraction dans cette nouvelle méthode, permettant d'extraire environ 78% [41-100%] de la calprotectine fécale totale et donnant des valeurs de calprotectine fécale cinq fois supérieures à celles obtenues par la méthode d'origine.

IV. 2. Variations de l'excrétion de la calprotectine fécale

IV. 2. 1. En condition non pathologique

Chez l'homme, l'excrétion de la calprotectine fécale semble varier en fonction de l'âge. Olafsdottir *et al.* ont rapporté que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez le nouveau-né à terme en bonne santé, par rapport à l'enfant plus âgé (278 ± 105 mg/kg de selles *versus* 40 ± 28 mg/kg de selles) [237]. De même, Rugtveit et Fagerhol ont montré chez des enfants sains que les concentrations de calprotectine fécale diminuaient significativement avec l'âge [260] : les taux de calprotectine chez des enfants sains âgés de six semaines étaient de 269 mg/kg de selles *versus* 49 mg/kg de selles chez des enfants sains âgés de 5 ans. Ces travaux ont été confirmés par Nissen *et al.* rapportant que les taux de calprotectine fécale étaient âge dépendants avec des taux chez le nouveau-né à terme sain (médiane : 235 µg/g de selles, [172-2880]) et chez le nouveau-né prématuré sain (médiane : 235 µg/g de selles, [81-221]) similaires et significativement plus élevés que ceux observés chez l'enfant sain (médiane : 17 µg/g de selles, [7-41]) [230].

Par ailleurs, chez le nouveau-né prématuré sans autre pathologie que la prématurité, les taux de calprotectine fécale rapportés dans le méconium (semaine 0) étaient significativement plus élevés que dans les selles post-méconium (semaine 1) (médiane : 332 µg/g de selles [12-9386] *versus* 190 µg/g de selles [9-942]) [145]. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que les taux de calprotectine fécale augmentaient significativement dans les selles post-méconium (de la semaine 1 à 8). Dans le méconium, la calprotectine fécale a été rapportée pour être corrélée négativement avec le poids de naissance [172], l'âge gestationnel [172], et l'apgar score à 5 et 10 minutes [145, 172]. Josefsson *et al.* ont montré que dans les selles post-méconium, la calprotectine fécale était corrélée positivement avec le mode d'accouchement

par césarienne et le volume de l'alimentation entérale (mL/kg/jour) et, était négativement corrélée avec la prise d'antibitotiques (céfotaxime, méropénème) et de corticostéroïdes (bétaméthasone). En revanche, Campeotto *et al.* n'ont pas observé de corrélation significative entre la calprotectine fécale dans les selles post-méconium et le poids de naissance [48].

IV. 2. 2. En condition pathologique

Différentes études menées chez l'homme ont rapporté que les taux de calprotectine fécale augmentaient significativement dans toutes les maladies caractérisées par une inflammation de la muqueuse gastro-intestinale.

Dans l'étude de Tibble *et al.* les taux de calprotectine fécale des patients adultes atteints de la maladie de Crohn (CD) étaient significativement plus élevés que ceux rapportés chez des adultes sains (médiane : 91,0 mg/L de selles *versus* 2,0 mg/L de selles) [300]. Dans une autre étude, Tibble *et al.* ont confirmé leur précédent résultat chez des adultes atteints de la maladie de Crohn (médiane : 122,0 mg/L de selles *versus* 10,0 mg/L de selles), et montré que les concentrations de calprotectine fécale chez des patients adultes atteints de rectocolite hémorragique (RH) étaient significativement supérieures à celles retrouvées chez des adultes témoins (médiane : 123,0 mg/L de selles *versus* 10,0 mg/L de selles) [301]. Depuis ces travaux, plusieurs équipes ont confirmé que la calprotectine fécale augmentait significativement chez des adultes atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et également chez des adultes ayant un cancer colorectal (CRC) [51, 60, 294]. Carroccio *et al.* ont montré que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez des adultes atteints de la maladie de Crohn (médiane : 320 µg/g de selles, [155-450]) que chez des adultes ayant des diarrhées organiques d'autres origines (médiane : 77,5 µg/g de selles, [15-400]) ou que chez des adultes atteints de syndrome de l'intestin irritable (IBS) (médiane : 35 µg/g de selles, [10-210]) [51]. Dans l'étude de Summerton *et al.* les taux de calprotectine fécale étaient significativement augmentés chez des adultes atteints de maladie de Crohn, de rectocolite hémorragique et de cancer colorectal (médiane : 32,7 mg/L de selles (CD), 53,4 mg/L de selles (RH), 53,5 mg/L de selles (CRC) *versus* 4,5 mg/L de selles (Témoin) et 6,1 mg/L de selles (IBS)) [294]. De même, Costa *et al.* ont rapporté que les taux de calprotectine fécale étaient également augmentés significativement chez des adultes atteints de maladie de Crohn, de rectocolite hémorragique et de cancer colorectal, comparés à

des adules sains et des adultes atteints du syndrome du côlon irritable (médianes respectives de : 231, 167 et 105 µg/g de selles pour Crohn, rectocolite hémorragique et cancer colorectal *versus* 11 µg/g de selles chez les témoins et 22 µg/g de selles chez des patients atteints du syndrome du côlon irritable) [61].

Les résultats décrits précédemment chez l'adulte ont été également retrouvés chez l'enfant. Depuis les travaux pionniers de Bunn *et al.* rapportant que la calprotectine fécale était significativement augmentée chez des enfants ayant une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) [44, 45], plusieurs auteurs ont confirmé ce résultat [41, 49, 50, 51, 90, 237]. Canani *et al.* ont montré que les taux de calprotectine fécale chez des enfants MICI étaient significativement plus élevés que chez des enfants sains [49, 50]. Ces mêmes auteurs ont rapporté que les concentrations de calprotectine fécale étaient du même ordre chez des patients atteints de la maladie de Crohn et rectocolite hémorragique, ce qui suggère que le dosage de la calprotectine fécale ne peut pas être utilisé chez l'enfant pour diagnostiquer le type de MICI [49]. Dans l'étude de Bremner *et al.* les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez des enfants MICI, comparés à des enfants sains (médiane : 336,6 µg/g de selles, [22,4-1596] *versus* <15,6 µg/g de selles, [<15,6-39]) [41]. De même, Fagerberg *et al.* ont montré chez des enfants MICI que les taux de calprotectine fécale étaient significativement supérieurs à ceux observés chez des enfants contrôle (médiane : 349 µg/g de selles *versus* 16,5 µg/g de selles) [90]. Par ailleurs, Carroccio *et al.* ont montré que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez des enfants ayant des diarrhées organiques (médiane : 45 µg/g de selles, [20-200]) que chez des enfants en bonne santé (médiane : 15 µg/g de selles, [10-40]) ou que chez des enfants atteints de syndrome de l'intestin irritable (médiane : 20 µg/g de selles, [10-30]) [51]. Ces mêmes auteurs ont rapporté que les concentrations de calprotectine fécale étaient significativement plus élevées chez des enfants atteints de la maladie de Crohn (médiane : 260 µg/g de selles, [160-350]) que chez des enfants ayant des diarrhées organiques ou chez des enfants atteints de syndrome de l'intestin irritable.

Par ailleurs, Carroll *et al.* ont rapporté que les taux de calprotectine fécale chez le nouveau-né prématuré présentant une entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) étaient significativement plus élevés que chez le nouveau-né prématuré indemne d'ECUN (moyenne : 288 ± 49 mg/L de selles [210-340] *versus* 98 ± 60 mg/L de selles [22-171]) [52]. Les travaux récents de Josefsson *et al.* [145] ont confirmé ces résultats, mais ces auteurs

Tableau 12. Intérêt de la calprotectine fécale (Adapté d'après von Roon *et al.* [319]).

Populations étudiées							Type d'étude	Diagnostic	Références
Age	Effectifs								
	CD	RH	MICI	CRC	IBS	Contrôle			
Enfants (12,2 ans)[a]	17	10	-	-	-	18	Rétrospective	Diagnostic primaire	Canani 2006 [49] [Italie]
Enfants (4-17 ans)[b]	-	-	22	-	-	14	Prospective	Diagnostic primaire	Fagerberg 2005 [90] [Suède]
Enfants (4-17 ans)	29	14	-	-	-	7	Rétrospective	Diagnostic primaire Diagnostic de l'activité de RH/CD	Bremner 2005 [41] [Etats-Unis]
Adultes	-	-	39	-	40	40	Prospective	Diagnostic primaire	Silberer 2005 [277] [Allemagne]
Adultes	-	31	-	-	-	-	Prospective	Diagnostic de l'activité de RH	Langhorst 2005 [175] [Allemagne]
Adultes (19-51 ans)	35	-	-	-	-	-	Prospective	Diagnostic de l'activité de CD	Gaya 2005 [110] [Angleterre]
Adultes	38	41	-	-	-	-	Prospective	Diagnostic de rechute	Costa 2005 [60] [Italie]
Enfants (1-18 ans)	68	45	-	-	-	76	Prospective	Diagnostic primaire	Canani 2004 [50] [Italie]

Légende : CD : Maladie de Crohn, RH : Rectocolite hémorragique, MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin, [d]CRC : Cancer colorectal, IBS : Syndrome de l'intestin irritable. L'âge est exprimé en [a]moyenne ou en [b]intervalle entre les valeurs minimales et maximales.

Tableau 12 (suite). Intérêt de la calprotectine fécale (Adapté d'après von Roon *et al.* [319]).

Populations étudiées							Type d'étude	Diagnostic	Références
Age	Effectifs								
	CD	RH	MICI	CRC	IBS	Contrôle			
Enfants (3,5 ans)[a]	8	-	-	-	15	10	Prospective	Diagnostic primaire	Carroccio 2003 [51]
Adultes (35 ans)	10	-	-	3	40	10		Diagnostic de l'activité de RH/CD	[Italie]
Adultes (46,3 ans)	49	82	-	26	48	34	Prospective	Diagnostic primaire Diagnostic de l'activité de RH/CD	Costa 2003 [61] [Italie]
Adultes	4	10	-	8	7	28	Prospective	Diagnostic primaire	Summerton 2002 [294] [Angleterre]
Adultes (50-75 ans)[b]	-	-	-	5	-	114	Prospective	Diagnostic primaire	Kristinsson 2001 [166] [Norvège]
Enfants (1,5-16,5 ans)	21	16	-	-	-	31	Prospective	Diagnostic primaire	Bunn 2001 [44] [Angleterre]
Enfants (2,3-15,4 ans)	-	-	36	-	-	-	Prospective	Diagnostic activité MICI	Bunn 2001 [45] [Angleterre]
Adultes	43	37	-	-	-	-	Prospective	Diagnostic de rechute	Tibble 2000 [301] [Angleterre]
Adultes	31	-	-	2	159	-	Prospective	Diagnostic primaire	Tibble 2000 [300]
	116	-	-	-	-	56			[Angleterre]
Adultes	-	-	-	53	-	64	Prospective	Diagnostic primaire	Roseth 1993 [256] [Norvège]

Légende : CD : Maladie de Crohn, RH : Rectocolite hémorragique, MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin, CRC : Cancer colorectal, IBS : Syndrome de l'intestin irritable. L'âge est exprimé en [a]moyenne ou en [b]intervalle entre les valeurs minimales et maximales.

Tableau 13. La Calprotectine fécale : Un marqueur de l'inflammation intestinale chez l'homme.

Calprotectine fécale						Références
Diagnostic primaire	Valeur cut-off	Précision				
		Se (%)	Sp (%)	VPP(%)	VPN(%)	
MICI *versus* sains	100 µg/g	93	89	93	89	Canani 2006 [49] [Italie]
MICI *versus* sains	50 µg/g	95	93	95	93	Fagerberg 2005 [90] [Suède]
CD avec inflammation *versus* CD sans inflammation	100 µg/g	80	67	87	60	Gaya 2005 [110] [Angleterre]
MICI actif *versus* Sains ou Désordres intestinaux fonctionnels	100 µg/g	73	98	98	73	Canani 2004 [50] [Italie]
CD *versus* IBS (adultes)	50 µg/g	64	80	70	74	Carroccio 2003 [51]
CD *versus* IBS (enfants)	50 µg/g	70	93	96	56	[Italie]
Désordres intestinaux fonctionnels *versus* désordres intestinaux organiques	50 µg/g	83	82	90	71	Costa 2003 [61] [Italie]
CD *versus* IBS	30 mg/L	100	97	-	-	Tibble 2000 [300] [Angleterre]

Légende : Se : Sensibilité, Sp : Spécificité, VPP : Valeur prédictive positive, VPN : Valeur prédictive négative, MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin, CD : Maladie de Crohn, IBS : Syndrome de l'intestin irritable.

trouvaient chez leurs prématurés des taux de calprotectine fécale très supérieurs à ceux rapportés par Carroll *et al.* [52].

L'augmentation de la calprotectine fécale observée lors des maladies intestinales inflammatoires pourrait refléter une augmentation de la migration des granulocytes neutrophiles à travers la barrière intestinale [255, 300]. Roseth *et al.* ont rapporté qu'il existait une forte corrélation entre l'excrétion de la calprotectine fécale et l'excrétion de granulocytes marqués au ^{111}indium ($r=0,087$; $p<0,0001$) [255]. De même, Tibble *et al.* ont montré chez des patients CD que la calprotectine fécale était fortement corrélée avec l'excrétion des granulocytes marqués au ^{111}indium ($r=0,80$; $p<0,001$) [300].

IV. 3. Intérêt de la calprotectine fécale

Un certain nombre d'études a évalué la sensibilité et la spécificité de la calprotectine fécale dans le diagnostic des maladies inflammatoires de l'intestin, de la néoplasie colorectale et du rejet de greffe intestinal.

IV. 3. 1. Un index de l'inflammation intestinale

De récentes études menées chez l'enfant et l'adulte suggèrent que la calprotectine fécale pourrait être utilisée comme un marqueur de l'inflammation intestinale [319] **(Tableaux 12 et 13)**.

Le dosage de la calprotectine fécale pourrait servir de test pour : 1) détecter chez des enfants des inflammations colorectales [90], 2) différencier les adultes atteints de désordres intestinaux organiques de ceux ayant des désordres fonctionnels [61], 3) différencier des adultes atteints de la maladie de Crohn, d'adultes atteints de syndrome de l'intestin irritable [51, 300] ou d'adultes sains, 4) différencier des adultes atteints de la maladie de Crohn avec ou sans inflammation [110], 5) différencier des enfants CD, d'enfants IBS [51], 6) différencier des enfants atteints de MICI en poussée, d'enfants sains ou présentant des désordres intestinaux fonctionnels [50] et 7) diagnostiquer les rechutes des MICI [60, 301].

Par ailleurs, dans le cadre du diagnostic des maladies inflammatoires intestinales, la sensibilité de la calprotectine fécale apparaît être supérieure à celle de marqueurs sérologiques tels que la CRP (C-reactive protein), la vitesse de sédimentation globulaire, les anticorps ASCA (anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody), ANCA (perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody) et anti-OmpC (anti Escherichia coli outer membrane porin C antibody) [49, 91, 277, 300].

La sensibilité du dosage de la calprotectine fécale pour évaluer l'activité des maladies inflammatoires intestinales a été explorée par plusieurs équipes [41, 44, 51, 61, 110, 175]. Chez des adultes atteints de la maladie Crohn et de rectocolite hémorragique, Costa *et al.* ont montré que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez les patients dont la maladie était active, comparés à ceux dont la maladie était quiescente (médiane : 405 µg/g de selles *versus* 213 µg/g de selles (CD), 327 µg/g de selles *versus* 123 µg/g de selles (RH)) [61]. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont rapporté que la calprotectine fécale était significativement corrélée avec l'index d'activité CD et l'index d'activité RH. De même, Carroccio *et al.* ont rapporté chez des adultes CD que la calprotectine fécale était également corrélée significativement avec l'index d'activité de CD [51]. Cependant, ces mêmes auteurs n'ont pas trouvé chez des enfants CD, de corrélation significative entre la calprotectine fécale et l'index d'activité CD. Par ailleurs, Langhorst *et al.* ont montré chez des adultes RH que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez les patients avec RH active, comparés aux mêmes patients avec RH en rémission (médiane : 116,23 ± 182,29 mg/mL *versus* 15,13 ± 30,27) et que la calprotectine fécale était significativement corrélée avec l'index de l'activité de la colite [175]. Dans l'étude de Bremner *et al.* menée chez des enfants RH, les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez les enfants dont la maladie était active, comparés à des enfants dont la maladie était quiescente (médiane : 1250 µg/g de selles *versus* 250 µg/g de selles) et la calprotectine fécale était significativement corrélée avec l'index d'activité de RH [41]. De même, dans l'étude de Canani *et al.* menée chez des enfants MICI, les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez les enfants dont la maladie était active, comparés à des enfants dont la maladie était quiescente [50]. En revanche, chez des enfants CD, Bremner *et al.* ont rapporté que les concentrations de calprotectine fécale chez les enfants dont la maladie était active n'étaient pas significativement différentes de celles d'enfants dont la maladie était quiescente (médiane : 410 µg/g de selles *versus* 263 µg/g de

selles) et que la calprotectine fécale n'était pas corrélée avec l'index d'activité de CD. Ce résultat va dans le même sens que celui décrit par Gaya *et al.* chez des adultes CD [110].

Les travaux de Tibble *et al.* et de Costa *et al.* suggèrent que la calprotectine fécale pourrait être utilisée pour diagnostiquer les phases de rechute des MICI chez l'adulte [60, 301]. Tibble *et al.* ont rapporté chez des adultes CD et RH dont les maladies étaient quiescentes que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez les patients ayant eu une rechute de la maladie durant le suivi, comparés aux patients n'ayant pas eu de rechute durant le suivi (médiane : 122 mg/L *versus* 41,5 mg/L (CD), 123 mg/L *versus* 29,0 mg/L (RH)) [301]. Costa *et al.* ont montré chez des adultes RH dont la maladie était quiescente que les taux de calprotectine fécale étaient significativement différents entre les patients ayant eu une rechute (médiane : 220,6 µg/g de selles) de ceux n'ayant pas eu de rechute (médiane : 67 µg/g) [60]. Cependant, ces mêmes auteurs ont rapporté chez des adultes que les taux de calprotectine fécale étaient similaires entre les patients ayant eu une rechute (médiane : 220,1 µg/g de selles) de ceux n'ayant pas eu de rechute (médiane : 220,5 µg/g). Par ailleurs, ils ont montré que lorsque les concentrations de calprotectine fécale étaient supérieures à 150 µg/g de selles, le risque de rechute était multiplié par deux chez des adultes CD et par quatorze chez des adultes RH [60].

IV. 3. 2. Un index potentiel de l'ECUN

Carroll *et al.* ont suggéré que l'excrétion de la calprotectine fécale pourrait être utilisée dans le diagnostic de l'ECUN chez le nouveau-né prématuré [52]. Dans cette étude, il est à noter le faible nombre d'enfants étudiés (n=14) et le fait qu'un seul échantillon de selles a été analysé par enfant et qu'en cas d'ECUN prouvée (stades Ib, IIb, IIIa, IIIb), le dosage de la calprotectine fécale était effectué uniquement après diagnostic de l'ECUN. Contrairement à cette étude, deux études très récentes ayant analysé la calprotectine fécale longitudinalement chez le nouveau-né prématuré n'ont pas confirmé ces précédents résultats [48, 145]. Dans ces deux études, les niveaux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez le nouveau-né prématuré sain, comparés à ceux rapportés par Carroll *et al.* [52]. De plus, ces mêmes auteurs ont rapporté d'importantes variations intra- et inter-individuelles de la calprotectine fécale au cours du suivi [48, 145]. Ces derniers auteurs ont cependant relié l'élévation du taux de calprotectine à l'apparition de troubles digestifs, suggérant l'utilisation

potentielle de ce marqueur chez l'enfant prématuré [48]. Des études complémentaires sont nécessaires pour valider l'utilisation de la calprotectine comme outil diagnostic de l'ECUN ou d'autres événements digestifs.

IV. 3. 3. Un index potentiel du rejet de greffe intestinale

Récemment, Sudan *et al.* ont rapporté dans une étude pilote menée chez des adultes ayant bénéficié d'une greffe intestinale (n=68) que la calprotectine fécale pourrait être un marqueur de rejet de greffe intestinale [293]. Ces auteurs ont montré que les taux de calprotectine fécale étaient significativement plus élevés chez des patients présentant un rejet de greffe intestinale, comparés à des patients ayant des biopsies normales (198 mg/Kg *versus* 19 mg/Kg). En utilisant un modèle de courbe ROC, une valeur seuil optimale de 92 mg/kg de selles avec une spécificité de 77% et une sensibilité de 83% a été définie, permettant de distinguer les patients présentant un rejet de greffe intestinale de ceux n'en présentant pas [293]. Bien que les résultats de cette étude soient encourageants, des études complémentaires sont nécessaires pour valider l'utilisation de la calprotectine fécale comme marqueur de rejet de greffe intestinale.

INTRODUCTION

Peu d'études se sont intéressées à l'implantation du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré. Or, cette population qui est connue pour être en situation précaire, de par l'immaturité de ses grandes fonctions physiologiques, est exposée à de nombreuses complications digestives. Comparé à celui du nouveau-né à terme, le microbiote intestinal du nouveau-né prématuré s'implante plus tardivement et avec un nombre plus restreint d'espèces bactériennes. L'implantation d'un microbiote anormal chez ces enfants pourrait être à l'origine de pathologies digestives, en particulier l'entérocolite ulcéro-nécrosante, ou être à l'origine d'une augmentation du risque de translocation bactérienne à point de départ digestif. La modulation du microbiote intestinal du nouveau-né prématuré par addition de probiotiques dans l'alimentation constitue une stratégie thérapeutique intéressante. Plusieurs études cliniques utilisant des probiotiques ont été réalisées chez le nouveau-prématuré. Elles ont montré que ces derniers étaient bien tolérés et exerçaient divers effets bénéfiques sur la santé de ces enfants, parmi lesquels la modulation du microbiote intestinal et la réduction de l'incidence et de la sévérité de l'entérocolite ulcéro-nécrosante. A notre connaissance, aucune étude clinique n'a été réalisée chez le nouveau-né prématuré utilisant les souches probiotiques *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG. Or, de nombreux effets bénéfiques de ces deux souches probiotiques ont été rapportés chez l'homme **(Annexe 1)**, incluant par exemple la modulation du microbiote intestinal, la modification de la fréquence de défécation et des caractéristiques fécales, la prévention et le traitement de diverses formes de diarrhée, des allergies et des inflammations intestinales.

Compte-tenu des données de la littérature, nous avons voulu étudier l'effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG chez le nouveau-né prématuré de très faible poids de naissance. L'objectif principal de notre étude était de déterminer si la supplémentation orale en probiotiques favorisait la maturation intestinale, reflétée par la tolérance digestive à l'égard de l'alimentation entérale, le critère principal de jugement étant le pourcentage d'enfants recevant au 14ème jour de vie, plus de la moitié de leurs apports nutritionnels par voie entérale. Pour ce faire, nous avons mis en place une étude clinique bicentrique, prospective, randomisée en double aveugle, dans laquelle un nombre total de 120 nouveau-nés prématurés était requis. Cette étude, financée par un projet hospitalier de recherche clinique (PHRC 2003) a reçu l'accord du comité de protection des personnes se prêtant à la recherche biomédicale (CPP des Pays de la Loire n°2). Les parents de chaque enfant inclu ont donné après explication, leur consentement éclairé par écrit.

Tous les nouveau-nés prématurés inclus ont fait l'objet d'une surveillance clinique et parmi ceux-ci, les 24 premiers nouveau-nés recrutés sur chaque centre ont fait l'objet d'une surveillance biologique. Celle-ci consistait d'une part à caractériser le microbiote fécal de ces enfants par une technique classique de culture, permettant l'identification et le dénombrement des principaux germes bactériens et, par une technique de biologie moléculaire, l'électrophorèse dénaturante en gradient de température, permettant l'analyse de la biodiversité moléculaire du microbiote fécal dominant. D'autre part la surveillance biologique de ces enfants consistait à étudier l'excrétion de la calprotectine fécale utilisée comme marqueur de l'inflammation intestinale et étudier l'excrétion de la citrulline urinaire utilisée comme potentiel marqueur de fonction intestinale. A travers différentes études menées chez l'homme et le grand enfant, la citrulline plasmatique a été validée comme marqueur de masse et de fonctionnement intestinal. Cependant, l'utilisation d'un marqueur sanguin, donc invasif pose des difficultés d'ordre éthique chez le nouveau-né prématuré. En effet, la masse sanguine du grand prématuré (80 mL/kg de poids corporel) est faible, ce qui impose de limiter les prises de sang au minimum indispensable, et la priorité est légitimement donnée aux prélèvements sanguins essentiels pour la surveillance de routine (ionogramme sanguin, glycémie, etc). A noter toutefois que les dosages de surveillance clinique sont réalisés en général sur le plasma. Aussi le culot globulaire obtenu après centrifugation est-il considéré comme un 'déchet de soins', de même que les urines. Par conséquent, nous avons voulu voir si la citrulline urinaire ou globulaire pouvait être validée comme marqueur non invasif du fonctionnement intestinal. Toutefois, peu de méthodes ont été développées pour quantifier la citrulline urinaire et aucune méthode n'a été développée pour quantifier la citrulline globulaire. Ainsi, un de nos objectifs a été de développer une méthode sensible et robuste utilisant la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par ionisation en impact électronique pour quantifier la citrulline dans le plasma, les urines et les culots globulaires. Après validation de cette méthode analytique, notre objectif a été de voir s'il existait une corrélation significative ente la citrulline plasmatique et la citrulline urinaire et également, entre la citrulline plasmatique et la citrulline globulaire. Pour ce faire, nous avons mis en place une étude clinique prospective, randomisée, dans laquelle dix adultes sains recrutés, après signature d'un formulaire de consentement éclairé, conformément à un protocole réalisé en 2003 après accord du CCPPRB des Pays-de-la-Loire, étaient étudiés à 3 reprises : 1) à l'état basal, 2) après prise orale de citrulline (0,18g/Kg/j), dans le but d'augmenter la concentration circulante de citrulline, et 3) après 24 heures de traitement par le phénylbutyrate de sodium *per os* (0,36g/Kg/j réparties en 6 prises), dans le but de faire baisser

la concentration circulante de citrulline, puisque le phénylbutyrate est un chélateur de la glutamine, principal précurseur de la citrulline.

Les connaissances que nous avons actuellement du MI du nouveau-né prématuré sont essentiellement basées sur l'utilisation de techniques dépendantes de la culture qui sont des méthodes expérimentalement longues et lourdes. Bien que de nombreuses méthodes indépendantes de la culture basées sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S aient été développées, peu d'entre elles ont été utilisées pour caractériser le MI du prématuré. La chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC) permet de détecter les variations des séquences d'ADN, de discriminer différents amplicons d'ADNr 16S et ainsi, permet d'identifier les bactéries au niveau de l'espèce et du biotype. Très récemment, cette technique a été adaptée à l'analyse de communautés bactériennes complexes, tels que les bactéries marines et le MI de l'homme adulte. Toutefois, elle n'a jamais été utilisée pour caractériser le MI du nouveau-né prématuré. Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer l'utilisation de la DHPLC pour étudier la mise en place du MI chez le prématuré, en comparaison avec des techniques classiques de culture et des méthodes moléculaires bien établies, incluant l'électrophorèse dénaturante en gradient de température (TTGE) et l'inventaire moléculaire.

TRAVAUX PERSONNELS

ETUDE 1 : Effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG chez le nouveau-né prématuré.

Rougé C, Piloquet H, Butel MJ, Berger B, Rochat F, Ferraris L, Des Robert C, Legrand A, De La Cochetière MF, N'Guyen JM,Vodovar M, Voyer M, Darmaun D et Rozé JC.

En cours de rédaction.

D'après les données de la littérature, il apparaît que le MI est capable de stimuler un grand nombre de fonctions intestinales incluant par exemple, la maturation intestinale postnatale, le maintien de l'effet barrière mucosale et l'absorption des nutriments. Par conséquent, toute modification du MI pourrait affecter l'homéostasie intestinale. Chez le nouveau-né prématuré, l'implantation du MI est anormale, pouvant être responsable de pathologies digestives comme l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) où la colonisation bactérienne est un des éléments de la physiopathologie ou augmenter le risque de translocation bactérienne à point de départ digestif, en raison de l'absence d'un microbiote de barrière. Durant la période néonatale, la survenue de complications digestives chez le prématuré constitue une gêne considérable à l'alimentation. L'alimentation entérale est arrêtée et la durée de la nutrition parentérale est augmentée, exposant ainsi plus longtemps le prématuré au risque de complications multiples (p. ex. mécaniques, infectieux, métaboliques ou encore nutritionnels). D'après la définition du FAO/WHO, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, ont un bénéfice santé pour l'hôte. La modulation du MI du prématuré par addition de probiotiques dans l'alimentation pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Quelques études cliniques prospectives et randomisées utilisant des probiotiques menées chez le nouveau-né prématuré ont rapporté que l'addition de probiotiques dans l'alimentation de ces enfants entraînait entre autres, une augmentation des bifidobactéries associée à une réduction des micro-organismes potentiellement pathogènes et réduisait l'incidence de la sévérité de l'ECUN. Les souches *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium longum* BB536 isolées chez l'Homme sain ont été étudiées séparément chez le prématuré, rapportant que ces souches étaient capables de modifier la composition du MI. Aucune étude clinique n'a rapporté l'effet d'une

supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG chez le nouveau-né prématuré.

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier l'effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG chez le prématuré de très faible poids de naissance. L'objectif principal de notre étude a été de déterminer si la supplémentation orale en probiotiques favorisait la maturation intestinale, reflétée par la tolérance digestive à l'égard de l'alimentation entérale, le critère principal de jugement étant le pourcentage d'enfants recevant au 14ème jour de vie, plus de la moitié de leurs apports nutritionnels par voie entérale. Nos objectifs secondaires ont été d'évaluer si la supplémentation orale en probiotiques modifiait 1) les caractéristiques cliniques des enfants, 2) la composition du MI et 3) l'excrétion de la calprotectine fécale, un marqueur non invasif de l'inflammation intestinale.

Basé sur notre critère principal, le nombre de prématurés à inclure a été estimé à 104 enfants par groupe (risque α : 5% et β : 80%), dans l'hypothèse où la supplementation orale en probiotiques augmenterait de 20% la proportion d'enfants ayant dépassé plus de 50% de leurs apports nutritionnels par voie entérale. Afin de minimiser le nombre d'enfants exposé aux probiotiques, dans le cas où les probiotiques seraient délétères chez les plus fragiles, une analyse séquentielle tous les 20 patients a été réalisée. Les enfants ont été randomisés en deux groupes, selon le centre d'inclusion (Nantes/Paris) et le poids de naissance (<1001g et >1000g). Les enfants ont reçu, 4 fois/jour, dès le début de l'alimentation entérale (lait humain ou/et formule infantile pour prématuré) et jusqu'à leur sortie du service de néonatologie, une supplémentation orale de maltodextrines (groupe placebo) ou de maltodextrines et probiotiques (10^8 ufc de *Bifidobacterium longum* BB536 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Japan) et *Lactobacillus rhamnosus* GG (Valio, Ltd., USA)) (groupe probiotiques).

A la quatrième analyse séquentielle, les inclusions ont été arrêtées. Un total de 94 nouveau-nés prématurés ont été inclus dont 49 enfants dans le groupe placebo et 45 dans le groupe probiotique, entre avril 2005 et janvier 2007, en raison de leur prématurité. Ces enfants avaient un âge gestationnel moyen de 28 SA et un poids de naissance moyen de 1100 g. Tous les enfants de l'étude ont fait l'objet d'une surveillance clinique **(Annexe 2)**. Parmi ceux-ci les 47 premiers enfants recrutés ont fait l'objet d'une surveillance biologique. Une analyse du MI a été réalisée toutes les semaines sur des échantillons de selles par 1) une

technique classique de culture permettant l'identification et le dénombrement des principaux genres bactériens aérobies et anaérobies et 2) une technique de biologie moléculaire, l'électrophorèse dénaturante en gradient de température (TTGE), permettant l'analyse de la biodiversité moléculaire du microbiote fécal dominant. En parallèle, l'excrétion de la calprotectine fécale a été évaluée toutes les deux semaines par dosage ELISA (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italy).

Les caractéristiques cliniques à l'inclusion des enfants et de leur mère étaient similaires dans les deux groupes d'étude. Les résultats obtenus au cours de notre étude, rapportent que la supplémentation orale en probiotiques n'a pas accéléré la maturation intestinale, ni 2) amélioré l'évolution clinique des enfants, ni 3) modifié la composition du MI (hormis la colonisation par les souches probiotiques), ni enfin 4) diminué l'excrétion de la calprotectine fécale. Néanmoins, chez les enfants ayant un poids de naissance >1000g, la supplémentation orale en probiotiques a amélioré la tolérance digestive à l'égard de l'alimentation entérale, sans modification significative du microbiote intestinal (hormis la colonisation par les souches probiotiques), ni de l'excrétion de la calprotectine fécale. Chez les enfants ayant un poids de naissance <1001g, nous avons observé un défaut de colonisation par les souches probiotiques.

Par ailleurs, nous avons observé par culture et TTGE que le mode d'accouchement **(Tableau B)** et l'âge gestationnel de naissance **(Tableau C)** n'avaient pas d'effet significatif sur la composition du MI. Toutefois, à la fin du premier mois de supplémentation, l'incidence de colonisation des entérobactéries était plus faible chez les enfants nés par voie basse, comparée aux autres enfants nés par césarienne (33% *versus* 68%). De même, l'incidence de colonisation des clostridies (semaine 4) était plus faible chez les enfants ayant un âge gestationnel de naissance <28 SA, comparée aux autres enfants (47% *versus* 75%). Par culture et TTGE, nous avons trouvé que le MI des enfants nantais était moins complexe que celui des enfants parisiens **(Tableau D)**. A la fin du premier mois de supplémentation, un seul enfant nantais a été colonisé par des entérocoques à un taux de 10^6 ufc/g de selles, tandis que 33% des enfants parisiens ont été colonisés à un taux de 10^6 ufc/g selles. Par ailleurs, aucun enfant nantais n'a été colonisé par des entérobactéries, alors que l'incidence de colonisation de ce genre bactérien augmentait chez les enfants parisiens (75% à un taux de 10^9 ufc/g de selles). Enfin, les clostridies ont été isolés chez 30% des enfants nantais à un taux de 10^7 ufc/g de selles *versus* 75% des enfants parisiens à un taux médian de 10^8 ufc/g de selles. Au cours de l'étude, nous avons observé de façon similaire par culture et TTGE des changements

majeurs dans la composition du MI. Celles-ci étaient principalement associées à l'administration postnatale d'antibiotiques et/ou à un changement de l'alimentation.

Oral supplementation with probiotics in very low birth weight preterm infants.

Carole Rougé[1], Hugues Piloquet[2], Marie-José Butel[3], Bernard Berger [4], Florence Rochat[4], Laurent Ferraris[3], Clotilde Des Robert[2], Arnaud Legrand[2], Marie-France de la Cochetière[5], JM. N'Guyen[6], Michel Vodovar[7], Marcel Voyer[7], Dominique Darmaun[1] and Jean-Christophe Rozé[1,2].

[1]INRA UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRA and University of Nantes ; Human Nutrition Research Center (CRNH), Nantes, France

[2]INSERM, CIC 0004 ; Neonatal intensive care unit, Hôpital Mère-et-Enfant, CHU de Nantes, France

[3]Nestec Research Center, Vers-Chez-les-Blancs, Switzerland

[4]EA 4065, Ecosystème Intestinal, Probiotiques, Antibiotiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France

[5]EA 3826, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des maladies infectieuses, University of Nantes, France

[6] Biostatistiques, PIMESP, CHU de Nantes, France

[7]Neonatal intensive care unit, Institut de Puériculture, Paris, France

Address for correspondence:

Dominique Darmaun, MD, PhD

UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Hotel-Dieu Hospital, HNB-1, 44093 Nantes cedex 1, France

Telephone: 33 2 53 48 20 04 Fax: 33 2 53 48 20 03

e-mail:ddarmaun@chu-nantes.fr

ABSTRACT

Background. Recent reports suggest supplementation with probiotics may enhance intestinal function in very preterm infants. Yet, the mechanisms involved are unclear, and questions remain open about the safety and effectiveness of probiotics in extremely low birth weight infants.

Methods. We conducted a bi-centric, randomized, double-blind controlled clinical trial. Randomization was stratified for center and birth weight. Infants were randomly assigned to receive prophylactic enteral probiotics (*Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* GG) or placebo. The primary outcome was the proportion of infants receiving more than fifty percent of nutritional needs via enteral feeding on the 14th day of life. Triangular test was used to perform sequential analysis.

Results. The trial was stopped after the fourth sequential analysis which concluded to the lack of effect. A total of 94 infants were enrolled: 45 received probiotics and 49 received placebo. Primary outcome was similar in probiotic and placebo groups (57.8% *vs.* 57.1%, respectively, p=0.95). Nevertheless, the time to reach full enteral feeding in infants weighing more than 1000g at birth was significantly lower in the probiotic group (p=0.04), without significant modification in the composition of intestinal microbiota, except for colonization by the probiotic strains, nor any change in the fecal excretion of calprotectin. In infants weighing less than 1001g, we observed a failure to be colonized by probiotic strains.

Conclusions. The oral supplementation with probiotics did not improve the gastrointestinal tolerance to enteral feeding, except for infants weighing more than 1000g. In extremely low birth weight, probiotics failed to colonize gut. (ClinicalTrials.gov NCT00290576)

INTRODUCTION

In neonatal intensive care units, the frequent use of broad-spectrum antibiotics, the delay in initiating enteral feeding, infection control procedures, and sterilization of milk limit the exposure of preterm infants to normal commensal microorganisms. As a consequence, very preterm infants experience a delayed and abnormal pattern of gut colonization, particularly with regard to bifidobacteria and lactobacilli, normally dominant in healthy full term infants (1-5). This impaired intestinal colonization may predispose preterm infants to necrotizing enterocolitis (6-9) and may increase the risk of intestinal bacterial translocation (10).

Probiotics, defined as live microbial supplements providing health benefits to the host (11), might be useful to modulate the intestinal microbiota in preterm infants. Few trials studied effects of probiotics in preterm infants (12-19). In two trials, reduction of the incidence of severe necrotizing enterocolitis was observed (18,19). But in one of these trials, the incidence in control groups were as high as 13.6% (18). Shortening of the time to reach full enteral feeding was significant only in meta-analysis (20,21). Reduction of more pathogenic species in the bowel reservoir (16,22,23), or the up-regulation of protective immunity (24) in premature infants were another benefit effects observed. Nevertheless, the mechanism by which probiotics may enhance intestinal function remains unclear and their safety and effectiveness in extremely low birth weight is uncertain (21).

We therefore designed a bi-centric, randomized, double-blind controlled clinical trial to evaluate the efficacy of an oral combined supplementation with *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* GG on the digestive tolerance to enteral feeding in preterm infants born with a very or extremely very low birth weight. The primary outcome measure chosen was an expected increase by at least 20% in the proportion of preterm infants receiving more than half their overall nutritional needs by enteral feeding on the 14^{th} day of life. Secondary endpoints were the time to reach full enteral feeding, the effects of oral probiotics on morbidity and mortality until hospital discharge, the composition of intestinal microbiota, and the fecal excretion of calprotectin, a marker of intestinal inflammation.

METHODS

Study population.

Two centers (Mère-Enfant Hospital, Nantes, France and Institut de Puériculture, Paris, France) participated in this trial. The protocol was approved by the medical ethics committee of Nantes and is registered under the reference NCT00290576. Written, informed parental consent was obtained for each infant prior to inclusion. To be eligible for enrolment in the current study, infants had to meet the following inclusion criteria: a gestational age <32 weeks, a birth weight <1500g, a postnatal age no greater than 2 weeks, the absence of any disease other than those linked to prematurity, and the enteral feeding had to have begun prior to inclusion.

Procedures.

The infants were randomized to the placebo or the probiotic group with the help of an in house software (Nantes University Hospital, France), and randomization was stratified on the basis of NICU (Nantes or Paris) and birth weight category (<1001g and >1000g). Infants were fed human (breast milk or bank milk) and/or preterm formula, and were randomly assigned to receive from the start of enteral feeding until discharge from the NICU four daily capsules of a supplement containing either (a) maltodextrin alone (referred to as placebo group), or (b) 10^8 lyophilized cells per unit of *Lactobacillus rhamnosus* GG (Valio, Ltd., USA) and *Bifidobacterium longum* BB536 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Japan) and maltodextrin (referred to as probiotic group). Placebo and probiotics prepared by Nestec (Vers-Chez-Les-Blancs, Switzerland) were supplied in closed capsules and stored at 4°C until use. Capsules were opened and mixed with 1mL of sterile water immediately before administration to infants who received an enteral feeding on the day of the supplementation.

Stool collection was performed on the first 24 infants enrolled in each NICU for the follow-up of intestinal microbiota and fecal calprotectin. Stool samples were collected weekly from birth until hospital discharge. Intestinal microbiota was analyzed weekly by culture allowing the isolation of the main genera found in preterm infants' fecal microbiota. The term "colonization" was defined as the survivalor persistance of a bacterial strain in fecal samples. In parallel, the dominant bacterial diversity of the intestinal microbiota was analyzed by PCR-TTGE. The most prevalent molecular species were identified after sequencing by comparison of bacterial 16S rRNA gene sequences with entries in databases, using appropriate software

such as BIBI®, Blast®, Multalin® and ClustalW® software. The two probiotic strains used in our study were detected specifically in stool samples by a culture-PCR method. Fecal calprotectin concentrations were determined at 2-week intervals in duplicate using a commercial enzyme linked immunoassay (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italy).

Statistical analysis.

Primary outcome was the percentage of infants receiving more than half of their overall nutritional needs via the enteral route at a postnatal age of 14 days. The sample size estimation for the analysis of primary outcome was based on an expected rate of 50% in the placebo group *versus* 70% in the probiotic group. We estimated that 104 patients per group were required to detect such difference with an 80% power and a 5% alpha risk. To avoid exposing an excess number of extremely premature infants to a putative risk of probiotics in the event of a potential harmful effect (25), we carried out a sequential trial using the Whitehead triangular test (26,27). Inspection and interim analysis of data were planned every 20 patients, and performed using Pest 3.0® software. Final statistical analysis was performed using SPSS® 15.0 software. Student's t test, or Mann-Whitney when appropriate, were used for comparison of continuous variables and Khi-2 test, or Fisher's exact test when appropriate, was used for comparison of categorical variables. "Time to reach full enteral feeding" curves were computed according to the Kaplan-Meier method, and statistical comparisons were made using the log-rank test. Cox regression model was performed to adjust for the potential confounders: gestational age, center, type of enteral feeding. A logistic regression was performed to analyze whether factors were associated with the colonization by probiotics. All tests were two-tailed. P-values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

The trial began on April 2005, and was initially planned to last for 3 years. However, as the fourth sequential analysis showed no trend toward statistical difference regarding our primary endpoint, we had to stop inclusions in January 2007. At this time, 94 preterm infants had been enrolled : 45 had been randomized to the probiotic group and 49 to the placebo group. The baseline characteristics of infants and their mothers were similar in the two study groups, except for the lactate levels measured during the first twelve hours of life (Table 1).

Enteral feeding was initiated at a similar postnatal age in probiotic and placebo groups (3.2 ± 1.5 days *vs.* 3.9 ± 1.2, p=0.12) and consisted of human (bank or own mother's) milk in all infants in both groups. The oral supplementation with probiotics or placebo began in parallel with enteral feeding (within <24 hours) (3.5 ± 1.6 days of life *vs.* 4.3 ± 2.4, p=0.06). One infant in probiotic group received the placebo treatment during one week, due to a dispensation error. During the stay in NICU, the incidence of feeding with human milk was not significantly different in probiotic and placebo groups (75.6% *vs.* 81.6%, p=0.47).

Primary outcome was similar in both groups (Table 2). During the stay in the NICU, five preterm infants died before achieving full enteral feeding, among whom, two were in the probiotic group. Time to full enteral feeding was not significantly different between the two study groups (Figure 1). Crude and adjusted Hazard ratios were not significantly different in both groups. Weight gain expressed in Z-score difference was also similar in both groups (probiotic group: -0.16 [-1.11 to 0.98] *vs.* placebo group: -0.41 [-1.26 to 0.9], p=0.18). Hospital course, morbidity and mortality were similar in both groups (Table 2). Six deaths were observed. Four were attributed to neurological lesions, among which, one in the probiotic group. One death was attributed to documented necrotizing enterocolitis in the probiotic group, and one was attributed to septic shock in the placebo group.

As randomization was stratified for center and birth weight (less than 1001g or not), an analysis by subgroup was performed. In center A, time to reach full enteral feeding tended to be lower in probiotic group than in placebo group, and was significantly lower after adjustment for gestational age, Z-score of birth weight and type of enteral feeding (p=0.03). In center B, we did not observed any significant difference. Among infants weighting less than 1001g at birth, time to full enteral feeding did not differ significantly between the

probiotic and placebo groups : 34 [18-59], median [inter quartile], *versus* 32 [23-38], (p=0.12). In contrast, among infants weighting more than 1000g, the time to reach full enteral feeding was significantly reduced in the probiotic group, compared with the placebo group : 16 [13-20] *versus* 19 [15-26] (p=0.04), (Figure 1).

The monitoring of intestinal microbiota and fecal calprotectin excretion was planned on the first 48 infants included and performed on 46 infants, as one infant died before fecal sampling, and in another one fecal sample was not collected until week 5. The baseline characteristics of the 46 infants, i.e. 23 infants in each group, were not significantly different from those found in the 94 preterm infants included in the current study. A total of 83 stool samples were collected for fecal calprotectin determination and 142 for intestinal microbiota analysis during the first 4 weeks. Fecal calprotectin levels were not significantly different in the placebo and probiotic groups (p=0.31) neither among all 46 infants (Figure 2) nor among 26 infants weighting more than 1000g, 154 ± 84µg/g of feces in probiotic *versus* 103 ± 90µg/g (p=0.17). Regarding intestinal microbiota, the incidence of gastrointestinal colonization by bifidobacteria (except for week 4) and lactobacilli was significantly higher in probiotic group. Among infants colonized by bifidobacteria and lactobacilli, levels were similar in both groups, except for bifidobacteria at week 2, which was significantly higher in probiotic group (p=0.01). In contrast, the incidence and levels of colonization by the other bacterial genera was similar in both groups (figure 3). Nevertheless, the incidence of clostridia trended to be lower at week 1 in the probiotic group, and levels of clostridia trended to be lower at week 1 (p=0.06) and levels of enterococci were significantly lower in probiotic group at week 2 (p=0.02). Concerning the microbiota analysis by TTGE, no significant difference was found between probiotic and placebo group, except for the presence of *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* GG in the probiotic group (p=0.01).

As a method to specifically detect the probiotic was available, we were able to determine whether or not infants were successfully colonized by the strains. Probiotic strains were detected at least twice at a one week interval in 19 infants out of 23 in the probiotic group, and in 3 infants out of 23 in the placebo group. Primary outcome was not significantly different between those infants who were successfully colonized by probiotics and those who were not, 64% *vs.* 50% (p=.40). Nevertheless, time to full enteral feeding was significantly lower in probiotics colonised infants: : 16 [13-25], median [interquartile], *versus* 26 [20-35], (p=0.04). Probiotic strain colonization was dependent on birth weight (odds ratio=1.6 [1.1-

2.4] by 100g increment, p=0.02). However, after including in logistic regression model, the number of days with postnatal antibiotic treatment or without enteral feeding, probiotic strains colonization was no more dependent on birth weight (odds ratio=1.3 [0.8-2.1] by 100g increment, p=0.20), but was dependent of these latter factors (odds ratio=0.9 [0.8-1.0] by day, p=0.03). Fecal calprotectin levels did not differ significantly between infants colonized by probiotic strains, and those who were not (p=0.40).

DISCUSSION

The current prospective, double-blind, randomized trial, was designed to determine whether the oral supplementation with *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* GG improved the gastrointestinal tolerance to enteral feeding in very low birth weight infants. When the group is considered as a whole, probiotics failed to accelerate weaning from parenteral nutrition, and did not have any significant effect on the composition of intestinal microbiota (except for colonization by the probiotic strains), nor on the excretion of fecal calprotectin, a presumed marker of inflammation. We further demonstrates this overall negative outcome may result from the presence of two different populations among the infants studied, defined on the basis of birth weight.

In infants weighing less than 1001g at birth, the oral supplementation with probiotics did not improve the gastrointestinal tolerance to enteral feeding. This finding can be explained by the fact that the probability to be colonized by probiotic strains diminished as preterm infant is smaller. We further observed that probiotic strain colonization was negatively affected by the number of days on postnatal antibiotic treatment or without enteral feeding. As infants weighing less than 1001g received antibiotic treatment more frequently, and had more frequent interruptions of enteral feeding than did infants weighing more than 1000g, these findings collectively suggest that these factors could prevent gut colonization by the probiotic strains, and, consequently, the capacity of probiotics to enhance intestinal function.

In contrast, in infants weighing more than 1000g at birth, the oral supplementation with *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* GG shortened the time to achieve full enteral feeding probably by improvement of the gastro-intestinal tolerance. This is consistent with earlier reports (20,21). But the mechanism is unclear. Contrary to a previous study (23), we did not observe a modification of intestinal microbiota, except for colonization by the probiotic strains. The mechanism(s) by which probiotics may enhance intestinal function in very premature infant remain to be elucidated. It has been hypothesized different mechanisms: decreased bacterial attachment, improved intestinal barrier function, protection against ischemic injury, increased cytoprotective mechanisms and decreased exaggerated inflammatory response associated with increased NF-kB activity (28). Nevertheless, in this study we did not observed any difference in fecal calprotectin levels, marker of intestinal

inflammation. Recently, it has been demonstrated that *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors (29).

We used a study design with a sequential analysis by triangular test to avoid exposing an excess number (27) of extremely premature infants with a birth weight as small as 550g to a potential harmful effect of probiotics already published, *Lactobacillus* sepsis (25). In the current study, no deleterious effect was observed. The incidence of sepsis was not different between probiotic and placebo groups, even in the sub group of less 1001g.

Our choice of primary outcome deserves comment. Although prevention of necrotizing enterocolitis is of utmost interest, it may not be relevant under circumstances when the incidence of necrotizing enterocolitis is low, as was the case in the centers participating in this trial. In this study, we observed 3 cases of necrotizing enterocolitis, whose 2 in probiotic group. In contrast, we believe enhancing the gastrointestinal tolerance to feeding, thus shortening the time by which full enteral feeding is achieved, is a very desirable, and relevant objective, as virtually all babies with a very low birth weight are routinely receiving intravenous nutrition for several weeks. Thus a very large number of babies are exposed to a technique associated with a high risk of complications, including catheter-related sepsis and cholestasis. A putative reduction in the duration of parenteral nutrition would thus potentially benefit a very large number of extremely low birth weight infants. Such was the rationale for the choice of primary outcome measure in the current study.

In summary, in the current double-blind, randomized trial, the oral supplementation with *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* GG failed to improve the gastrointestinal tolerance to enteral feeding in extremely very low birth weight infants. This disappointing result clearly limits enthusiasm for probiotic supplementation in as much as infants weighing less than 1001g are by far the most frail population characterized by a higher degree of immaturity of intestinal and immune functions, and those who are exposed the most to the risk of sepsis from intravenous nutrition.. The current findings further suggest that the efficacy of oral probiotics may be limited in this context by the frequent use of postnatal antibiotic treatment, and the frequent need to suspend enteral feeding in the extremely low birth weight infants.

ACKNOWLEDGMENTS

Carole Rougé was the recipient of a doctoral research fellowship from Nestec Research Center (Vers-chez-les-Blanc, Switzerland). Part of this work was supported by grants from : the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2004) from the French Ministry of Health, and the Délégation à la Recherche Clinique (DRC 2004), CHU de Nantes. We gratefully acknowledge the parents of the infants who took part in the study.

REFERENCES

1. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child*. 1990; 65: 185-188.

2. Goldmann DA, Leclair J, Macone A. Bacterial colonisation of neonates admitted to an intensive care environment. *J Pediatr* 1978;93: 288–93

3. Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalised preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 2003; 54: 393–99

4. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastorenterol Nutr*. 2007; 44: 577-582.

5. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985; 144: 186-190.

6. Claud EC, Walker WA, Hypothesis: inappropriate colonisation of the premature intestinecan cause neonatal necrotizing enterocolitis. .*FASEB J* 2001; 15: 1398–403.

7. Butel, M. J., N. Roland, A. Hibert, et al. Clostridial pathogenicity in experimental necrotizing enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J. Med. Microbiol*. 1998; (47): 391-399.

8. De la Cochetière MF, Piloquet H, Des Robert C, et al. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium. *Pediatr Res*. 2004; 56: 366-370.

9. Kliegman RM, WalkeWA, Yolken RH. Necrotizing enterocolitis : research agenda for a disease unknown etiology and pathogenesis. *Pediatr Res*. 1993; 34: 701-708.

10. Dai D. Role of bacterial colonization in neonatal necrotizing enterocolitis and its prevention. *Acta Paed Sin*. 1998; 6: 357-365.

11. FAO/WHO. Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with life lactic acid bacteria. Food and Agriculture Administration of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. (Accessed April 18 , 2008, at
http ://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).

12. Reuman PD, Duckworth DH, Smith KL, Kagan R, Bucciarelli RL, Ayoub EM. Lack of effect of Lactobacillus on gastrointestinal bacterial colonization in premature infants. *Pediatric Infectious Disease*1986;5:663–8.

13. Millar MR, Bacon C, Smith SL,Walker V, HallMA. Enteral feeding of premature infants with Lactobacillus GG. *Archives of Disease in Childhood* 1993;69:483–7.

14. Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants : randomised controlled trial. *Arch Dis Child*. 1997; 76: F101-107.

15. Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm neonates. A prospective doubleblind study. *Biol Neonate* 2002; 82: 103–08.

16. Costalos C, Skouteri V, Gounaris A, et al. Enteral feeding of premature neonates with Saccharomyces boulardii. *Early Hum Dev* 2003; 74: 89–96.

17. Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Effects of bifidobacterium breve supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatrics International* 2004;46:509–5.

18. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr*. 2005; 147: 192-196.

19. Lin HC, Su BH, Chen AC, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2005; 115: 1-4.

20. Deshpande G, Rao S, Patole S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*. 2007; 369: 1614-20. Review.

21. Alfaleh K, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (1): CD005496.

22. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, et al. Oral supplementation with *Lacibacillus casei* subspecies rhamnosus prevents enteric colonisation by candida species in preterm neonates: a randomised study. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1735–42.

23. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm neonates: a double placebo controlled, randomised study. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4025–31.

24. Fujii T, Ohtsuka Y, Lee T, et al. Bifidobacterium breve enhances transforming growth factor beta1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants. J Pediatr Gastroenterol nutr. 2006; 43: 83-88.

25. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. Pediatrics 2005;115:178-181

26. Whitehead J. The design and analysis of sequential clinical trials. In: Statistics in practice. 2nd ed., rev. Chichester, England: John Wiley, 1997

27. Hulot JS, Cucherat M, Charlesworth A, et al. Planning and monitoring of placebo-controlled survival trials: comparison of the triangular test with usual interim analyses methods. Br J Clin Pharmacol. 2003; 55 :299-306.

28. Claud EC, Walker WA. The intestinal microbiota and the microbiome. In: Neu J, Polin RA, eds. Gastroenterology and nutrition, neonatalogy questions and controversies. Philadelphia, PA: Saunders, 2008: 73-91.

29. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A et al. Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. Nat Med. 2007;13 :35-7.

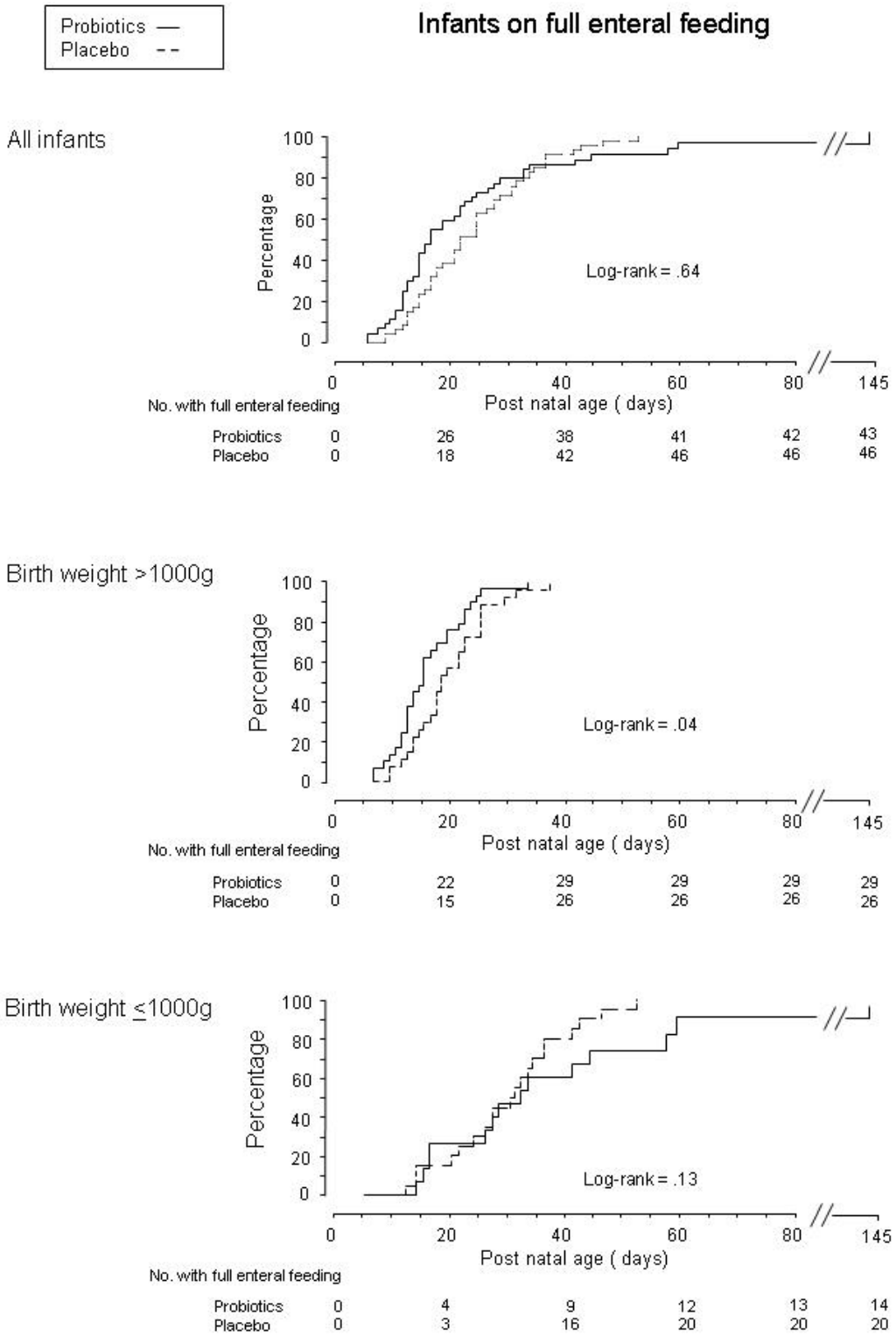

Figure 1. **Time to reach full enteral feeding**.

Kaplan-Meier curves to full enteral feeding in the two treatment groups : in all infants (top), in infants with birth weight >1000 (middle) and in infants with birth weight <1001g (bottom).

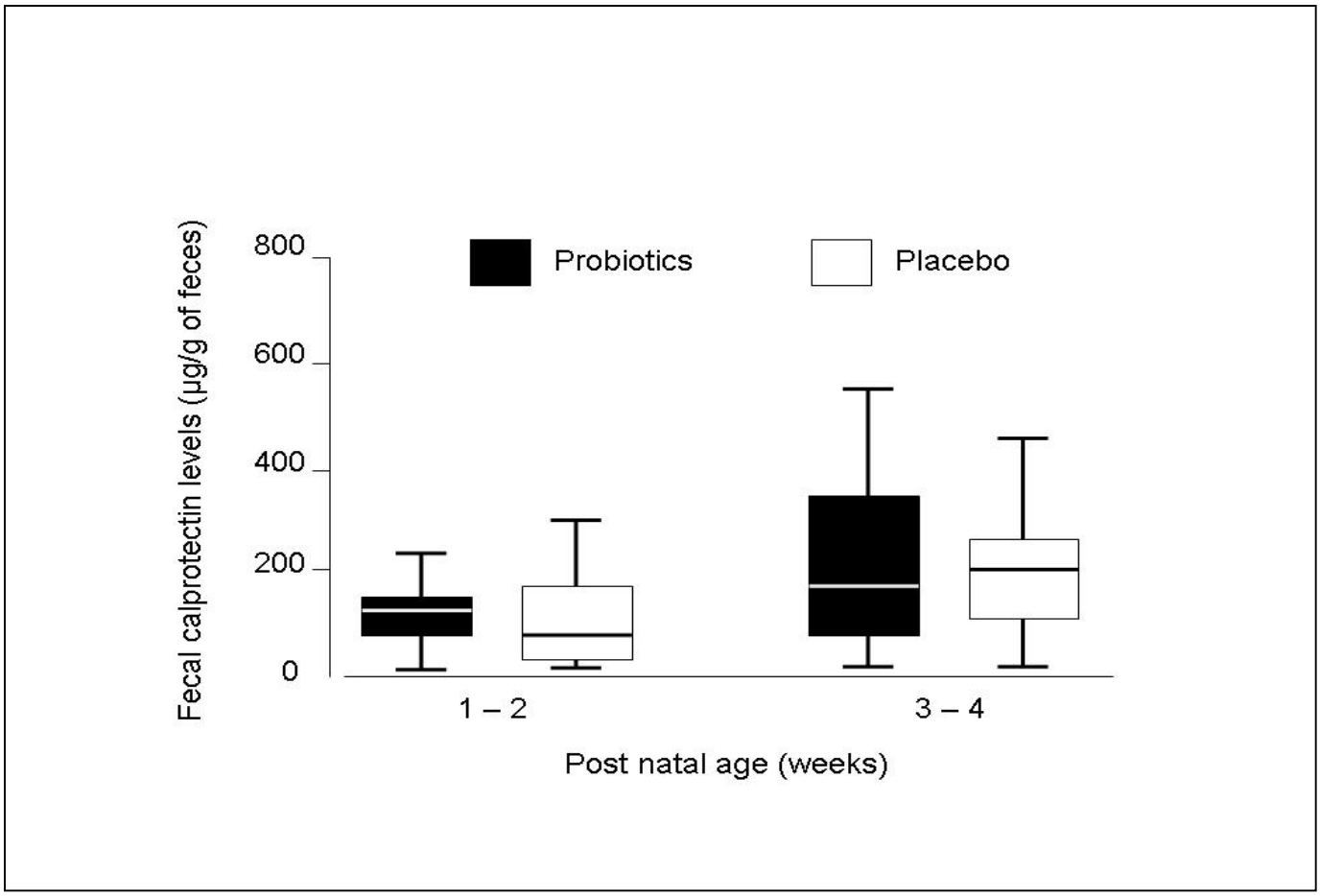

Figure 2. **Fecal calprotectin levels**

Fecal calprotectin levels (µg/g of faces) were measured in fecal samples collected at 2-week intervals, during the first month of supplementation, in the first forty-seven preterm infants enrolled in the study. The boxplot shows the median (central horizontal line) and includes the 25^{th} (lower box border) to 75^{th} percentile (upper box border).

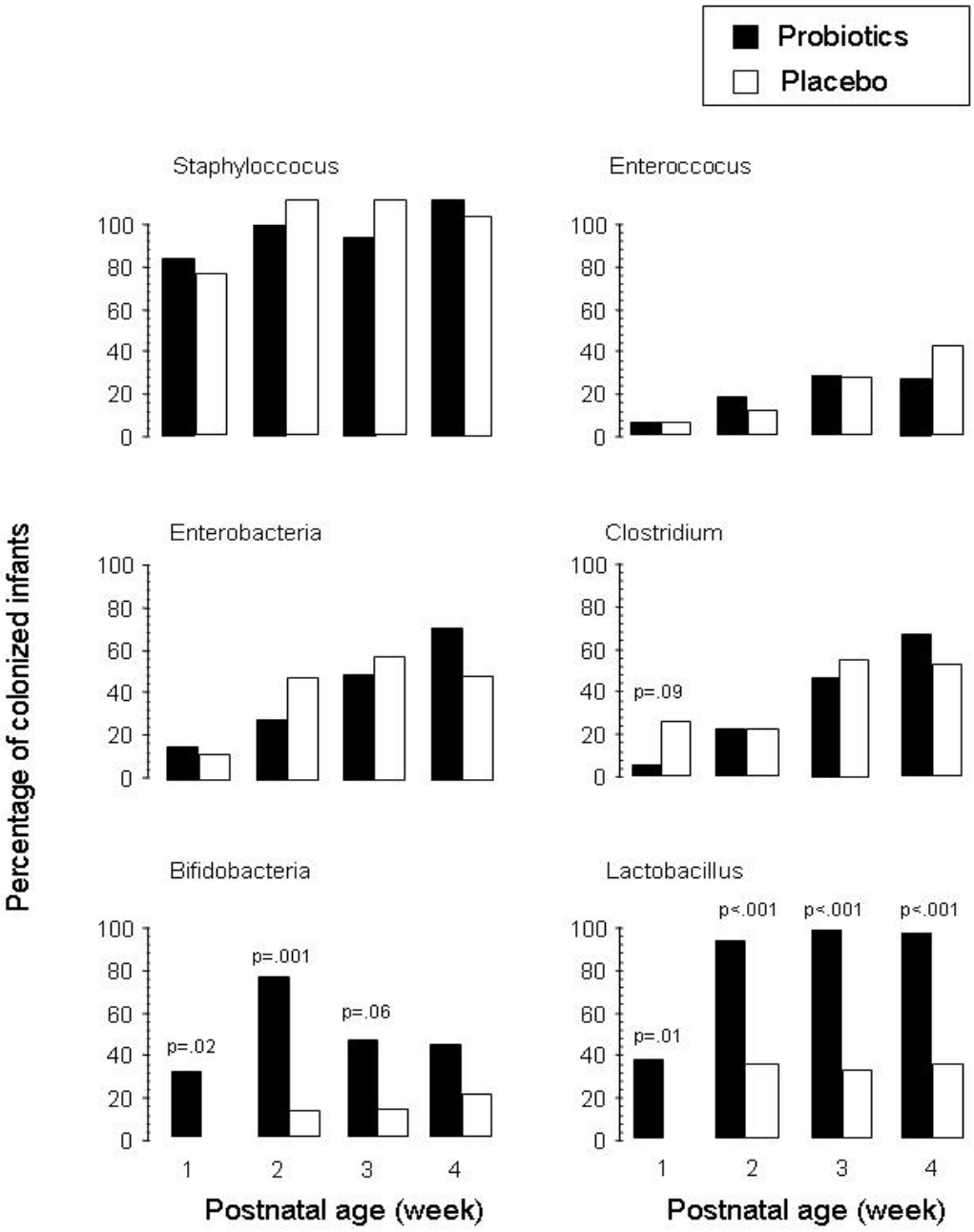

Figure 3. **Fecal microbiota during the first 4 weeks of life.**

Incidence of intestinal colonization by selected bacterial strains in probiotics (filled bars) and placebo group (open bars) in the first forty-seven preterm infants enrolled in the current study, at 1-interval week, during the first month of supplementation.

Table 1. Baseline characteristics of infants.

	Probiotic group n=45	**Placebo group n=49**	***p-value***
Multiple pregnancy	23 (48.9)	31 (63.3)	*0.29*
Pregnancy-induced Hypertension	6 (13.3)	9 (18.4)	*0.51*
Rupture of membranes >12 hours	8 (17.8)	5 (10.2)	*0.31*
Antenatal corticoid treatment	35 (77.8)	41 (83.7)	*0.47*
Antenatal antibiotic treatment	14 (31.1)	13 (26.5)	*0.62*
Pernatal antibiotic treatment	9 (20.0)	9 (18.4)	*0.84*
Cesarean section	28 (62.2)	35 (71.4)	*0.34*
Gestational age (weeks)	28.1 (1.9)	28.1 (1.8)	*0.87*
Birth weight (g)	1115 (251)	1057 (260)	*0.28*
Birth weight <1000 g	15 (33.3)	20 (40.8)	*0.45*
Intrauterine growth retardation	1 (2.2)	3 (6.1)	*0.35*
Male gender	28 (62.2)	26 (53.1)	*0.37*
Z-score of birth weight	- 0.16 (-0.83)	-0.41 (-0.92)	*0.18*
Apgar score (1 min)	6.8 (2.7)	6.9 (3.4)	*0.85*
Apgar score (5 min)	9.1 (1.4)	8.8 (1.8)	*0.33*
Lacate (mmol/L, <12 hours of life)	3.2 (1.7)	4.2 (2.9)	*0.04*

Results are presented as number (percent) or mean (standard deviation).

Table 2. Efficacy of treatment.

	Probiotic group n=45	**Placebo group n=49**	***p-value***
Nutrition at day 14			
More than 50% of calories by enteral nutrition (n)	26 (57.8)	28 (57.1)	*0.95*
% of calories delivered enterally	59.8 (36.7)	57.3 (31.3)	*0.73*
Other outcome measures			
Nosocomial infections (n)	21 (46.7)	26 (53.1)	*0.54*
Sepsis with positive blood culture (n)	15 (33.3)	13 (26.5)	*0.47*
Total time on antibiotic tretament (days)	11.7 (14.4)	10.2 (9.7)	*0.55*
Necrotizing enterocolitis (n)	2 (4.4)	1 (2.0)	*0.51*
Duration of ventilatory support (days)	10.1 (2.4)	10.2 (1.7)	*0.98*
Duration of CPAP (days)	20.9 (2.2)	21.4 (2.1)	*0.88*
Duration of oxygen therapy (days)	20.3 (4.5)	14.6 (2.7)	*0.28*
Systemic postnatal corticotherapy (n)	13 (28.9)	10 (20.4)	*0.34*
Length of hospital stay (days)	60.7 (28.8)	65.6 (30.0)	*0.43*
Death (n)	2 (4.4)	4 (8.2)	*0.76*

Results are presented as number (percent) or mean (standard deviation).

Tableau A : Implantation du MI chez le nouveau-né prématuré selon la détection ou non des souches probiotiques dans les selles de ces enfants.

	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3		Semaine 4	
Détection/Probiotiques	**Probiotiques détectés**	**Probiotiques non détectés**	**Probiotiques détectés**	**Probiotiques non détectés**	**Probiotiques détectés**	**Probiotiques non détectés**	**Probiotiques détectés**	**Probiotiques non détectés**
	n=23[a]	n=16	n=23	n=14	n=23	n=12	n=19	n=12
Bactéries aérobies anaérobies facultatives								
Staphylococci	6,3±1,3[b] (78%)[c]	6,4±1,9 (63%)	7,3±1,2 (91%)	6,3±1,8 (100%)	7,2±1,1 (87%)	7,3±1,3 (100%)	6,8±1,4 (100%)	6,5±1,7 (92%)
Enterococci	3,4[d] (4%)	8,8 [d] (6%)	4,4±1,0 (13%)	8,5±0,8 (14%)	6,9±1,9 (22%)	7,1±0,8 (33%)	6,2±2,2 (26%)	6,4±1,7 (42%)
Enterobacteria	7,7±1,9 (13%)	6,1±3,3 (13%)	8,0±2,1 (30%)	7,3±2,2 (43%)	8,2±0,9 (52%)	8,2±1,9 (50%)	7,8±2,1 (68%)	9,0±0,8 (42%)
Lactobacilli	6,0±1,3 (30%)	(0%)	7,1±1,4 (83%)	6,4±1,6 (21%)	6,7±1,4 (91%)	7,6±0,7 (17%)	6,8±1,2 (95%)	7,7±1,3 (17%)
Bactéries anaérobies strictes								
Bacteroides	(0%)	(0%)	8,4[d] (4%)	(0%)	4,1[d] (4%)	(0%)	6,1[d] (5%)	(0%)
Clostridium	3,6±0,3 (13%)	4,2±1,2 (19%)	5.9±0.7 (22%)	7,0±0,6 (21%)	6,3±1,7 (48%)	6,4±1,4 (58%)	6,1±1,5 (63%)	7,6±0,5 (58%)
Bifidobacterium	6,0±2,2 (26%)	(0%)	6,5±1,5 (61%)	3,3 (14%)	5,5±1,0 (43%)	(0%)	6,0±2,3 (53%)	(0%)

[a]nombre d'enfants analysés, [b]$\log_{10}$ ufc/g de selles, moyenne±écart-type, [c]% d'enfants colonisés, [d]valeurs individuelles.

Tableau B : Implantation du MI chez le nouveau-né prématuré selon le mode d'accouchement.

	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3		Semaine 4	
Mode d'accouchement	**Voie basse**	**Césarienne**	**Voie basse**	**Césarienne**	**Voie basse**	**Césarienne**	**Voie basse**	**Césarienne**
	n=10[a]	n=29	n=8	n=29	n=9	n=26	n=9	n=22
Bactéries aérobies anaérobies facultatives								
Staphylococci	6,5±1,0[b] (70%)[c]	6,3±1,5 (72%)	6,9±1,5 (100%)	6,9±1,6 (93%)	6,7±1,6 (78%)	7,4±1,0 (96%)	6,3±1,6 (100%)	6,9±1,5 (95%)
Enterococci	(0%)	6,1±3,8 (7%)	5,3[d] (13%)	6,1±2,6 (14%)	7,6±1,3 (22%)	6,8±1,5 (27%)	7,3±1,7 (22%)	6,1±1,9 (36%)
Enterobacteria	(0%)	7,1±2,3 (17%)	5,7±3,3 (25%)	8,1±2,2 (38%)	7,9±0,3 (33%)	8,1±1,4 (58%)	8,0±1,6 (33%)	8,4±1,8 (68%)
Lactobacilli	(0%)	6,0±1,3 (24%)	7,8±0,7 (63%)	6,9±1,5 (62%)	6,8±1,5 (78%)	6,8±1,4 (62%)	6,3±1,2 (78%)	7,2±1,6 (59%)
Bactéries anaérobies strictes								
Bacteroides	(0%)	(0%)	8,4[d] (13%)	(0%)	4,1[d] (11%)	(0%)	6,1[d] (11%)	(0%)
Clostridium	3,5±0,2 (20%)	4,1±1,0 (14%)	(0%)	6,3±0,9 (28%)	6,7±1,2 (44%)	6,3±1,6 (58%)	5,4±1,7 (44%)	7,0±1,2 (68%)
Bifidobacterium	(0%)	6,0±2,2 (21%)	6,3±2,2 (50%)	6,3±1,9 (41%)	5,5±1,5 (22%)	5,5±1,0 (31%)	6,5±3,4 (33%)	5,8±2,0 (32%)

[a]nombre d'enfants analysés, [b]$\log_{10}$ ufc/g de selles, moyenne±écart-type, [c]% d'enfants colonisés, [d]valeurs individuelles.

Tableau C : Implantation du MI chez le nouveau-né prématuré selon l'âge gestationnel de naissance.

	Semaine 1		Semaine 2		Semaine 3		Semaine 4	
Age gestationnel	**<28 SA**	**>28 SA**	**<28 SA**	**>28 SA**	**<28 SA**	**>28 SA**	**<28 SA**	**>28 SA**
	n=15 [a]	n=24	n=14	n=23	n=14	n=20	n=15	n=16
Bactéries aérobies anaérobies facultatives								
Staphylococci	5,3±1,3 [b] (67%) [c]	6,6±1,2 (71%)	6,7±1,7 (93%)	7,0±1,6 (96%)	7,1±1,3 (79%)	7,4±1,1 (100%)	6,4±1,6 (93%)	6,9±1,4 (100%)
Enterococci	3,4 [d] (7%)	8,8 [d] (4%)	3,9±0,8 (14%)	7,3±1,8 (13%)	7,1±1,0 (29%)	6,8±1,8 (25%)	5,9±1,7 (40%)	6,9±2,4 (25%)
Enterobacteria	8,4 [d] (7%)	6,8±2,5 (17%)	3,3±2,2 (43%)	7,8±2,2 (30%)	8,5±1,4 (57%)	7,9±1,1 (50%)	8,6±1,8 (53%)	7,7±2,0 (63%)
Lactobacilli	4,4±0,4 (13%)	6,6±1,0 (21%)	5,5±1,7 (43%)	7,3±1,3 (74%)	6,5±1,9 (57%)	6,9±1,1 (25%)	6,7±1,4 (67%)	7,1±1,6 (63%)
Bactéries anaérobies strictes								
Bacteroides	(0%)	(0%)	8,4 [d] (7%)	(0%)	4,1 [d] (7%)	(0%)	6,1 [d] (7%)	(0%)
Clostridium	3,6±0,3 (20%)	4,2±1,2 (13%)	5,8±1,6 (14%)	6,5±0,7 (26%)	5,8±2,1 (43%)	6,2±1,2 (60%)	5,6±2,1 (47%)	6,9±0,9 (75%)
Bifidobacterium	(0%)	6,0±2,2 (25%)	4,6±1,3 (29%)	6,7±1,7 (52%)	5,5±0,7 (29%)	5,5±1,2 (30%)	6,5±2,0 (40%)	5,3±2,8 (25%)

[a]nombre d'enfants analysés, [b]$\log_{10}$ ufc/g de selles, moyenne±écart-type, [c]% d'enfants colonisés, [d]valeurs individuelles.

Tableau D : Implantation du MI chez le nouveau-né prématuré selon le centre d'étude.

	Centre 1 (HME-Nantes)				Centre 2 (IPP-Paris)			
	Semaine 1		Semaine 4		Semaine 1		Semaine 4	
	Groupe placebo	Groupe probiotique	Groupe placebo	Groupe probiotique	Groupe placebo	Groupe probiotique	Groupe placebo	Groupe probiotique
	n=9[a]	n=8	n=7	n=4	n=10	n=12	n=8	n=12
Bactéries aérobies anaérobies facultatives								
Staphylococci	7,4±1,2[b] (56%)[c]	6,7±1,5 (75%)	7,7±0,9 (100%)	8,2±1,4 (100%)	5,6±1,7 (80%)	6,2±1,3 (75%)	5,5±1,3 (88%)	6,3±1,3 (100%)
Enterococci	(0%)	(0%)	6,0[d] (17%)	8,3[d] (25%)	8,8[d] (10%)	3,4[d] (8%)	5,7±2,3 (50%)	6,5±1,8 (33%)
Enterobacteria	(0%)	(0%)	(0%)	8,7[d] (25%)	3,8[d] (10%)	7,9±1,6 (33%)	8,5±1,3 (100%)	7,8±2,5 (75%)
Lactobacilli	(0%)	6,3±1,5 (38%)	8,0±1,1 (43%)	8,1±1,5 (100%)	(0%)	5,7±1,3 (33%)	6,9±0,3 (25%)	6,1±1,3 (92%)
Bactéries anaérobies strictes								
Bacteroides	(0%)	(0%)	6,1[d] (14%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)
Clostridium	3,3[d] (11%)	(0%)	7,0-7,1[d] (29%)	4,7-7,1[c] (50%)	4,2±1,0 (40%)	3,3[c] (8%)	7,6±0,6 (75%)	6,1±1,7 (75%)
Bifidobacterium	(0%)	5,9-7,9[d] (25%)	6,1[d] (14%)	6,2±2,8 (100%)	(0%)	5,5±2,5 (33%)	5,0±0,2 (25%)	6,5±3,3 (25%)

[a]nombre d'enfants analysés, [b]$\log_{10}$ ufc/g de selles, moyenne±écart-type, [c]% d'enfants colonisés, [d]valeurs individuelles.

ETUDE 2 : Excrétion de la calprotectine fécale chez le nouveau-né prématuré durant la période néonatale.

Carole Rougé, Marie-José Butel, Laurent Ferraris, Hugues Piloquet, Arnaud Legrand, Michel Vodovar, Marcel Voyer, Marie-France de la Cochetière, Dominique Darmaun et Jean-Christophe Rozé.

Soumis à Journal of Paediatrics.

Appelée initialement protéine leucocyte L1, la calprotectine est une protéine de 36,5 kDA qui a la capacité de fixer le zinc et le calcium. Chez l'homme, elle représente environ 60% des protéines du cytosol des granulocytes neutrophiles et est retrouvée dans les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales. La calprotectine semble impliquée dans la régulation des processus inflammatoires et possédée des propriétés antimicrobiennes et antiprolifératives *in vitro* et *in vivo*. De récentes études menées chez l'enfant et l'adulte ont rapporté que les taux de calprotectine fécale augmentaient significativement dans toutes les maladies caractérisées par une inflammation de la muqueuse gastro-intestinale et ont proposé que la calprotectine fécale puisse être utilisée comme un index non invasif de l'inflammation intestinale. Les taux de calprotectine fécale observés durant les premières semaines de vie chez le nouveau-né prématuré et le nouveau-né à terme étaient plus élevés que ceux observés chez l'enfant plus âgé et l'adulte. Comme peu d'études ont évalué les concentrations de la calprotectine fécale chez le nouveau-né prématuré, les facteurs qui affectent l'excrétion de cette protéine ne sont pas pleinement connus. Par ailleurs, la colonisation bactérienne du côlon qui se met en place durant les premières semaines de vie pourrait stimuler la migration des granulocytes à travers la barrière épithéliale, via des agents chémotactiques produits par le microbiote intesinal. L'influence de la colonisation intestinale bactérienne sur l'excrétion de la calprotectine fécale n'a jamais été évaluée.

Dans ce contexte, les objectifs de notre étude ont été de décrire les concentrations de la calprotectine fécale chez le nouveau-né prématuré de la naissance jusqu'à la sortie de l'hôpital, ainsi que les facteurs liés à ses variations, en particulier la mise en place du MI chez ces enfants.

La calprotectine fécale a été déterminée en utilisant un dosage ELISA (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italy), sur un nombre total de 147 échantillons fécaux obtenus de façon prospective chez les 47 premiers nouveau-nés prématurés inclus dans notre étude clinique « probiotiques ». Ces enfants avaient un âge gestationnel médian de 29 SA [Interquartile, 27-29 SA] et un poids de naissance médian de 1100 g [Interquartile, 880-1320 g]. Les selles ont été recueillies toutes les deux semaines, de la naissance jusqu'à la sortie de l'hôpital (médiane : 3 échantillons par enfant).

Durant le suivi des enfants, i.e. de J3 à J78, le taux médian de calprotectine fécale était de 138 µg/g de selles [Interquartile, 58-271 µg/g de selles] et présentait d'importantes variations intra- et inter-individuelles (86% et 67%, respectivement). A partir des premiers échantillons de selles recueillis pour chaque enfant, nous avons montré que l'excrétion de la calprotectine fécale n'était pas influencée par les données périnatales (sexe, poids de naissance, âge gestationnel, mode d'accouchement, croissance intra-utérine, corticothérapie anténatale). En revanche, dans ces échantillons, les valeurs de calprotectine fécale étaient affectées par l'antibiothérapie anténatale. Durant le suivi des enfants, onze variables influençant l'excrétion de la calprotectine fécale ont été identifiées en analyse univariée, parmi celles-ci, l'antibiothérapie anté- et post-natale, le type d'alimentation, l'arrêt de l'alimentation entérale non plannifié, le volume de l'alimentation entérale (mL/kg/j), l'âge postnatal et postconceptionnel, le gain de poids (Z-score) et la colonisation bactérienne intestinale par les genres *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Clostridium*. Toutes les variables citées précédemment ont été analysées en analyse multivariée. Au cours de cette analyse, nous avons montré que l'excrétion de la calprotectine fécale était négativement corrélée à l'antibiothérapie anténatale, et positivement corrélée au volume de l'alimentation entérale (mL/kg/j), à l'arrêt de l'alimentation entérale non plannifié et à la colonisation intestinale par les genres *Clostridium* et *Staphylococcus*.

Les résultats mis en évidence au cours de cette étude suggèrent que chez le prématuré de très faible poids de naissance, l'excrétion de la calprotectine fécale pourrait refléter un état d'inflammation physiologique en réponse de l'adaptation du tractus gastro-intestinal immature du nouveau-né à l'égard des apports antigéniques d'origine alimentaire et bactérienne durant la période néonatale.

Fecal calprotectin excretion in preterm infants during the neonatal period

Carole Rougé[1], Marie-José Butel[2], Laurent Ferraris[2], Hugues Piloquet[1,3], Arnaud Legrand[3], Michel Vodovar[4], Marcel Voyer[4], Marie-France de la Cochetière[5], Dominique Darmaun[1] and Jean-Christophe Rozé[1,3].

[1]INRA UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, University of Nantes ; Human Nutrition Research Center (CRNH), Nantes, France

[2]EA 4065, Ecosystème Intestinal, Probiotiques, Antibiotiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France

[3]INSERM, CIC 0004 ; Neonatal intensive care unit, Hôpital Mère-et-Enfant, CHU de Nantes, France

[4]Neonatal intensive care unit, Institut de Puériculture, Paris, France

[5]EA 3826, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des maladies infectieuses, University of Nantes, France

Address for correspondence:
Dominique Darmaun, MD, PhD
UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Hotel-Dieu Hospital, HNB-1, 44093 Nantes cedex 1, France
Telephone: 33 2 53 48 20 04 Fax: 33 2 53 48 20 03
e-mail:ddarmaun@chu-nantes.fr

ABSTRACT

Objectives: To determine the time course of fecal calprotectin (f-calprotectin) excretion in preterm infants from birth until hospital discharge and to identify which factors influence f-calprotectin levels during the first week of life in preterm infants including bacterial establishment in the gut.

Study design : F-calprotectin was determined using an ELISA assay in 147 samples obtained prospectively from 47 preterm infants (gestational age, and birth-weight interquartiles 27-29 weeks, and 880-1320 g, respectively) at birth, and at 2-week intervals until hospital discharge.

Results: Although median f-calprotectin excretion was 138 µg/g, a wide range of inter- and intra-individual variation in f-calprotectin values (from day 3 to day 78) was observed (86% and 67%, respectively). F-calprotectin correlated negatively with ante and per natal antibiotic treatment, and positively with volume of enteral feeding (mL/kg/d), the need to interrupt enteral feeding, and prominent gastrointestinal colonization by *Clostridium sp* and *Staphylococcus sp*.

Conclusion: F-calprotectin excretion in preterm infants might reflect the degree of mechanical stretch or bacterial stress of the immature gastrointestinal tract.

INTRODUCTION

Initially called leukocyte L1, calprotectin is a 36 kDa calcium and zinc binding protein that constitutes about 60% of soluble cytosol protein in human neutrophil granulocytes, and is found in monocytes, macrophages and epithelial cells.[1] Calprotectin appears to have a regulatory function in inflammatory processes[2], and antimicrobial and antiproliferative properties *in vitro*[3,4] and *in vivo*[5]. Calprotectin is resistant to proteolysis, and stable in fecal samples even when stored for one week at room temperature[6]. A method for the measurement of calprotectin has been recently developed, with higher calprotectin yield and lower risk of contamination[7]. Furthermore, as assay sensitivity has improved, the amount of feces needed has been reduced and the assay of calprotectin is easy, accurate and reproducible[7].

In adults and children[8-10], fecal calprotectin levels are increased in several GI conditions associated with inflammation (e.g., inflammatory bowel disease, such as Crohn's disease or ulcerative colitis). In inflammatory bowel disease, high fecal calprotectin levels seem to correlate with an increased turnover of leukocytes in the gut wall and granulocyte migration through the gut wall[11,12], and its excretion correlates with invasive markers of gut inflammation[8-13]. Fecal calprotectin has therefore been proposed as a non invasive index of intestinal inflammation in adults and children[8-10].

Fecal calprotectin levels have been reported to be much higher during the first few weeks of life in healthy preterm and full term infants than in healthy adults and children[14-17]. As relatively few studies have assessed calprotectin concentrations in preterm infants[14,17-20], the factors that affect calprotectin excretion in very low birth weight infants, however, are incompletely known and more or less controversial. Moreover, although the bacterial colonization of neonatal colon taking place in the first weeks of life could stimulate transepithelial migration of granulocytes, through chemotactic agents produced by the intestinal microbiota[21], to our knowledge, the impact of bacterial intestinal colonization which is a known risk factor for gastrointestinal disease in preterm infants on fecal calprotectin excretion has not been addressed.

The aims of the current study therefore were 1) to describe the time course of fecal calprotectin excretion in preterm infants from birth until hospital discharge, 2) to identify

which factors influence fecal calprotectin levels during the first week of life in preterm infants including bacterial establishment in the gut.

METHODS

Patients. Preterm infants admitted to the neonatal intensive care units at the Mère-Enfant Hospital (Nantes, France) and at the Institut de Puériculture (Paris, France) were eligible for enrolment in the current prospective study if they met the following inclusion criteria: a gestational age <32 weeks, a birth weight <1500 g, a postnatal age no greater than 2 weeks, and the absence of any disease other than those linked to prematurity. Written, informed parental consent was obtained prior to inclusion, according to protocols approved by the local Institutional Review Board.

Clinical data. Collected clinical parameters included gestational age, birth weight, sex, mode of delivery (vaginal or cesarean section), intrauterine growth retardation, 5-min Apgar score, maternal treatment (corticoids and antibiotics), and before each stool sample collected: postnatal age, type of enteral feeding at the time of sampling (own mother's milk, bank milk, or preterm formula), postnatal treatment (antibiotics), volume of enteral feeding (mL/kg/d), and number of enteral feeding interruptions. Poor tolerance to enteral feeding was defined as a suspension of enteral feeding for any day during the week following the day the fecal sample had been obtained. After clinical assessment, enteral feeding was interrupted if there were significant residues in gastric aspirates, abdominal distension, and/or blood in stool. As enteral feeding is routinely suspended when ibuprofen is administered (to promote the closure of *ductus arteriosus*), the planned, on purpose interruptions of enteral feeding motivated by the prescription of ibuprofen treatment, were not considered as an event of poor GI tolerance.

Stool collection. For each preterm infant, stool samples (about 1g) were collected from diapers in two sterile plastic tubes, at 2-week intervals, from birth until discharge from the Neonatology unit. One of the tubes contained 0.5 mL of brain heart infusion (BHI) with 15% glycerol as a cryoprotective agent. All fecal samples were frozen and stored at –80°C immediately after collection, and until analysis.

Fecal calprotectin determination. Before analysis, frozen stool samples were thawed at room temperature, and fecal calprotectin concentration was determined using a commercial enzyme linked immunoassay (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italy). All stool samples were analyzed in duplicate, and the mean coefficient of variation was less than 3%.

Microbiological analysis of fecal samples. After thawing the samples collected in BHI, serial dilutions from 10^{-2} to 10^{-6} were performed, and spread using the automatic spiral system (Chemunex-AES Laboratoire, Bruz, France) on various media allowing the isolation of the main genera found in preterm infants' fecal flora, i.e. staphylococci, enterococci, enterobacteria, lactobacilli, clostridia, *Bacteroides*, and bifidobacteria, as previously described[22]. Plates were incubated in an anaerobic workstation for anaerobes during 5 days, and aerobically for aerobes during 48h. Bacterial identification was performed using routine laboratory methods and PCR amplification with 16S rDNA-gene primers and sequencing of the amplicons. Bacterial counts were expressed as the log_10 CFU/g of feces Bacterial counts were expressed as the $\log_{10}$ CFU/g of feces and the count threshold was 3 $\log_{10}$ CFU/g of feces.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using SPSS® version 14.0 (SPSS, Chicago, IL). Results are reported as median and interquartiles, and percentages were presented as percent [95% confidence interval]. Chi2 and Mann-Whitney U test were used to compare proportion and quantitative values respectively. Spearman's correlation test was used to evaluate the relationship between selected perinatal or neonatal characteristics and fecal calprotectin values. All variables that showed a statistically significant correlation with fecal calprotectin by univariate analysis were subsequently analyzed together in forward and backward stepwise, multivariate regression analyses, after log transformation of fecal calprotectin values. Cut-off value was determined by receiver operating curve (ROC) method. Sensibility and specificity were calculated [95% confidence interval]. Statistically significant differences were assumed when $p<0.05$.

RESULTS

Patients. Forty-seven preterm infants (29 boys and 18 girls) were enrolled in the current study. They had a median gestational age of 29 weeks [interquartile, 27-29 weeks], a median birth-weight of 1100 g [interquartile, 880-1320 g]. Sixteen were born by caesarean section, and 31 by vaginal delivery. Median Apgar score at 5 minutes was 10 [interquartile, 8-10]. During follow-up, 17 infants were fed solely with human milk (either bank milk or their own mother's milk), 29 were fed with human milk combined with a formula for preterm infants, and 1 was fed solely with a preterm formula. As this study was part of a larger, ongoing study, 25 of the 47 infants received a milk supplemented with a mixture of probiotics, i.e. *Bifidobacterium longum* BB536 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Japan) and *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (Valio, Ltd., USA) (10^8CFU, four times a day), from the start of enteral feeding (median: 2 days of life, [interquartile, 2-4]) until discharge from hospital (median: 62.5 days of life, [interquartile, 45.5-78.5]). The median time [interquartile] to full enteral feeding (100% of total calories supplied via the enteral route) was 20.0 days [interquartile, 14.5-30.0].

GI bacterial colonization.

Microbiological analysis of initial fecal samples.

Among the forty-three initial fecal samples analyzed during the two first weeks, all were poorly colonized. Except for two infants, all infants were colonized by staphylococci at a median level of 7.4 $\log_{10}$ CFU/g of feces (Table 1). In contrast, only 5 infants were colonized at a low level by enterococci, and one third by enterobacteria. Only one infant was colonized by *Bacteroides*, whereas ¼ were colonized by clostridia. Lactobacilli and bifidobacteria, which were identified as the probiotic strains, were found in 23 and 16 infants, respectively.

Microbiological analysis of fecal samples during the follow-up.

Staphylococci were the most commonly isolated bacteria since nearly all infants were colonized. Occurrence of colonization by enterococci, enterobacteria, and clostridia increased with time, whereas colonization by lactobacilli, bifidobacteria, and *Bacteroides* remained quite stable (Table 1).

Fecal calprotectin concentrations.

Throughout follow-up (from day 3 to day 78), a total of one hundred forty seven fecal samples were obtained, with an average of 3 samples per infant. The median fecal calprotectin level was 138 µg/g of feces [interquartile, 58-271 µg/g], with a range between 15 and 811 µg/g. A wide range of calprotectin levels were observed, with inter- and intra-individual coefficients of variation of: 86% and 67%, respectively.

The first initial fecal samples were obtained at 11 days of life (n=47, [interquartile, 7-15 days of life]) and the median fecal calprotectin levels were 87 µg/g [interquartile, 35-153 µg/g). In these fecal samples, fecal calprotectin levels was not affected by gender (p=0.39), nor the use of corticoids *ante partum* (p=0.66), or the mode of delivery (p=0.37). In contrast, fecal calprotectin levels were significantly lower in infants whose mothers had received antibiotics *ante* and *per partum* (n=25), compared with infants who did not receive antenatal antibiotics (n=22)(median: 58 µg/g, [interquartile, 31-106 µg/g *vs.* median: 132 µg/g, [interquartile, 86-227 µg/g]; p=0.005). Otherwise, there were no statistically significant correlation between fecal calprotectin levels and birth-weight (r=0.08, p=0.59), nor gestational age (r=0.09, p=0.55), or intrauterine growth evaluated by birth weight Z-score (r=0.16, p=0.29).

During survey, the effect of antenatal antibiotherapy on fecal calprotectin values observed in the first fecal samples remained significant. Indeed, in univariate analysis, fecal calprotectin levels were significantly lower in infants whose mothers had received antibiotics *ante* and *per partum* (n=74), compared with infants who did not receive antenatal antibiotherapy (n=73)(median: 94 µg/g, [interquartile, 41-225 µg/g] *vs.* median: 183 µg/g, [interquartile, 94-320 µg/g]; p=0.002) (Fig 1). Likewise, fecal calprotectin levels were significantly lower in infants with postnatal antibiotherapy (n=35), compared with infants without postnatal antibiotherapy (n=112)(median: 97 µg/g, [interquartile, 32-206 µg/g] *vs.* median: 155 µg/g, [interquartile, 77-298 µg/g]; p=0.001). Otherwise, fecal calprotectin levels found in infants who had received enteral feeding the day prior to sampling (n=125) were not significantly different from those obtained in those who had not been fed enterally the day before (n=22)(median: 147 µg/g, [interquartile, 71-268 µg/g] *vs.* median: 113 µg/g, [interquartile, 32-283 µg/g]; p=0.50).

Among the infants receiving enteral feeding, the day before sampling, fecal calprotectin levels were significantly higher in infants who received formulas as their exclusive or predominant

source of feeding (n=21) than in those fed human milk (n=104)(median: 226 µg/g [interquartile, 116-334 µg/g] *vs.* median: 126 µg/g [interquartile, 55-237 µg/g]; p=0.02), and were significantly higher in infants with poor tolerance to enteral feeding (defined by the need to suspend enteral feeding for any day during the week following the day the fecal sample had been obtained) (n=7) than infants with good tolerance to enteral feeding (n=118)(median: 285 µg/g, [interquartile, 208-552 µg/g] *vs.* median: 132 µg/g, [interquartile, 62-260 µg/g]; p=0.008) (Fig 2). By the calculation of the receiver operator curve (ROC), a cut-off level of 205 µg/g of feces was defined for the detection of poor GI tolerance in preterm infants and area under the ROC curve was 0.80±0.06 (p=0.08). The occurrence of a fecal calprotectin higher than the cut-off level of 205 µg/g ('high calprotectin test') had a sensitivity of 1 [CI : 0.72 to 1] and a specificity of 0.65 [CI : 0.58 to 0.72].

Among the one hundred forty seven fecal samples analyzed, fecal calprotectin levels were positively correlated with the volume of enteral feeding (mL/Kg/day)(r=+0.36, p=0.01), postnatal age (r=+0.17, p=0.036) and postconceptional age (r=+0.34, p=0.001) (Fig 3), and negatively correlated with weight gain (expressed in weight Z-score gain)(r=-0.19, p=0.03).

In the samples analyzed by culture methods (n=128), there were significant positively correlations between fecal calprotectin levels and intestinal colonization levels by *Staphylococcus* (r=+0.18, p=0.04), *Enterococcus* (r=+0.19, p=0.03) and *Clostridium* (r=+0.22, p=0.011). In contrast, no significant correlations were found between fecal calprotectin levels and *Enterobacteria* (r=+0.12, p=0.15), nor *Bifidobacterium* (r=+0.11, p=0.19). Nevertheless, fecal calprotectin levels and *Lactobacillus* trended to be positively correlated (r=+0.17, p=0.06).

In multivariate regression analyses, fecal calprotectin correlated negatively with ante and per natal antibiotic treatment (p=0.001), and correlated positively with the volume of enteral feeding (mL/kg/d) (p=0.009), the need to interrupt enteral feeding (p=0.001), and prominent gastrointestinal colonization by *Clostridium sp* (p=0.019) and *Staphylococcus sp* (p=0.047) (Table 2).

DISCUSSION

The findings of the current study confirm that fecal calprotectin levels are elevated in premature infants, compared with older age groups, with a wide range of inter- and intra-individual variation during the first few weeks of life. They further demonstrate that the most significant factors that affect calprotectin excretion are ante and per natal antibiotic tratment, volume of enteral feeding (ml/Kg/day), the occurrence of unplanned interruptions of enteral feeding, and the gastrointestinal bacterial colonization.

The fecal calprotectin levels measured in 147 samples from 47 healthy preterm infants in the current study agree with those previously reported in preterm[14,18,19] and full term infants[14-16,22] and clearly exceed those reported in healthy adults[7] and children[10,15,16]. The high calprotectin levels may reflect the increased transepithelial migration of neutrophil granulocytes and/or macrophages into the intestinal lumen of preterm infants. As Berstad et al reported a significant correlation between calprotectin levels in gut lavage fluid and intestinal permeability[12], the increased migration of neutrophil granulocytes and/or macrophages into the gut lumen might be related to the increased intestinal permeability associated with intestinal mucosal immaturity. Although Van Elburg et al reported higher intestinal permeability in preterm than in term infants[23], fecal calprotectin levels are, however, similar in preterm and full term infants[14]. Thus, the stress induced by birth *per se*, and/or by the adaptation to the extra-uterine life, rather than the degree of mucosal maturation or term of birth, may account for the higher fecal calprotectin levels found in infants, compared to older age groups.

Throughout follow-up, we observed a wide range of inter- and intra-individual variation in fecal calprotectin values, confirming earlier findings in preterm[18-20] and full term infants[16,22]. This wide range of variation is unlikely to result from a poor stability of calprotectin in stools, since calprotectin resists proteolysis, and is stable at room temperature for up to one week[6]. Although stool samples were collected from the baby's diaper in the current study (as in all studies carried out in infants), the sampling technique cannot account for the variation either, since the changes in calprotectin concentrations found in the current study largely exceed what could be accounted for by water absorption[16]. Similarly, the changes observed cannot arise from the ingestion of calprotectin present in human milk, since, in agreement with earlier findings[16], none of the human milk samples we analyzed (n=10, data not shown)

contained any detectable calprotectin (threshold: 15 mg/L). Taken in aggregate, data from the current study and earlier reports therefore suggest the wide range of calprotectin values measured may indeed reflect true inter- and intra-individual variability in calprotectin fecal excretion in that patient population.

In the current study, the first values of fecal calprotectin levels were obtained in infants at ≈ 11 days of life, and are lower than those reported in meconium by other workers[17,18]. In univariate analysis, gestational age, birth weight and mode of delivery were not significant correlated with fecal calprotectin values, supporting earlier reports[18,19]. Although Laforgia et al reported a positive correlation between meconium calprotectin levels and gestational age, and a negative correlation with birth weight, such correlation was found in a heterogeneous population including both preterm and full term infants, rather than within a homogenous population of preterm infants, such as that enrolled in our study[17]. Consistent with earlier reports[17-19], gender did not affect calprotectin in our population. Although other workers[17,18] have shown significant correlation between calprotectin and Apgar score at 5 and 10 minutes, we couldn't conclude on this point because 98% of our infants had an Apgar score at 5 minutes >7. In univariate analysis, calprotectin values found in the first fecal samples correlated negatively with ante and per natal antibiotics (p=0.005). Likewise, the effect of ante and per natal antibiotics on fecal calprotectin excretion was found in all fecal samples in univariate and multivariate analyses (p=0.02 and p=0.001, respectively). To best of our knowledge, the current study is to demonstrate the effect of ante and per natal antibiotic therapy on postnatal fecal calprotectin. Moreover, we observed a negative correlation between calprotectin and the use of antibiotics in postnatal life in univariate analysis (p=0.001). However, in contrast to other studies[18], this correlation did not remain significant in multivariate analysis. The correlation reported by Josefsson et al between calprotectin and antibiotics treatment, was, however, only observed for cefotaxim and meropenem. Otherwise, in univariate analysis, postnatal age and postconceptional age were significantly positively correlated with fecal calprotectin values. However, in contrast to Josefsson et al[18], this correlation did not remain significant in multivariate analysis, and is in consistent with studies by Campeotto et al[19]. As other workers[18,19], we found no significant correlation between fecal calprotectin and type of feeding (formulas as exclusive or predominant source of feeding *vs.* human milk) in univariate analysis.

Consistent with earlier report[18], we observed a highly significant, positive correlation between the volume of enteral feeding (ml/Kg/day) and fecal calprotectin values in multivariate

analysis (p=0.009). Moreover, we demonstrate for the first time that intestinal bacterial colonization may have a significant effect on fecal calprotectin values. We indeed observed that: 1) in univariate analysis, intestinal colonization by *Staphylococcus* (p=0.04), *Enterococcus* (p=0.03) and *Clostridium* (p=0.011) correlated positively with fecal calprotectin values; and 2) in multivariate analysis, the correlations between the intestinal bacterial colonization by *Clostridium* or *Staphylococcus* and fecal calprotectin were significant (p=0.019 and p=0.047, respectively). Taken in aggregate, these findings suggest dietary antigens and/or commensal intestinal bacteria might stimulate the migration of granulocytes through the intestinal wall or activate the immune system, both inducing a state of "physiological", subclinical intestinal inflammation in preterm infants as well as in term infants. It is tempting to speculate that intestinal bacteria, and specific, individual components of the commensal microbiota might have variable abilities to stimulate transepithelial granulocyte migration and/or to induce calprotectin release from leucocytes and macrophages, as shown in gnotobiotic piglets colonized with various strains of *Escherichia coli*[24]. Moreover, both ante- and post-natal antibiotic treatment (factors known to delay gut bacterial colonization) correlated negatively with fecal calprotectin levels, whereas in contrast, gestational age and postconceptional age (factors knows to favor the gut bacterial colonization) correlated positively with fecal calprotectin levels.

Despite the high calprotectin levels observed in healthy infants, calprotectin was proposed as a candidate, non invasive marker of gastrointestinal disease[18-20]. Carroll et al indeed reported elevated fecal calprotectin excretion in preterm infants with clinical features of necrotizing enterocolitis (NEC), and suggested calprotectin might be an early marker of NEC in that population[20]. In the latter study, the fecal calprotectin levels found in the small control group (n=7) were, however, relatively low, compared with the levels observed in healthy preterm infants in later studies by other workers[14,18-19], and in the current study as well. As a matter fact, although Caroll et al proposed fecal calprotectin levels >200 µg/g to be specific for NEC[20]. Fecal calprotectin levels >205 µg/g were found in 85% obtained in infants who had good digestive tolerance to enteral feeding without any sign of NEC. Josefsson et al reported calprotectin fecal values were > 2000 µg/g in 3 cases of 4 NEC[18]. In the current study, we did not observe any case of NEC, and all fecal calprotectin values were < 2000 µg/g, supporting earlier report by Josefsson et al[18]. The current data suggest that high fecal calprotectin values (> 205 µg/g) may not, unfortunately, be used as a predictive test for poor digestive tolerance

to feeding, since 85% of samples with fecal calprotectin excretion > 205 µg/g were associated with good digestive tolerance.

Finally, the current study confirms that fecal calprotectin levels are elevated in premature infants, with a wide range of inter- and intra-individual variation during the first few weeks of life. These high levels might reflect a state of physiological intestinal inflammation due to the adaptation to bacterial establishment and enteral feeding. The enhanced expression of this protein possessing many potential functions including antimicrobial properties, could be of benefit for the developing gut in both term and premature infant.

ACKNOWLEDGMENTS

Carole Rougé was the recipient of a doctoral research fellowship from Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Switzerland). Part of this work was supported by grants from : the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2004) from the French Ministry of Health, and the Délégation à la Recherche Clinique (DRC 2004), CHU de Nantes. We thank N. Kapel and NA. Benahmed (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire de coprologie fonctionnelle, Paris, France) for advice, and gratefully acknowledge the parents of the infants who took part in the study.

REFERENCES

1. Berntzen HB, Fagerhol MK. L1, a major granulocyte protein; isolation of high quantities of its subunits. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:769-74.

2. Brun JG, Ulvestad E, Fagerhol MK, Jonsson R. Effects of human calprotectin (L1) on in vitro immunoglobulin synthesis. *Scand J Immunol* 1994;40:675-80.

3. Steinbakk M, Naess-Andressen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336:763-5.

4. Sohnle PG, Collins-Lech C, Wiessner JH. The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. *J Infect Dis* 1991;164:137-42.

5. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andressen CF, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* 1997;50:113-23.

6. Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. Scand J Gastroenterol 1992;27:793-798.

7. Ton H, Brandsnes, Dale S, Holtlund J, Skuibina E, Schjonsby H, et al. Improved assay for fecal calprotectin. *Clin Chim Acta* 2000;292:41-54.

8. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis* 2003;35:642-7.

9. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic

diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem* 2003;49:861-7.

10. Fagerberg UL, Lööf L, Myrdal U, Hansson LO, Finkel Y. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:450-5.

11. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:50-4.

12. Berstad A, Arslan G, Folvik G. Relationship between intestinal permeability and calprotectin concentration in gut lavage fluid. *Scan J Gastroenterol* 2000;35:64-9.

13. Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:171-7.

14. Nissen AC, van Gils CE, Menheere PP, Van den Neucker AM, van der Hoeven MA, Forget PP. Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:107-8.

15. Rugtveit J, Fagerhol MK. Age-dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:323-4; author reply 324-5.

16. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children.. *Acta Paediatr* 2002;91:45-50.

17. Laforgia N, Baldassarre ME, Pontrelli G, Indrio F, Altomare MA, Di Bitonto G, et al. Calprotectin levels in meconium. *Acta Paediatr* 2003;92:463-6.

18. Josefsson S, Bunn SK, Domellof M. Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44:407-13.

19. Campeotto F, Kalach N, Lapillonne A, Butel MJ, Dupont C, Kapel N. Time course of faecal calprotectin in preterm newborns during the first month of life. *Acta Paediatr* 2007;96:1531-3.

20. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnostis of necrotising enterocolitis. *Lancet* 2003;361:310-311.

21. Nash S, Stattford J, Madara JL. Effects of polymorphonuclear leucocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1987;80:1103-4.

22. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derrieux S, Aubert-Jacquin C, Barbot L, et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89:F353-5.

23. Van Elburg RM, Fetter WP, Bunkers Cm, Heymans HS. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F52-5.

24. Splichal I, Fagerhol MK, Trebichavsky I, Splichalova A, Schulze J. The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with Escherichia coli on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. *Immunobiology.* 2005;209:681-7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Boxplot of fecal calprotectin levels (µg/g of feces) in preterm infants with antenatal antibiotherapy (n=74) and in preterm infants without antenatal antibiotherapy (n=73), following the postconceptional age (weeks). The boxplot shows the median (central horizontal line) and includes the 25^{th} (lower box border) to 75^{th} percentile (upper box border).

Figure 2. Boxplot of fecal calprotectin levels (µg/g of feces) in preterm infants without poor tolerance to enteral feeding (i.e., without unplanned enteral feeding interruption, n=124), and in preterm infants with poor tolerance to enteral feeding (i.e., with unplanned enteral feeding interruption, n=7). The boxplot shows the median (central horizontal line) and includes the 25^{th} (lower box border) to 75^{th} percentile (upper box border). Dotted line represents cut-off level (205 µg/g of feces) for fecal calprotectin.

Figure 3. Relationship between fecal calprotectin concentration (µg/g of feces) and postconceptional age (weeks) in 47 preterm infants. Circles with different shades of gray depict the different classes of postnatal age. Fecal calprotectin levels increased significantly with postnatal age ($p=0.036$) and postconceptional age ($p=0.01$).

Figure 1

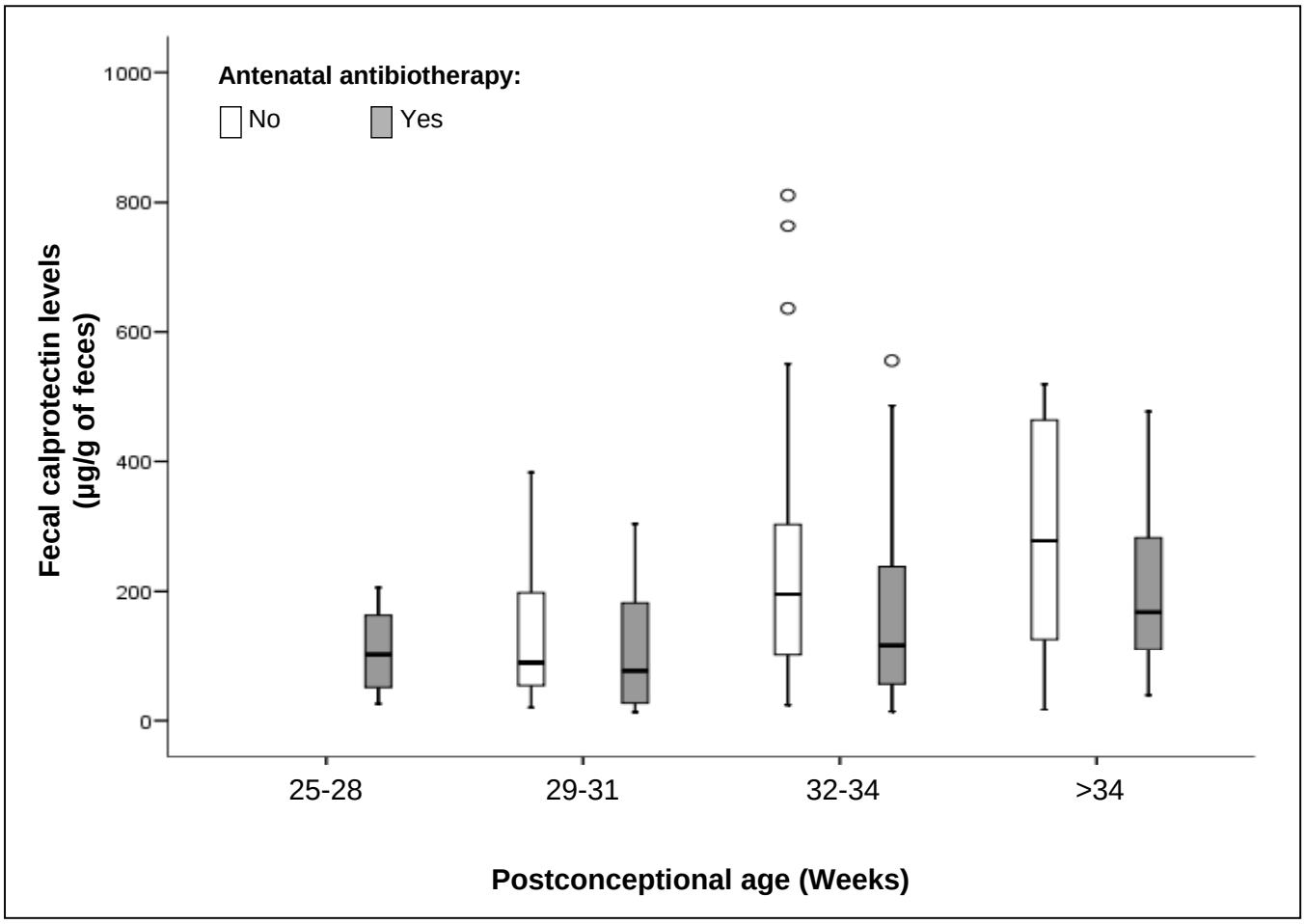
Antenatal antibiotherapy:
No
Yes
Fecal calprotectin levels (µg/g of feces)
1000
800
600
400
200
0
25-28
29-31
32-34
>34
Postconceptional age (Weeks)

Figure 2

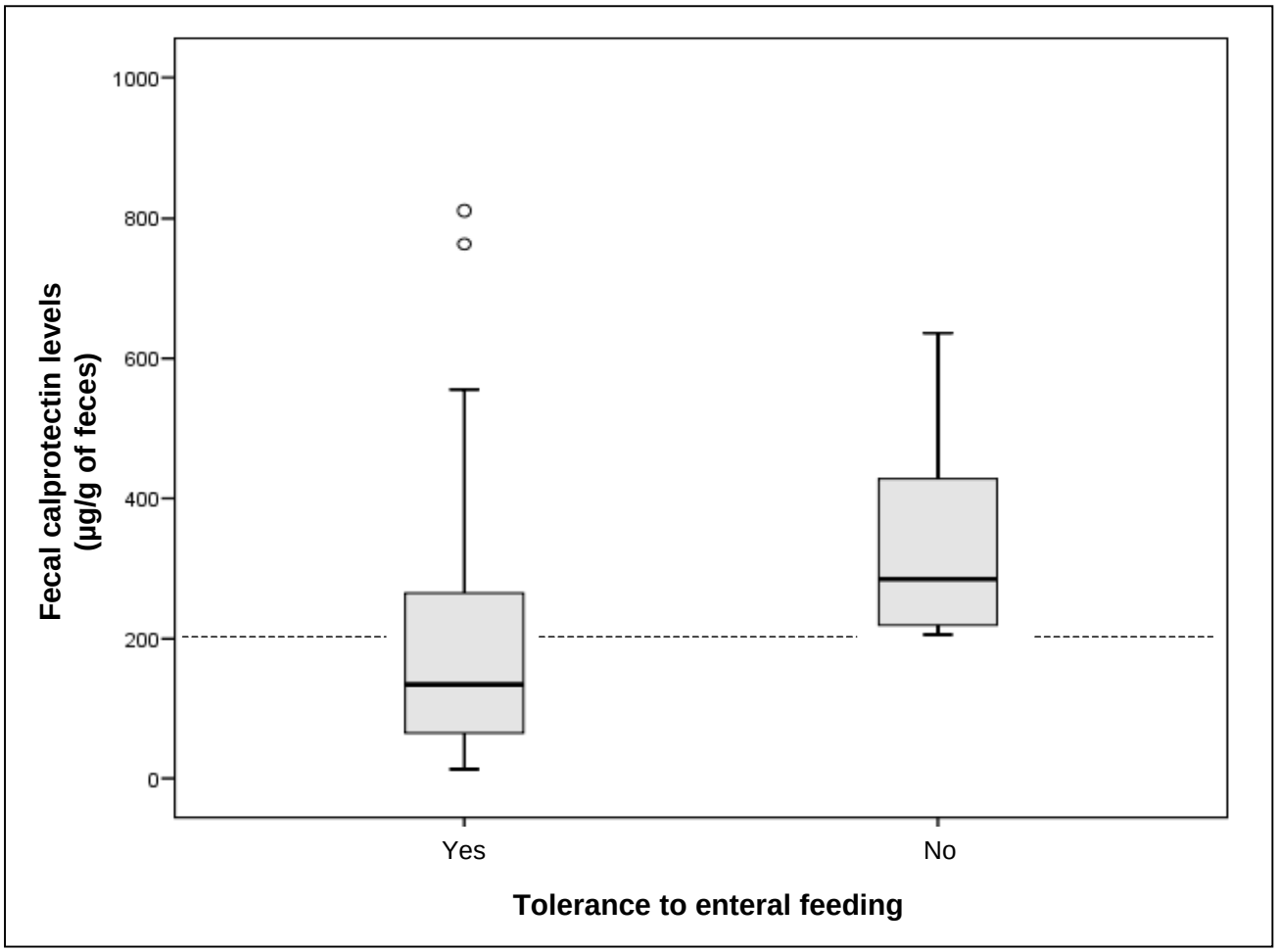
1000
800
600
400
200
0
Fecal calprotectin levels (µg/g of feces)
Yes
No
Tolerance to enteral feeding

Figure 3

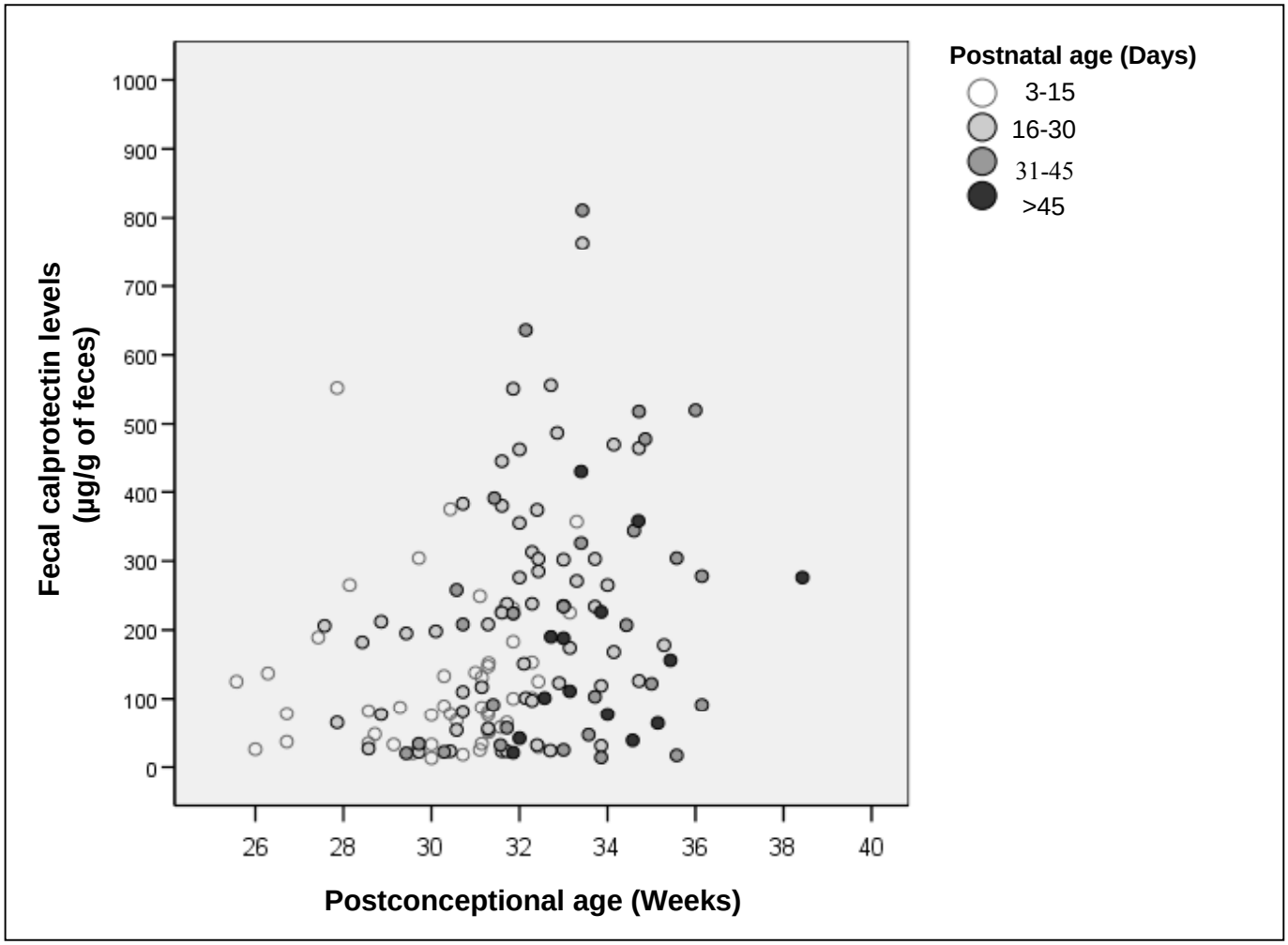
Fecal calprotectin levels (µg/g of feces)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
26
28
30
32
34
36
38
40
Postconceptional age (Weeks)
Postnatal age (Days)
3-15
16-30
31-45
>45

Table 1. Bacterial colonization in enrolled preterm infants from week 1 to week 6.

	Weeks 1-2 (n=43)[a]			Weeks 3-4 (n=39)			Weeks 5-6 (n=22)		
	Colonized infants			Colonized infants			Colonized infants		
	No infants	median	range	No infants	median	range	No infants	median	range
Aerobic genera									
Staphylococci	41 (95%)[b]	7.4[c]	3.3-8.8	39 (100%)	7.3	3.8-9.5	21 (95%)	6.9	3.8-8.2
Enterococci	5 (12%)	5.3	3.3-8.8	11 (28%)	6.1	3.9-9.0	9 (41%)	6.5	4.7-10.1
Enterobacteria	14 (33%)	8.4	3.3-9.5	21 (54%)	8.8	3.3-10.0	13 (59%)	8.5	5.0-9.2
Lactobacilli	23 (53%)	7.4	3.3-9.0	26 (67%)	7.1	3.6-9.4	14 (64%)	6.1	3.6-8.7
Anaerobic genera									
Bacteroides	1 (2%)	8.4		1 (3%)	6.1		1 (5%)	6.6	
Clostridium	11 (26%)	5.9	3.3-9.0	22 (56%)	6.9	3.3-8.2	13 (59%)	6.0	4.1-7.5
Bifidobacteria	16 (37%)	6.2	3.3-9.1	14 (36%)	5.7	3.3-10.0	9 (41%)	4.8	3.3-8.4

[a] number of analyzed infants
[b] number of colonized infants (%)
[c] bacterial counts expressed as $\log_{10}$ CFU/g of feces, threshold = 3.0

Table 2. Main explanatory variables found by multivariate analysis for fecal calprotectin values.

Variables	**Non standardized coefficient**	**Standardized coefficient**	**p-value**
(R^2=0.32, n=125)			
Ante/per natal antibiotic treatment (yes/no)	-0.558	-0.276	0.001
Volume of enteral feeding (mL/Kg/d)	+0.004	+0.236	0.009
Unplanned interruptions of enteral feeding (yes/no)	+0.920	+0.257	0.001
Clostridium (> 10^5 CFU/g of feces) (yes/no)	+0.468	+0.206	0.019
Staphylococcus (> 10^5 CFU/g of feces) (yes/no)	+0.347	+0.206	0.047

ETUDE 3 : La chromatographie liquide haute performance dénaturante pour l'analyse de la colonisation bactérienne intestinale chez le nouveau-né prématuré.

Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Legrand A, Göbel U, Rozé JC, Darmaun D, Butel MJ et De la Cochetière MF.

Soumis à Applied and Environmental Microbiology.

La mise en place du microbiote intestinal chez le nouveau-né à terme a été largement étudiée, révélant la complexité des processus impliqués. Initialement stérile à la naisance, le tractus gastro-intestinal de ces enfants est rapidement colonisé par des bactéries maternelles et environnementales. La colonisation est influencée par de nombreux facteurs incluant par exemple, le mode d'accouchement, l'environnement, le régime alimentaire ou encore l'antibiothérapie administrée à la mère en *per partum* et/ou à l'enfant après la naissance. Bien que l'âge gestationnel puisse aussi affecter la colonisation bactérienne intestinale, peu d'études ont été réalisées chez le nouveau-né prématuré. Comparé au nouveau-né à terme, le tractus gastro-intestinal du nouveau-né prématuré est colonisé plus tardivement, et avec un nombre plus restreint d'espèces bactériennes. L'implantation anormale du MI chez le nouveau-né prématuré pourrait affecter l'homéostasie intestinale, puisque le microbiote commensal stimule un grand nombre de fonctions intestinales, comme par exemple la maturation intestinale postnatale, le maintien de l'effet barrière mucosale et l'absorption des nutriments. Or ces altérations peuvent être par elles mêmes responsables de pathologies à point de départ digestif comme l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN), maladie de physiopathologie complexe, où la colonisation bactérienne est un des éléments clés.

Au vu des données de la littérature, il semble important de contrôler le MI du nouveau-né prématuré et de comprendre les processus impliqués dans l'établissement d'une communauté bactérienne. Les connaissances que nous avons actuellement du MI du nouveau-né prématuré sont essentiellement basées sur l'utilisation de techniques dépendantes de la culture qui sont des méthodes expérimentalement longues et lourdes. Bien que de nombreuses méthodes indépendantes de la culture basées sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S aient été

développées, peu d'entre elles ont été utilisées pour caractériser le MI du nouveau-né prématuré.

La chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC) a été utilisée dans un premier temps, pour détecter les variations de séquences d'ADN, puis dans un deuxième temps, pour discriminer différents amplicons d'ADNr 16S, permettant l'identification de bactéries au niveau de l'espèce et du biotype. Et enfin, très récemment, cette méthode a été adaptée à l'analyse de communautés bactériennes complexes, tels que les bactéries marines et le MI de l'homme adulte. A notre connaissance, la DHPLC n'a jamais été utilisée pour caractériser le MI du nouveau-né prématuré.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a été d'évaluer l'utilisation de la DHPLC pour étudier la mise en place du MI chez le nouveau-né prématuré, en comparaison avec des techniques classiques de culture et des méthodes moléculaires bien établies, incluant l'électrophorèse dénaturante en gradient de température (TTGE) et l'inventaire moléculaire.

Des échantillons fécaux ont été collectés toutes les semaines chez 10 nouveau-nés prématurés, durant leur hospitalisation en unité de soins intensifs. Les enfants avaient un âge gestationnel moyen de 29 SA (28-32 SA) et un poids de naissance moyen de 1233 g (935-1450 g). Les bactéries présentes dans les échantillons fécaux ont été identifiées par DHPLC, culture et TTGE, ainsi que par inventaire moléculaire.

Les résultats obtenus par les quatre méthodes (DHPLC, culture, TTGE et inventaire moléculaire) montrent que le tractus gastro-intestinal du nouveau-né prématuré de moins de 33 SA héberge un nombre restreint d'espèces bactériennes. Basées sur les analyses moléculaires, les espèces bactériennes identifiées dans les selles des nouveau-nés prématurés étaient cultivables et correspondaient à des espèces connues appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Aucune bactérie non cultivable n'a été trouvée lors de notre analyse moléculaire. Dans notre étude, les changements majeurs des populations bactériennes intestinales observés chez le nouveau-né prématuré ont été identifiés de façon fiable par les méthodes utilisées. La présence ou l'absence de signal sur les profils TTGE et DHPLC était associée avec la présence ou l'absence d'espèces bactériennes identifiées par culture. Dans la plupart des cas, les espèces bactériennes identifiées après séquençage des bandes TTGE ou

des profils DHPLC étaient similaires à celles identifiées par culture. Parmi les 4 méthodes utilisées, l'inventaire moléculaire était la méthode la plus sensible pour étudier la composition du microbiote intestinal du nouveau-né prématuré. La TTGE était moins sensible que la DHPLC mais un peu plus sensible que la culture. La DHPLC a fourni des résultats reproductibles avec une faible variabilité intra- et inter- jour et a permis de détecter la majorité des espèces identifiées par les 3 autres méthodes.

A notre connaissance, notre étude est la première à avoir caractérisé le microbiote intestinal du nouveau-né prématuré par DHPLC et à montrer que la DHPLC constitue un outil moléculaire intéressant, en terme de rapidité, de facilité et de sensibilité pour étudier les dynamiques de populations bactériennes intestinales, chez le nouveau-né prématuré.

Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for analyzing intestinal bacterial colonization in preterm infants.

Carole Rougé[1], Oliver Goldenberg[2], Laurent Ferraris[3], Arnaud Legrand[4], Ulf Göbel[5], Jean-Christophe Rozé[4], Dominique Darmaun[1], Marie-José Butel[3], Marie-France De La Cochetière[6].

[1]INRA UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRA and University of Nantes ; Human Nutrition Research Center (CRNH), Nantes, France

[2]Transgenomic Ltd., Glasgow, UK

[3]EA 4065, Ecosystème Intestinal, Probiotiques, Antibiotiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France

[4]INSERM, CIC 0004 ; Neonatal intensive care unit, Hôpital Mère-et-Enfant, CHU de Nantes, France

[5]Institut für Mikrobiologie and Hygiene, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, Dorotheentraße 96, D-10117 Berlin, Germany

[6]EA 3826, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des infections, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, France

Address for correspondence:

Marie-France De la Cochetière, PhD

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, UFR Médecine, rue G. Veil

Thérapeutiques cliniques et expérimentales des maladies infectieuses, EA 3826

F- 44000 Nantes, France

Telephone: 33 2 40 41 28 40 Fax: 33 2 40 41 28 54

e-mail: mfdlc@nantes.inserm.fr

ABSTRACT

The delayed intestinal colonization process in preterm infants is claimed to affect intestinal homeostasis leading to a higher risk of gastrointestinal diseases. The aim of the current study was to assess the use of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) as a new molecular tool for monitoring the population dynamics in the intestinal microbiota of preterm infants in comparison with conventional culture techniques and established molecular methods. Fecal samples were collected weekly from ten preterm infants during their stay in the neonatal intensive care unit. The infants had a mean gestational age of 29 weeks (range: 28-32 weeks) and a mean birth weight of 1233 g (range: 935-1450 g). Bacteria colonization was assessed using DHPLC as well as established methods such as laboratory culturing, temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), and DNA library sequencing. Each of these approaches indicated that gastrointestinal tract of preterm infants is inhabited by only a few bacteria species. Based on molecular analyses, bacterial species identified in stools of preterm infants were cultivable bacteria and corresponded to known species belonging to the genus *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. No non cultivable bacteria was found by the molecular techniques. Our data demonstrate that DHPLC is a useful molecular tool in terms of speed, labour and sensitivity for studying the composition of the gut microbiota of preterm infants.

INTRODUCTION

The acquisition of the gut microbiota in neonates has been extensively studied, revealing the complexity of the processes involved. Initially sterile, the gastrointestinal tract of newborn is rapidly colonized by bacteria from both the vaginal and fecal maternal flora, as well as the surrounding environment, until a dense and complex population of bacterial microbiota is established. Colonization is influenced by various factors such as mode of delivery, diet, and antibiotic treatment (10, 26). Although gestational age can also affect bacterial colonization, few studies have been performed in preterm infants. The main consequence of premature birth for the microbiota is a delayed and an abnormal pattern of gut colonization, particularly by beneficial bacteria such as bifidobacteria which are normally dominant in full term infants (4, 13). This impaired intestinal colonization is proposed to affect intestinal homeostasis as the commensal microbiota stimulates a range of important intestinal functions, from postnatal intestinal maturation to maintenance of the mucosal barrier and nutrient absorption (6, 17). Disruption of colonization leads to a higher risk of gastrointestinal diseases, e.g. necrotizing enterocolitis (NEC) (7, 8). Therefore, it is important to monitor the gut microbiota in this population, and to understand the processes involved in the establishment of a microbial community. Current knowledge of the gut microbial ecology in preterm infants is mainly based on the use of classical culture-dependent techniques (2, 13, 28), which are laborious and time-consuming. Although various culture-independent methods based on analysis of 16S rRNA gene sequences have been developed, few of them have been applied to the characterization of the intestinal microbiota in preterm infants (21, 22, 27).

Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) was primarily applied to detect DNA sequence variations (12, 18). It has also been used to discriminate between PCR-

amplified bacterial 16S rRNA genes allowing identification of bacteria at the species level or/and biotype level (9, 11). This method has been further successfully adapted for the analysis of complex microbial communities such as marine bacteria (1) and gut microbiota of adults (15). However, this method was never applied to the analysis of intestinal microbiota of preterm infants.

The aim of the current study was to investigate the use of DHPLC for studying the population dynamics in the intestinal microbiota of preterm infants. We used culture-based analysis as the gold-standard for comparison with already established molecular methods (TTGE and DNA library) and the new DHPLC method.

MATERIALS AND METHODS

Patients and fecal sampling.

Ten preterm infants were recruited among patients admitted to a neonatal intensive care unit (NICU) at Nantes University Medical Center (France). Signed, written consent was obtained from the parents, according to the policies defined by the local ethical comitee (Comité de Protection des Personnes des Pays de la Loire). Fecal samples were collected weekly from the infants during their stay in the NICU. The samples were placed in two sterile tubes, one of them containing 0.5 mL of brain heart infusion (BHI) with glycerol 15% as a cryoprotective agent. All samples were immediately frozen at -80°C until analysis.

Culture analysis of the intestinal microbiota.

After thawing the samples collected in BHI, serial dilutions from 10^{-2} to 10^{-6} were performed and spread using the automatic spiral system (Chemunex-AES Laboratoire, Bruz, France) on various media allowing the isolation of main genera of the faecal flora, as previously described (5). Media used in the current study are listed in table 1. All plates were incubated at 37°C, with plates for strict anaerobes and Rogosa agar placed in an anaerobic chamber (duScientific, Chemunex-AES Laboratoire). Aerobic cultures were examined after 24 and 48 hours of incubation and anaerobic cultures after 48 hours and 5 days of incubation. Bacterial counts were expressed as the $\log_{10}$ CFU/g of feces and the count threshold was 3 $\log_{10}$ CFU/g of feces. Routine laboratory methods and Wadsworth Laboratory procedures (19) allowed identification of aerobic and anaerobic bacteria, respectively. Bifidobacterua were identified using a Gram stain, morphologic characteristics, the presence of fructose-6-phosphate phosphoketolase activity (F6PPK), and PCR amplification with 16S rRNA gene-targeted genus-specific primers using a method adapted from Kok (20). The species were determined

using a multiplex polymerase chain reaction (PCR) (23). When necessary, species identification of species was performed using 16S rRNA gene sequence.

DNA extraction from fecal samples.

Total DNA was extracted by a bead beating method from 150 mg of fecal samples (14). Nucleic acid concentration and integrity were determined visually by electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide. DNA extracts were used to analyze the 16S rRNA gene by TTGE, DHPLC and DNA library analysis.

TTGE analysis.

The V6 to V8 regions of the bacterial 16S rRNA gene from the fecal DNA extracts were amplified using the primers U968-GC and L1401 as previously described (Table 2) (8). Samples were amplified in a PCT 100 thermocycler (MJ Research, Inc), using the following program: 95°C for 15 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, 72°C for 1 min, and finally 72°C for 15 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide to check their sizes (~500 bp) and estimate concentration. The DCode universal mutation detection system (Bio-Rad, Paris, France) was used for sequence-specific separation of PCR products. Electrophoresis was performed as previously described (8). Each well was loaded with approximately 100 ng of amplified DNA and loading was normalized to comparable standards A marker was created to allow standardization of band migration and gel curvature among different gels, by individually PCR-amplifying DNA extracted from seven intestinal bacterial strains using the same universal primers (in order of migration: *Staphylococcus epidermidis, Clostridium perfringens, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Bifidobacterium longum and Lactobacillus gasseri*). After electrophoresis, gels were stained

in the dark by immersion for 30 min in a solution of SYBR Green I nucleic acid gel stain (Sigma-Aldrich, S^{t} Quentin Fallavier, France), and viewed using the Gel Doc 2000 system (Bio-Rad, Paris, France). The number of bands was used as an indicator of biodiversity. Bands of interest were excised from the TTGE gels and sequenced (Plateforme de séquencage, IFR26, Nantes, France).

DHPLC analysis.

Bacterial 16S rRNA genes were amplified using 20-100 ng fecal DNA extracts. Primers F-968-30GCT and R-1378 (Table 2), complementary to regions flanking the variable regions V6-V8 of the 16S rRNA, were used to generate amplicons of about 400 base pairs (bp) in size as previously described (15).

Purified PCR products containing bacterial 16S rRNA gene segments were separated by DHPLC on a DNASep® HT cartridge (Transgenomic) as described previously (15). PCR products were then detected and visualized with an HSX-3500 fluorescence detector. The analysis was accomplished with the Navigator^{TM} software version 1.5.4 (Build 23) (Transgenomic). 16S rDNA amplicons separated by DHPLC were collected with the DNA fragment collector FCW 200 (Transgenomic), purified, re-amplified and sequenced (Plateforme de séquençage, IFR26, Nantes, France).

Calculation of similarity indices.

Indices of similarity (%) were calculated for TTGE and DHPLC profiles using the Gelcompar II® software (AppliedMaths) and the Bionumerics® software (AppliedMaths), respectively. Major changes in intestinal microbiota were defined when similarity values calculated between band patterns TTGE or peak profiles DHPLC were less than 50%.

16S rRNA gene libraries.

Fecal DNA extracts were used as templates to amplify 16S rRNA genes using the primers TPU1 and RTU8 (Table 2). The PCR mixture contained approximately 100 ng template DNA, 0.3 µM of the respective primers, 1X PCR buffer (Applied Biosystems), 2.5 mM magnesium chloride (Applied Biosystems), 200 µM dNTPs (Roche), 400 ng BSA (Fermentas) and 5 U AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems), in a T3 thermocycler (Biometra). Amplification was performed using the following program: initial denaturation for 7 min at 95°C followed by 30 cycles of 30 s at 93°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C, and a final elongation for 30 min at 72°C. Purified PCR products (PCR Purification Kit, Qiagen) were cloned using the TOPO TA Cloning Kit (Version Q, Invitrogen, UK) following the manufacturer's instructions. Cloned 16S rRNA gene fragments were re-amplified using the primers M13-(20) and M13-rev (Table 2) as recommended by Invitrogen, followed by sequencing of the fragments on a CEQ8000 capillary sequencer (BeckmanCoulter) using the DTCS Sequencing Kit (BeckmanCoulter) and instructions recommended by the manufacturer.

Sequence analysis.

Bacterial 16S rRNA gene sequences were compared to entries in databases by using the BIBI software (http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/) and the Blast software (www.ncbi.nlm.nih.gov) and aligned with the Multalin software (http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html) and the ClustalW software (www.bioasp.nl). When similarity indices between our sequences and previously described sequences exceeded 98%, the sequences were considered to correspond to the same species.

RESULTS

Characteristics of the infants and fecal samples.

The ten infants enrolled had a mean gestational age of 29 weeks (ranging from 28 to 32 weeks), a mean birth weight of 1233 g (ranging from 935 to 1450 g) (Table 3), and had no disease. They were delivered either vaginally (n=3) or by caesarean section (n=7). All were fed with human milk (bank milk and/or their own mother's milk), supplemented for three of them with a standard preterm formula. Three of them received a mixture of probiotics, i.e. *Bifidobacterium longum* BB536 (Morinaga Milk Industry Co., Ltd., Japan) and *Lactobacillus rhamnosus* GG (Valio, Ltd., USA) (LGG) (10^8cfu, four times a day), from the day of initiation of enteral feeding until hospital discharge. During survey, nine preterm infants received antibiotics [range, 2-23 days], including broad-spectrum cephalosporins, amoxicillin, ticarcillin, glycopeptides, aminosides and/or rifamycin, used either alone or in combination survey.

Thirty-nine fecal samples were collected with an average of 3.9 samples per infant. All samples were analyzed by TTGE, DHPLC, and culture except one sample was omitted from the culture analysis because the sample size was too small. Four samples belonging to four different infants (infants A, D at week 1; infants B, C at week 3) were further analyzed by DNA library sequencing.

Comparative analysis of the 39 fecal samples in the 10 infants.

The data from culture-based analyses showed that gastrointestinal tract of all infants was poorly colonized, harboring no more than seven bacterial species at the time. The most commonly bacteria isolated were staphylococci (Table 4). At week two, all infants were colonized at a high median level with coagulase negative staphylococci (7.6 CFU/g of feces).

Four were also colonized with *Staphylococcus aureus.* Colonization by enterococci occurred in four infants, two of them being colonized at a low level. Enterobacteria were isolated in two infants from week three (infant C) and week five (infant A). With regard to anaerobes, *Bacteroides* were isolated only in one vaginally-born infant at a median level of 5.1 CFU/g feces. In contrast, clostridia were found more frequently with five infants colonized during the survey at a level ranging between 3.3 and 7.1 CFU/g feces. Clostridia colonization occurred from week three onwards, and the occurrence rate increased further with time. Four infants (A, C, D and H) were colonized with bifidobacteria, confirmed to be the probiotic strain, at a median level of 6 CFU/g feces. These four infants were also colonized with the probiotic strain *Lactobacillus* GG at a median level of 7.4 CFU/g feces. LGG was also isolated at different time during the survey in three other infants (infants E, I, J) at a median level of 8.0 CFU/g feces.

TTGE analysis.

The TTGE profiles of all preterm infants showed a low diversity of microbiota expressed by the number of 16S rRNA gene fragments present in the gel (Figure 1). The number of major bands in individual infants ranged from zero to ten. During survey, all infants had minor changes, including appearance, disappearance or difference in relative intensity of individual bands. Nevertheless, major changes of band patterns were observed in six infants (A, B, E, H, I and J) and were principally linked to administration of antibiotics and/or modification of enteral nutrition. In most cases, the presence or absence of bands in the TTGE profiles was associated with the presence or absence of bacterial species studied by culture-based methods.

The most frequent bands present in the TTGE profiles of seven infants were sequenced and identified in the BIBI and the Genbanq databases. Forty sequences were analyzed: 30 showed

more than 98% identity with the V6-V8 region of 16S rRNA genes of cultivable human intestinal bacteria, three showed less than 98% identity and seven gave poor sequence unsuitable for analysis. Sequences analyzed were identified as *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *H. parainfluenzae*, *B. longum* and *L. casei/paracasei/rhamnosus*. The sequences corresponding to *Staphylococcus sp.* were present in all infants. *Clostridium spp.* was identified in one infant (infant B) and *H. parainfluenzae* in infant E. With regard to lactic acid bacteria, *Bifidobacterium longum* was identified in five infants and *Lactobacillus rhamnosus* in three infants. The sequence comparison between TTGE bands and strain sequences showed a high (>98%) similarity. In most cases the bacterial species identified by culture were similar to those identified using TTGE.

DHPLC analysis.

The diversity of peaks illustrating the amount of 16S rRNA gene fragments in the DHPLC chromatograms was low in all samples (Figure 1). The number of distinct peaks observed in DHPLC profiles varied between four and nine and the retention time ranged from two to eleven minutes. Two fecal samples from one infant (infant F) gave no amplification, most likely due a low amount of DNA. The peak patterns varied in all infants, with minor changes, as indicated by appearance, disappearance or difference in relative intensity of individual peaks. Major changes in the peak patterns were observed in six infants (A, B, D, E, H and I) and were comparable with changes observed by TTGE and culture. These major changes were principally linked to administration of antibiotics and/or modification of enteral nutrition.

The most frequent peaks present in the DHPLC profiles of the four selected samples were collected, sequenced, and identified. Thirty-five sequences were analysed: 20 showed more

than 98% identity with the V6-V8 region of 16S rRNA gene of cultivable human intestinal bacteria, fourteen showed less than 98% identity and one gave poor sequence. The sequences analyzed were identified as *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *B. longum* and *L. casei/paracasei/rhamnosus.*

Comparative analysis of the four selected samples in 4 infants.

Four samples were subjected to DNA library sequencing following the fingerprinting analysis (one sample each from infants A and D at week one and one sample each from infants B and C at week three). Analysis of the 16S rRNA gene libraries showed a low biodiversity of the microbiota of these samples. A total of 43 out of 54 clones analyzed showed more than 98% identity with the V6-V8 region of 16S rRNA gene from cultivable human intestinal bacteria, five showed less than 98% identity and six gave poor sequence. Sequences analyzed belonged to genus *Staphylococus*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus.* All of them corresponded to cultivable species classified into eight taxonomic units.

Comparative analysis of the four selected samples.

The four selected samples belonging to four infants were analyzed by each of the four methods. Bands of TTGE and peaks of DHPLC were collected and sequenced for identification (Table 5). All infants were colonized by staphylococci, which were detected by the four methods but in one sample with DHPLC. One infant was colonized by enterobacteria (infant C). This colonization was not detected by TTGE.

As for the anaerobic bacteria, clostridia were found in one infant (B) and detected by all methods and identified as *C. neonatale* by DNA library sequencing and as *C. butyricum* by culture. These species are very close phylogenetically. *Bacteroides* was detected in infant A

only by DNA library sequencing. Three infants were colonized by lactobacilli. This colonization was not detected by culture for infant A, by TTGE for infant C, and was detected only by DNA library sequencing for infant D. Finally, bifidobacteria colonization was not detected by culture in infants A and D, and by TTGE and DNA library sequencing in infant C.

DISCUSSION

The current study is the first to use the DHPLC technique to assess intestinal microbiota in preterm infants, and demonstrates this technique is a powerful tool for use in this application. The strength of our study was to compare DHPLC both with a previously established culture-independent method, i.e. TTGE, and with conventional culture technique. Moreover, a DNA library sequencing was used to complete the microbiota analysis.

Our results show that the gastrointestinal tract of preterm infants born at a gestational age less than 33 weeks harbours a small bacterial community. This is in accordance with the recent studies which highlighted the paucity of the gut microbiota, especially in terms of anaerobic genera (8, 13, 21, 27). In contrast to adults' intestinal microbiota, all bacterial species identified in the fecal samples of the preterm infants were found to be cultivable species. Several groups have reported that up to 80% of the bacterial species which compose the dominant gut microbiota in healthy adults are not represented in existing culture collections (29, 30). However, recent findings in preterm infants using various culture-independent techniques such as DDGE, TTGE, DNA library sequencing, showed that non cultivated bacteria did not represented an important part of the community (21, 22, 27). Among 288 clones obtained from fecal samples of 16 preterm infants, Magne et al. found only one molecular species without a cultivated representative in public database (21). In our study, we found no major discrepancies between results obtained using culture-dependent and -independent methods. Additionally, the analysis of sequenced 16S rRNA genes did not show any uncultivable species. The identified species belong to four phyla, mainly Firmicutes, then Proteobacteria, Bacteroidetes and Bifidobacteria. As for family and genera, we found members of the *Enterobacteriaceae* family as well as members from the genera

Staphylococcus, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, as previously described in literature.

During survey in the current study, major changes in the composition of the intestinal microbiota were reliably detected by all methods. We found that the presence or absence of signals in DHPLC or TTGE profiles was associated with the presence or absence of bacterial species in culture. In most cases, the bacterial species identified by sequencing the TTGE bands or DHPLC peaks were similar to those identified by culture. However, the molecular methods tended to show more and/or earlier bacterial species when compared to culture. As an example, in infant A, on the first week of life, *B. longum* and *Lactobacillus* species were identified exclusively by molecular techniques and not on culture plates. However, it cannot be excluded that DNA detected by molecular techniques belongs to non-viable bacteria. Cloning and sequencing proved to be the most sensitive method detecting all bacterial species that were also identified with each of the other three methods (with the exception of sample C and *B. longum*). TTGE was less sensitive than DHPLC but slightly more sensitive than culturing. In one sample (infant B) *Staphylococcus* was not detected with DHPLC. This may be because some clostridia species and staphylococci can have DNA with similar G+C%, and thus the elution times of the amplicons hardly differ. The major changes observed were principally linked to administration of antibiotics and/or modification of enteral nutrition supporting previous findings in preterm infants (3, 13, 16).

Based on our results, DNA library sequencing would be the most sensitive tool to study the composition of the gut microbiota of preterm infants. In fact, recent studies have shown the power of this method for generating detailed snapshots of various bacterial ecosystems (21, 25, 29). However, DNA library sequencing is not suitable for routine large-scale screening

and monitoring because it is laborious, time-consuming and expensive. In our study, DHPLC was able to detect the majority of species that were also identified with the other methods. Compared to TTGE, DHPLC is more accurate, is automated and hence less time-consuming. Moreover, sequencing of collected peak fractions is straightforward. Finally, DHPLC is very reproducible with a low intra- and inter-day variability (data not shown).

Our data suggest that molecular methods may be more accurate than laboratory culture for studying the bacterial population dynamics in the gut microbiota of preterm infants. Since all species identified on the molecular level belong to the cultivable fraction of bacteria, an inability to culture, in principle, can't explain why molecular methods were more successful at identifying organisms. Poor sample handling before culture analysis is likely to be a significant problem. Nevertheless, molecular techniques proved to be more rapid and sensitive and therefore more suitable for routine monitoring of changes in the microbiota of preterm infants, e.g. during antimicrobial or probiotic treatment.

Although the DHPLC technique uses expensive equipment and has some limitations common to other molecular tools, such as inherent bias in the DNA extraction and amplification steps, and in amplicons separation (24, 31), and even though monitoring and identification of bacterial communities are based on only a single molecule (16S rRNA gene), DHPLC constitutes a powerful molecular tool to study bacterial communities in the intestinal microbiota of preterm infants.

ACKNOWLEDGMENTS

Carole Rougé was the recipient of a doctoral research fellowship from Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Switzerland). Part of this work was supported by grants from: the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2004) from the French Ministry of Health, and the Délégation à la Recherche Clinique (DRC 2004), CHU de Nantes.

We thank F. Gros and the platform for sequencing, Ouest Genopole, IFR26, Nantes, F. Le Vacon and Atlangene, Nantes, France. We also thank F. Levenez (INRA, UEPSD, Jouy-en-Josas, France) and A.J. Waligora (EA 4065, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France) for technical assistance and advice, and gratefully acknowledge the preterm infants who took part in the study and their parents.

REFERENCES

1. Barlaan, E.A., M. Sugimori, S. Furukawa, and K. Takeuchi. 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Microbiol. Methods. **6:**399-412.

2. Blakey, J.L., L. Lubitz, G.L. Barnes, R.F. Bishop, N.T. Campbell, and G.L. Gillam. 1982. Development of gut colonisation in pre-term neonates. J. Med. Microbiol. **15:**519-529.

3. Bonnemaison, E., P. Lanotte, S. Cantagrel, S. Thionois, R. Quentin, C. Chamboux, and J. Laugier. 2003. Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. Biol. Neonate. **84:**304-310.

4. Butel, M.J., N. Roland, A. Hibert, F. Popot, A. Favre, A.C. Tessèdre, M. Bensaada, A. Rimabault, and O. Szylit. 1998. Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. J. Med. Microbiol. **47:**391-399.

5. Butel, M.J., A. Suau, F. Campeotto, F. Magne, J. Aires, L. Ferraris, N. Kalach, B. Leroux, and C. Dupont. 2007. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. J. Pediatr. Gastorenterol. Nutr. **44:**577-582.

6. Cebra, J.J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. Am. J. Clin. Nutr. **69:**046S-1051S.

7. Claud, E.C., and W.A. Walker. 2001. Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. FASEB J. **15:**1398-1403.

8. De la Cochetière, M.F., H. Piloquet, C. Des Robert, D. Darmaun, J.P. Galmiche, and J.C. Rozé. 2004. Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium. Pediatr. Res. **56:**366-370.

9. Domann, E., G. Hong, C. Imirzalioglu, S. Turschner, J. Kühle, C. Watzel, T. Hain, H. Hossain, and T. Chakraborty. 2003. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. J. Clin. Microbiol. **41:**5500-5510.

10. Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini, and V. Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. Acta. Paediatr. Suppl. **91:**48-55.

11. Franciosa, G., M. Pourshaban, A. De Luca, A. Buccino, B. Dallapiccola, and P. Aureli. 2004. Identification of type A, B, E, and F botunilum neurotoxin genes and of botulinum neurotoxigenic clostridia by denaturing high-performance liquid chromatography. Appl. Environ. Microbiol. **70:**4170-4176.

12. Frueh, F.W., and M. Noyer-Weidner. 2003. The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. Clin. Chem. Lab Med. **41**:452–461.

13. Gewolb, I.H., R.S. Schwalbe, V.L. Taciak, T.S. Harrison, and P. Panigrahi. 1999. Stool microflora in extremely low birthweight infants. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal. Ed. **80:**F167-173.

14. Godon, J.J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit, and R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. **63:**2802-2813.

15. Goldenberg, O., S. Herrmann, G. Marjoram, M. Noyer-Weidner, G. Hong, S. Bereswill, and U.B. Göbel. 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. J. Microbiol. Methods. **68:**94-105.

16. Hall, M.A., C.B. Cole, S.L. Smith, R. Fuller, C.J. Rolles. 1990. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. Arch. Dis. Child. **65:**185-188.

17. Hooper, L.V., M.H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk, and J.I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science. **291:**881-884.

18. Hurtle, W., L. Lindler, W. Fan, D. Shoemaker, E. Henchal, and D. Norwood. 2003. Detection and identification of ciprofloxacin-resistant *Yersinia pestis* by denaturing high-performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. **41:**3273–3283.

19. Jousimies-Somer, H.R., P. Summanem, D. Citron, E.J. Baron, H.M. Wexler, and S.M. Finegold. 2002. Anaerobic Bacteriology Manual, 6th ed. Belmont, California: Star Publishing Company.

20. Kok, R.G., A. De Waal, F. Schut, G.W. Welling, G. Weenk, and K.J. Hellingwerf. 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. Appl. Environ. Microbiol. **62:**3668-3672.

21. Magne, F., M. Abély, F. Boyer, P. Morville, P. Pochart, and A. Suau. 2006. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. FEMS Microbiol. Ecol. **57:**128-138.

22. Millar, M.R., C.J. Linton, A. Cade, D. Glancy, M. Hall, and H. Jalal. 1996. Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. J. Clin. Microbiol. **34:**2506-2510.

23. Mullie, C., M.F. Odou, E. Singer, M.B. Romond, and D. Izard. 2003. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. FEMS Microbiol. Lett. **222:**129-136.

24. Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. **2:**317-322.

25. Park, HK., S.S. Shim, S.Y. Kim, J.H. Park, S.E. Park, H.J. Kim, B.C. Kang, and C.M. Kim. 2005. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. J. Microbiol. **4:**345-353.

26. Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F.F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P.A. van den Brandt, and E.E. Stobberingh. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. **118:**511-521.

27. Schwiertz, A., B. Gruhl, M. Löbnitz, P. Michel, Radke, M., and M. Blaut. 2003. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. Pediatr. Res. **54:**393-399.

28. Stark, P.L., and A. Lee. 1982. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. J. Hyg. (Lond.).**89:**59-67.

29. Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J.J. Godon, G.R. Gibson, M.D. Collins, and J. Doré. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl. Environ. Microbiol. **65:**4799-4807.

30. Wilson, K.H., and R.B. Blitchington. 1996. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. **62:**2273-2278.

31. Wintzingerode, F.V., U.B. Goebel, and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. **21:**213-229.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Monitoring of changes in the intestinal microbiota of 10 preterm infants (from A to J) using TTGE and DHPLC.

Figure 1.

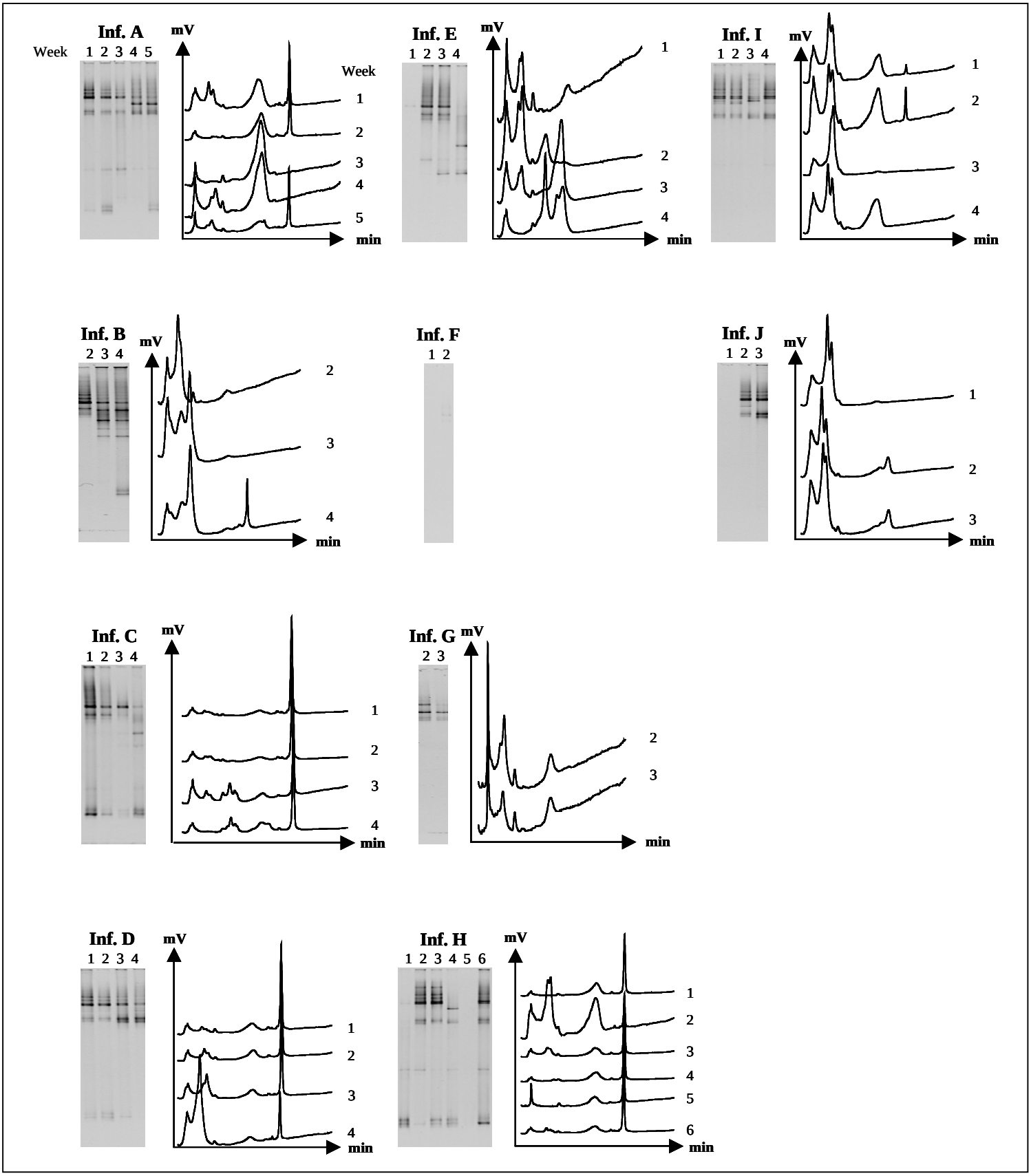
Inf. A
Week
1 2 3 4 5
mV
Week
1
2
3
4
5
min
Inf. E
1 2 3 4
mV
1
2
3
4
min
Inf. I
1 2 3 4
mV
1
2
3
4
min
Inf. B
2 3 4
mV
2
3
4
min
Inf. F
1 2
Inf. J
1 2 3
mV
1
2
3
min
Inf. C
1 2 3 4
mV
1
2
3
4
min
Inf. G
2 3
mV
2
3
min
Inf. D
1 2 3 4
mV
1
2
3
4
min
Inf. H
1 2 3 4 5 6
mV
1
2
3
4
5
6
min

Table 1. Media used for culture and quantification of the different bacterial groups.

Culture media (source)	Bacterial groups quantified
Aerobic genera	
Trypticase soja agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France	Total aerobes
Drigaslki agar (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France)	Enterobacteria
D-Cocossel agar (bioMérieux)	Enterococci
Chapman 110 agar (VWR, Strasbourg, France)	Staphylococci
Rogosa agar (Oxoid, Dardilly, France)	Lactobacilli
Anaerobic genera	
Columbia agar base + cysteine (160mg/L) + sheep blood (5%) + neomycin (100mg/L)	Total anaerobes
Columbia agar base + cysteine (160mg/L) + sheep blood (5%) + kanamycin (7.5mg/L) + vancomycin (100mg/L)	*Bacteroides, Prevotella*
Columbia agar base + cysteine (160mg/L) + sheep blood (5%) + whole milk (5%) + colistin (10mg/L) + neutral red (40mg/L)	*Clostridium*
Wilkins-Chalgren agar base + D-glucose (10g/L) + mupirocin (7.5mg/L) + cysteine (0.5g/L) + tween 80 (0.5% vol/vol)	*Bifidobacterium*

Table 2. Primers used for amplification of 16S rRNA gene fractions, targeting the *Domain Bacteria*.

Methodology	Primers	Sequence (5' to 3')[a]	References
TTGE	**U968-GC**	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC	8
	L1401	GCG TGT GTA CAA GAC CC	
DHPLC	**F-968-30GCT**	CGC CCG CCG CCG CCC GCC GCC CGT CCC GCC AAC GCG AAG AAC CTT AC	15
	R-1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	
DNA library	**TPU1**	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	15
	RTU8	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	
	M13-(20)	TGTAAAACGACGGCCAGT	15
	M13-rev	ACCAGCTATGACCATG	

[a] Sequence in IUPAC code: R = A/G, M = A/C, N = G/A/T/C, F: forward primers and R: reverse primers.

Table 3. Clinical characteristics (birth, therapy, feeding and sampling period) of the 10 preterm infants.

Infants' code	Gestational age (weeks)	Mode of delivery	Birthweight (g)	Antibiotics[a] (*per partum*)	Antibiotics[b] from birth (duration)	Type of feeding	Probiotic supplementation	Sampling period (weeks)
A	28	Vaginal	1100	No	Yes (21 days)	Human milk	No	1-5
B	29	Caesarean section	1265	Yes	Yes (3 days)	Human milk	No	1-4
C	32	Caesarean section	1220	No	No	Human milk + formula	Yes	1-4
D	28	Vaginal	1285	No	Yes (2 days)	Human milk	Yes	1-4
E	29	Caesarean section	1360	Yes	Yes (3 days)	Human milk	No	1-4
F	29	Caesarean section	1450	Yes	Yes (23 days)	Human milk + formula	No	1-2
G	30	Caesarean section	1275	No	Yes (10 days)	Human milk	No	1-3
H	28	Caesarean section	935	No	Yes (7 days)	Human milk	Yes	1-6
I	29	Caesarean section	1015	No	Yes (13 days)	Human milk	No	1-4
J	29	Vaginal	1420	No	Yes (3 days)	Human milk + formula	No	1-3

[a] broad spectrum amoxicillin.

[b] broad-spectrum cephalosporins or amoxicillin or ticarcillin, glycopeptides, aminosides and/or rifamycin.

Table 4. Bacterial colonization in the 10 preterm infants during survey.

	Week 1 (n=10[a])		**Week 2** (n=9)		**Week 3** (n=8)		**Week 4** (n=7)		**Week 5** (n=3)	
	Median (range)[b]	No of colonized infants	Median (range)	No of colonized infants	Median (range)	No of colonized infants	Median (range)	No of colonized infants	Median (range)	No of colonized infants
Staphylococci	7.0 (6.3-9.0)	6	7.6 (4.0-8.8)	8	8.0 (5.7-8.5)	8	7.5 (6.4-9.5)	7	(7.7-7.9)	2
Enterococci	nd[c]	0	5,3 (4.5-7.7)	3	6.8	1	6.0-8.3	2	4.7	1
Enterobacteria	nd	0	nd	0	6.0	1	8.7	1	5.7	1
Bacteroides	nd	0	8.4	1	4.1	1	6.1	1	8.7	1
Clostridium	3.3	1	nd	0	6.0 (5.8-6.4)	3	7.1 (4.7-7.1)	3	6.0-7.1	2
Bifidobacterium	5.9-6.3	2	6.0 (3.9-8.3)	3	5.0 (4.4-7.5)	3	5.3 (3.3-9.4)	4	4.5-6.8	2
Lactobacilli	6.7 (4.7-6.8)	3	7.8 (4.6-8.5)	7	7.8 (4.3-8.6)	6	8.4 (6.0-9.4)	6	7.3	1

[a] number of infants analyzed.

[b] bacterial counts in colonized infants expressed as the $\log_{10}$ CFU/g feces .

[c] not detected, threshold = 3.0 CFU/g.

Table 5. Identification of bacteria by culture, in collected TTGE bands, by DNA libraries and DHPLC peak fractions, after sequence analysis in four samples from four preterm infants.

Infant's code (time of sampling)	Culture	TTGE	Clone library	DHPLC
A (week 1)	*Staphylococcus* CN[a] (6.3)[b]	*S. epidermidis* (100%)[c] *B. longum* (100%) *L. casei/paracasei/rhamnosus* (99%)	*S. epidermidis* (<98%) *B. longum* (100%) *L. casei/paracasei/rhamnosus* (99%) *B. fragilis* (99%) *P. merdae* (99%)	*S. epidermidis* (100%) *B. longum* (100%) *L. casei/paracasei/rhamnosus* (98%)
B (week 3)	*Staphylococcus* CN (8.1)	*S. epidermidis* (100%)	*S. haemolyticus* (99%)	
	C. butyricum (6.4)	*Clostridium sp* (<98%)	*C. neonatale* (99%)	*Clostridium* (<98%)
C (week 3)	*Staphylococcus* CN (7.2) *Klebsiella oxytoca* (6.0) *B longum* (7.5) *Lactobacillus* GG (8.6)	*S. epidermidis* (100%)	*S. Epidermidis* (99%) *Klebsiella sp* (98%)/*C. freundii* (99%) *L. casei/paracasei/rhamnosus* (99%)	*S. epidermidis* (<98%) K.oxytoca/*C.freundii (99%)* *B. longum* (99%) *L. casei/paracasei/rhamnosus* (100%)
D (week 1)	*Staphylococcus* CN (7.0)	*S. epidermidis* (100%) *B. longum* (100%)	*S. epidermidis* (99%) *B. longum/breve* (99%) *L. casei/paracasei/rhamnosus* (99%)	*S. epidermidis* (99%) *B. longum* (100%)

[a] CN = coagulase negative.

[b] $\log_{10}$ CFU/g of feces, count threshold = 3.

[c] %, percent identity to the closest relative.

ETUDE 4 : Détermination chez l'homme de la citrulline plasmatique, globulaire et urinaire en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, De la Cochetière MF et Darmaun D.

Sous presse, J Chromatogr B. 2008.

La citrulline est un acide aminé non essentiel, non incorporé dans les protéines, que l'on retrouve à l'état libre dans de nombreux fluides et tissus biologiques, tels que le plasma, les urines, le liquide céphalo-rachidien, le muscle ou encore le cerveau. Des études menées dans diverses pathologies chez l'homme depuis quelques années suggèrent que la citrulline plasmatique pourrait être utilisée comme un index de masse et de fonctionnement intestinal. Par ailleurs, de récentes études menées chez le rat suggèrent que la citrulline pourrait avoir un effet sur l'anabolisme protéique dans des conditions cliniques spécifiques. Bien que de nombreuses méthodes aient été utilisées pour quantifier la citrulline plasmatique, peu d'entre elles ont été utilisées pour quantifier la citrulline urinaire et aucune méthode n'a été rapportée concernant le dosage de la citrulline globulaire.

Afin d'améliorer nos connaissances concernant le métabolisme de la citrulline chez l'homme, l'objectif de notre étude a été de développer une méthode sensible et robuste en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par ionisation en impact électronique, pour quantifier la citrulline dans le plasma, les culots globulaires et les urines.

La méthode développée au cours de notre étude est sensible, permettant de détecter en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par ionisation en impact électronique jusqu'à 20 pmoles de citrulline naturelle en solution aqueuse, 1,6 nmoles de citrulline dans le plasma (40µL), 0,9 nmoles de citrulline dans le culot globulaire (30µL) et 0,6 nmoles de citrulline dans l'urine (100 µL). Par ailleurs, la méthode développée est précise et reproductible : le % de récupération calculé après ajouts dosés de citrulline naturelle dans chaque matrice biologique était supérieur à 90% et les coefficients de variation calculés intra- et inter- jours étaient inférieurs à 10%. L'application de notre méthode à des échantillons

plasmatiques, globulaires et urinaires, chez 5 adultes sains, a permis d'obtenir des concentrations de citrulline plasmatique et urinaire conformes à celles décrites dans la littérature utilisant d'autres méthodes de dosage, et montré que les concentrations de citrulline globulaire étaient inférieures à celles retrouvées dans le plasma.

A notre connaissance, notre étude est la première à démontrer que la citrulline peut être quantifiée en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par ionisation en impact électronique sur de très faibles volumes de plasma, de culot globulaire et d'urine.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Journal of Chromatography B, 865 (2008) 40–47
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B
www.elsevier.com/locate/chromb

Determination of citrulline in human plasma, red blood cells and urine by electron impact (EI) ionization gas chromatography–mass spectrometry

Carole Rougé [a], Clotilde Des Robert [a,b,d], Alexander Robins [a], Olivier Le Bacquer [a], Marie-France De La Cochetière [c], Dominique Darmaun [a,d,*]

[a] *INRA, UMR Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, University of Nantes, and CRNH (Human Nutrition Research Center), Nantes, France*
[b] *Néonatologie, Hôpital Mère-et-Enfant, CHU de Nantes, France*
[c] *EA 3826, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Maladies Infectieuses, University of Nantes, France*
[d] *Centre d'Investigation Clinique (CIC), INSERM and CHU de Nantes, France*

Received 7 September 2007; accepted 27 January 2008
Available online 20 February 2008

Abstract

A method was developed by using gas chromatography–mass spectrometry in the electron impact ionization mode to quantify citrulline in plasma, red blood cells (RBC) and urine. For all three fluids, citrulline was extracted on ion exchange resins, before derivatization to its propyl-heptaflorobutyryl-ester. Assay precision (coefficient of variation, CV) was <5%, recovery% was >90% and the within- and between-day CV were <10% on 200 μL of plasma and RBC, and 400 μL of urine. The current method allows for the detection of 20 pmol of natural citrulline in aqueous standards, and small volumes (<100 μL) of biological fluids.
© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nutrition; Protein; Amino acids; Stable isotopes

1. Introduction

Citrulline is a non-essential amino acid that is not incorporated into protein, and is present as a free amino acid in most biological fluids such as plasma, urine and cerebrospinal fluid [1–4]. Two main pathways account for citrulline biosynthesis [5,6]. First, citrulline is produced from glutamine in reactions that are generally considered part of the urea cycle by condensation of ornithine and carbamyl phosphate. Second, citrulline can also arise from the conversion of arginine to nitric oxide (NO) by nitric oxide synthetase (NOS) in most tissues. Conversion of arginine to citrulline accounts for ≈10% of circulating citrulline flux, implying that the rest, nearly 90%, must arise from glutamine [7–9]. In the liver, citrulline is quantitatively utilized by arginosuccinate synthase (ASS) for urea synthesis, so the liver does not release any free citrulline. In contrast, the citrulline formed in the gut is released as such into the bloodstream, and taken up by the kidney, where it can be converted to arginine by ASS. There is, therefore, no significant extra intestinal source of circulating citrulline.

Recent studies have suggested plasma citrulline concentration may be used as an index of small intestinal mass or function. Plasma citrulline indeed correlates with residual bowel length in patients with short bowel syndrome [8,9], and with small bowel function in patients with celiac disease [10], intestinal graft rejection [11,12], or radiation-induced intestinal damage [13]. Moreover, rodent studies suggest citrulline may have a protein anabolic effect in specific clinical conditions, as it enhanced nitrogen balance after extensive small intestinal resection [14], and muscle protein synthesis in old, undernourished rats [15].

Several methods have been used to determine citrulline concentrations in human plasma such as the diacetylmonoxime method [16], ion exchange chromatography [17], reversed phase high-pressure liquid chromatography (HPLC) [18–21],

* Corresponding author at: UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Hotel-Dieu Hospital, HNB1, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel.: +33 2 53482004; fax: +33 2 53482003.
E-mail addresses: ddarmaun@chu-nantes.fr, dominique.darmaun@orange.fr (D. Darmaun).

1570-0232/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jchromb.2008.01.055

Author's personal copy

HPLC–mass spectrometry [2,22], HPLC–fluorescence [23–24] and gas chromatography–mass spectrometry [25,1]. HPLC has been used to measure citrulline in cerebrospinal fluid [26], and LC–MS for brain tissue citrulline assay [27]. Yet, fewer methods have been validated for quantifying citrulline in urine [28–29,2] and no data concerning citrulline concentrations in blood cells have been reported.

In this context, it is of interest to improve our understanding of citrulline metabolism in humans. The aim of the current study was to develop a robust and sensitive method to measure citrulline concentrations in human plasma, blood cells and urine, by using gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS).

2. Experimental

2.1. Chemicals and standards

All chemicals (propan-1-ol, acetylchloride, hydrogen chloride, ammonium hydroxide, potassium hydroxide, 5-sulfosalicylic acid, ethylacetate and heptafluorobutyric anhydride), citrulline (L-2-amino-5-ureidovaleric acid) and ion exchange resins (Dowex 50WX8-200 and Dowex 1X8) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Homocitrulline (ε-carbamoyl lysine) was obtained from Advanced Asymetrics Inc. (Millstadt, USA) and L-[2,3, 3, 4, 4, 5, 5-$^2H_7$] citrulline (d_7-citrulline) from CDN Isotopes (Cil Cluzeau Info Labo, France).

2.2. Sample preparation

2.2.1. Calibration curves

On each day of analysis, two sets of standard curves were prepared to permit determination of citrulline concentration in plasma, red blood cells (RBC) and urine samples. Standards were prepared at concentrations similar to those found in biological samples. The first set of standards (for plasma and RBC citrulline determination) were prepared with 100 μL of 0.1 mol/L homocitrulline, as an internal standard and graded known volumes of a 0.1 mol/L citrulline solution (0–400 μL). As native urine contained a small amount of homocitrulline (data not shown), another internal standard, d_7-citrulline, was used for urine citrulline quantification. The second set of standards (for urine citrulline determination) was prepared with 100 μL of 0.1 mol/L d_7-citrulline and graded known volumes of a 0.1 mol/L natural citrulline solution (0–400 μL).

2.2.2. Plasma and RBC preparation

Blood samples (5 mL) were drawn into glass tubes containing EDTA. Blood cells and plasma were immediately separated by centrifugation at 3000 × *g* for 10 min at 4 °C, plasma was collected using a Pasteur pipette, and transferred into a new tube. Plasma and RBC were stored at −80 °C until analysis. Before biological samples were analyzed, a 10 nmol aliquot of 0.1 mol/L homocitrulline was added to a 200-μL aliquot of plasma or RBC. Blood cells were disrupted by adding 400 μL of distilled water. Plasma and blood cells were deproteinized with 100 or 200 μL of 10% (w/v) 5-sulfosalicylic acid (10% SSA), respectively. The same extraction and derivatization protocols were used for plasma and blood cell samples. Deproteinized plasma and blood cells were first acidified to pH < 2 with 400 μL of 0.1 mol/L HCl, and then poured on top of microcolumns containing 1 mL of Dowex 50 cation exchange resin. The cation-exchange columns were washed with 10 mL of deionized water, and citrulline was eluted with 2 mL of 6 mol/L NH_4OH to raise pH above 10. The eluate was dried under nitrogen, and derivatized to its propyl heptafluoro-butyryl derivative. Each dried fraction was first dissolved with 600 μL of a 1/5 (v/v) mixture of acetylchloride/ice-cold propanol, and incubated at 110 °C for 30 min. Each sample was then evaporated under a stream of nitrogen, spiked with 50 μL of heptafluorobutyric anhydride (HFBA), and incubated at 60 °C for 30 min. The derivatized citrulline was dried under nitrogen and dissolved in 100 μL of ethylacetate until analysis by GC/MS.

2.2.3. Urine preparation

Urine samples were aliquoted soon after collection and stored immediately at −80 °C until analysis. Even though the derivatization was the same as for plasma, a different extraction procedure had to be used for urine. A 10 nmol aliquot of d_7-citrulline was added to 400 μL of urine. Two milliliter of a 1 M KOH solution were first added to each 400 μL urine sample to reach a pH > 9, and samples were then poured on top of microcolumns containing 1 mL of Dowex 1X8 anion exchange resin. The eluate was collected, and columns were further washed with 3 mL of 1 mol/L KOH, to achieve more extensive citrulline elution. The citrulline-containing eluate was acidified to pH < 2 with 3.5 mL of 1 M HCl, and poured on top of microcolumns containing 1 mL of Dowex 50WX8 cation exchange resin. Columns were washed with 10 mL of deionized water, and citrulline was eluted with 2 mL of 6 mol/L NH_4OH to raise pH above 10. The eluate was dried under nitrogen, and derivatized to its propyl heptafluoro-butyryl derivative, as described for plasma and RBC. The derivatized citrulline was dried under nitrogen and dissolved in ethylacetate until analysis by GC/MS. A volume of 100 μL of ethylacetate was used for plasma and RBC samples, and 200 μL were used for urine samples, because the urine samples were subsequently filtered on a paper filter prior to injection into GC/MS. On each day of analysis, a derivatization blank was prepared with 200 μL of distilled water.

2.3. GC/MS analysis

Citrulline analysis was performed using an HP 5890 series II® gas chromatograph coupled with a 5971® mass selective detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) using a DB-1® (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Courtaboeuf, France) capillary column operated in the splitless mode. Injector and detector temperatures were 250 and 290 °C, respectively. The helium carrier flowed at a rate of 1.2 mL/min. The oven temperature was initially set at 80 °C, and then ramped from 80 to 170 °C at a rate of 15 °C/min, and raised to 220 °C at a rate of 8 °C/min, and then raised at 250 °C at a rate of 50 °C/min and maintained at 250 °C for 1 min. The mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) ionization mode. The acqui-

Author's personal copy

sition time was 14 min. For each sample analyzed, a volume of 2 μL was injected into GC/MS system.

2.4. Human application

Blood and urine samples were obtained at 11 a.m., 3 h after breakfast, from five healthy adult male volunteers, according to procedures approved by the local ethical committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale des Pays de la Loire). Urine samples were collected before breakfast from healthy adults who had been fasting overnight.

Biological samples were prepared after addition of 100 μL of 0.1 mol/L homocitrulline to 200 μL of plasma and red blood cells, and after addition of 100 μL, 0.1 mol/L d_7-citrulline to 400 μL of urine.

3. Results

3.1. Standards

The propyl-hepta-fluoro-butyryl ester derivatives of citrulline, homocitrulline and L-[2,3,3,4,4,5,5-$^2H_7$] citrulline (d_7-citrulline) were stable for several weeks when stored at 4 °C (data not shown). The complete mass spectra of these propyl-hepta-fluoro-butyryl ester derivatives obtained by GC/MS in the scan mode are shown Fig. 1. Citrulline and d_7-citrulline eluted at retention times of 8.09 and 8.07 min, respectively, and homocitrulline eluted at a retention time of 9.38 min. Chromatograms were free of interfering peaks. Monitoring of several ions (at $m/z = 114$, 309 for citrulline, 128 and 323 for homocitrulline, and 118 and 313 for d_7-citrulline) was used for confirmatory identification in biological samples. For quantitation, the monitoring of the prominent ions at $m/z = 114$, 128 and 118 for citrulline homocitrulline, and d_7-citrulline, respectively) afforded the best sensitivity, in the selected ion monitoring mode. Although these ions are in a low mass range, their high relative abundance was found to allow the detection of very small quantities of citrulline in biological samples.

3.2. Biological fluids

The chromatograms of citrulline, homocitrulline and d_7-citrulline obtained from the three biological fluids by GC/MS in the SIM mode were free of interfering peaks (Fig. 2).

3.3. Calibration curves

A typical standard curve obtained for each set of internal standards by plotting the 114/128 or 114/118 peak area ratios against citrulline/homocitrulline or citrulline/d_7-citrulline mole ratios is shown in Fig. 3. The linearity and slope were measured for each set of internal standards (Fig. 3a and b). High coefficients of correlation were consistently obtained for citrulline/homocitrulline ($y = 0.9443x + 0.013$, $r^2 = 0.9997$), as well as for citrulline/d_7-citrulline ($y = 2.2452x + 0.0324$, $r^2 = 0.9999$). The range covered by the calibration curves was between 0 and 40 nmol for a 200-μL plasma or RBC sample, corresponding to a range of blood citrulline concentrations between 0 and 200 μM, and 0–20 nmol in a 400 μL urine sample, corresponding to 0–50 μM citrulline concentration range in urine.

3.4. Assay validation

3.4.1. Assay precision of the GC/MS equipment

The assay precision (run-to-run variation) was determined by injecting the same biological sample (plasma, RBC, or urine: $n = 2$) five times consecutively into the GC/MS system (Table 1). Coefficients of variation (CV, %) calculated as: CV = 100 × SD/mean were consistently less than 5% for the biological samples.

3.4.2. Assay precision of the whole procedure

3.4.2.1. Assay accuracy. Accuracy was determined by measuring the recovery of known amounts of natural citrulline (10, 20 and 30 nmol) added to two aliquots of plasma, RBC and urine prior to sample processing. The recovery (%) calculated for each biological sample was 92 ± 7% for plasma, 95 ± 7% for RBC and 90 ± 1% for urine (Table 1). When the amounts of citrulline measured in biological samples were plotted against the spiked amounts, highly linear correlations were observed, with $r^2 = 0.9947$, 0.9978, and 0.9996 in plasma, red blood cells, and urine, respectively (Fig. 4a–c). Whereas the slope did not differ from 1 for red blood cells (Fig. 4b), it was, however, significantly below unity for plasma (Fig. 4a), and urine (Fig. 4c). The use of the "aqueous standard curve" would thus result in systematic quantification errors: for instance, 30 nmol/L spiked plasma would be measured as 33.07 nmol/L, whereas the expected value is 38.42 nmol/L (spiked plus endogenous amount), the difference is thus 14%. This finding underlines the difficulties of calibrating endogenous substances in biological matrices, and suggests that standard curves spiked with either plasma or urine should ideally be used for accurate quantification of citrulline in the corresponding biological matrix.

3.4.2.2. Within- and between-day reproducibility (Table 1). The precision of the GC–MS equipment, and that of the whole procedure, were assessed in separate experiments. The run-to-run reproductibility, reflecting solely the precision of the GC/MS equipment was determined by repeatedly injecting (3–5 times) the same sample (of either plasma, red blood cell, or urine) into the system. To determine the precision of the whole procedure, three separate aliquots of the same pool of plasma underwent separate extraction, derivatization, and analysis, either on the same day (to determine the within-day CV), or on days several weeks apart (to determine the between-day CV). For all the biological samples tested, the within-day and between-day coefficients of variation were consistently less than 10%, and within-day reproducibility was better than between-day (Table 1).

Author's personal copy

Table 1
Method validation

	Precision[a] of the GC/MS equipment (CV) (%)	Precision of the whole procedure (%)		
		Accuracy[b] (recovery)	Reproducibility within day[c] (CV)	Reproducibility between days[d] (CV)
Plasma	2.7	92 ± 7	4.2	4.4
RBC	3.8	95 ± 7	3.7	3.8
Urine	1.6	90 ± 1	6.2	9.1

[a] Precision (run-to-run variation) was measured by repeatedly injecting samples prepared from human plasma, red blood cell pellet and urine consecutively into the GC/MS system; coefficients of variation (CV, %) were calculated as: CV = 100 × SD/mean.
[b] Accuracy was determined by measuring recovery of known amounts of natural citrulline added to aliquots of plasma, red blood cell pellets and urine prior to sample processing.
[c] Within-day reproducibility was determined from the analysis by the GC/MS system, of three aliquots of a single plasma, red blood cell or urine sample that had been extracted, derivatized, in parallel, and were analyzed by GC/MS on the same day ($n = 5$).
[d] Between days reproducibility was determined by injecting into the GC/MS system, three aliquots of one plasma, RBC or urine sample that had been extracted, derivatized and analyzed on 2 different days.

3.4.2.3. Assay sensitivity. The assay sensitivity was determined on aqueous solutions of natural citrulline. The current assay allowed for the detection of 20 pmol of natural citrulline in aqueous solutions, and citrulline could be detected in very small volumes of biological fluids, down to 40, 30, 100 μL of plasma, RBC and urine, respectively, which contain approximately 1.6, 0.9, and 0.6 nmol citrulline, respectively. As derivatized samples were dissolved in a final volume of 100 μL ethylacetate (for plasma and RBC) or 200 μL ethylacetate for urine, and as 2 μL were injected, the amount of citrulline injected into the GC/MS was 31, 19, and 6 pmol citrulline for plasma, RBC, and urine, respectively.

3.5. Human application

The method developed in the current study was used for quantifying citrulline in plasma, RBC and urine samples from five healthy volunteers (Table 2). As the slope of the line describing the relationship between added amounts of citrulline and measured amounts is below 1 for plasma and urine (Fig. 4b and c), the true concentration of citrulline $[CIT]_{true}$ in plasma or urine was calculated as:

$$[CIT]_{true} = \frac{[CIT]_{apparent}}{k},$$

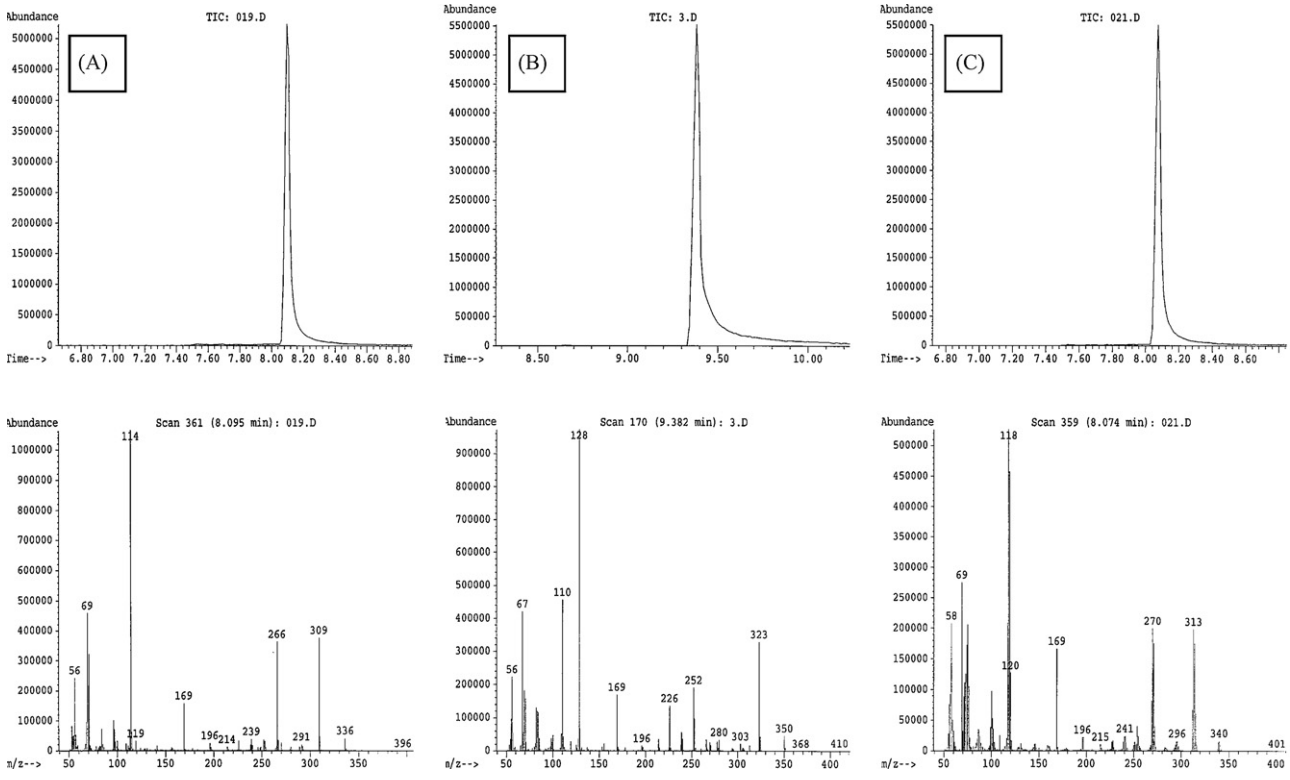

Fig. 1. Complete mass spectrum of propyl-hepta-fluoro-butyryl L-citrulline (A), propyl-hepta-fluoro-butyryl homocitrulline (B) and propyl-hepta-fluoro-butyryl d_7-citrulline (C), in aqueous solution (EI mode).

Author's personal copy

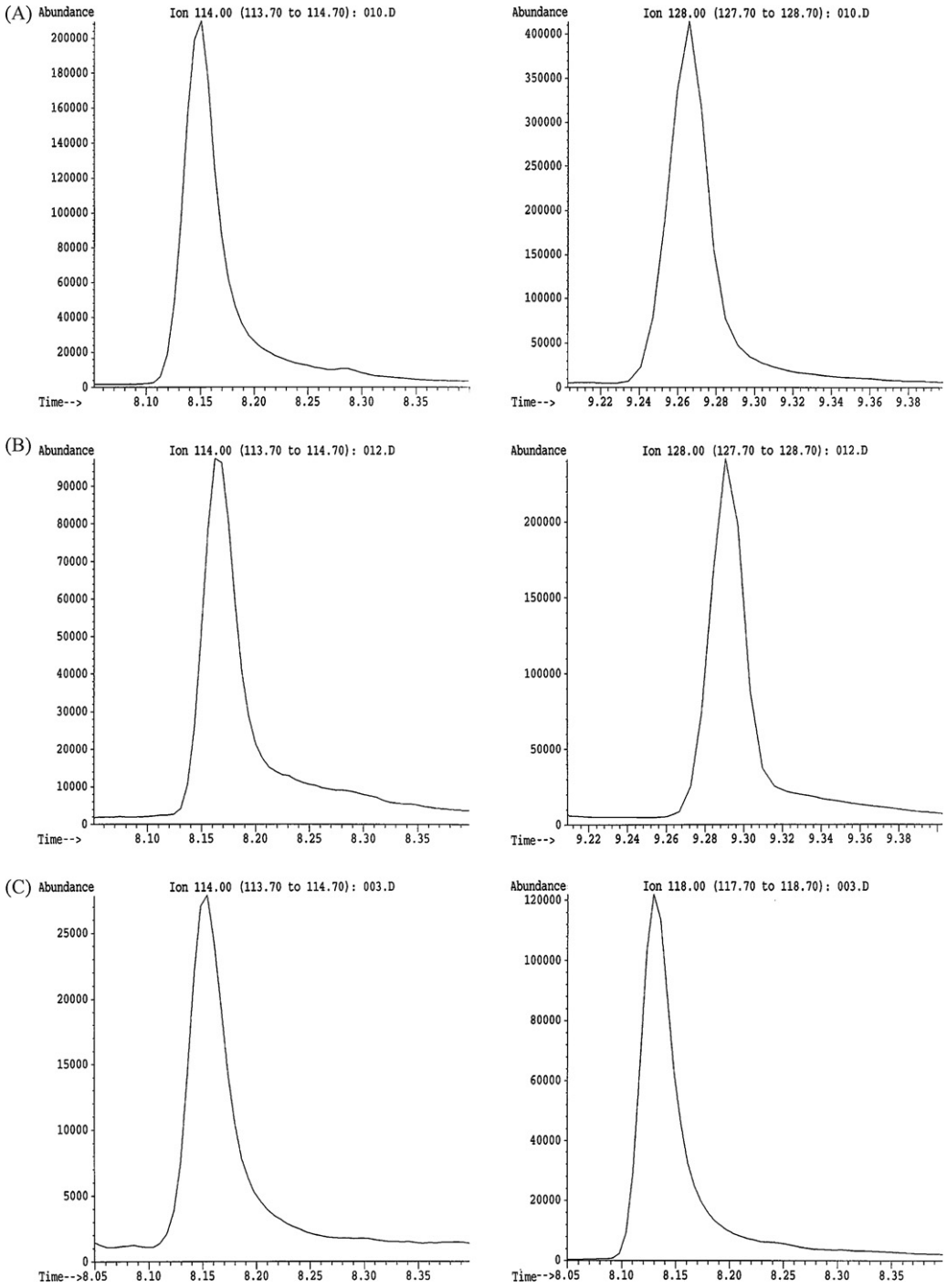

Fig. 2. GC/MS chromatogram of plasma citrulline (A), red blood cell citrulline (B) and urine citrulline (C), acquired in the selected ion monitoring mode.

where $[CIT]_{apparent}$ is the amount of citrulline calculated using the calibration curve constructed using aqueous standards (Fig. 3a and b for plasma and urine, respectively), and k, a correction factor, is the slope of the of the line describing the relationship between added amounts of citrulline and measured amounts in the corresponding matrix (e.g., 0.8218 and 0.8678 for plasma and urine, respectively; see Fig. 4a and c).

Plasma citrulline levels ($n = 5$) were $47 \pm 12\,\mu M$, and were slightly, but not significantly higher than RBC citrulline levels ($31 \pm 13\,\mu M$). Compared to plasma and RBC, urine citrulline levels were $7 \pm 3\,\mu M$, and thus considerably lower than those measured in plasma and RBC ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively, as tested using Student's t-test).

4. Discussion

To our knowledge, the current study is first to demonstrate that citrulline quantification can be performed by GC/MS operated in the electron impact ionization mode in very small volumes of

Author's personal copy

Table 2
Plasma, RBC and urine citrulline levels in five healthy adults, in fed state

Subject	Plasma citrulline (μM)	RBC citrulline (μM)	Urine citrulline (μM)
A	26.3	26.3	3.9
B	50.5	38.5	10.8
C	53.3	44.3	8.4
D	49.6	12.0	6.3
E	55.4	36.4	4.8
Mean	47.0	31.5	6.9[a,b]
SD	11.8	12.7	2.8

True citrulline concentrations were calculated as $[CIT]_{true} = [CIT]_{apparent}/k$, where $[CIT]_{apparent}$ is the amount of citrulline calculated using the calibration curve constructed using aqueous standards (Fig. 3a and b for plasma and urine, respectively), and k, a correction factor, is the slope of the line describing the relationship between added amounts of citrulline and measured amounts in the corresponding matrix (see Fig. 4a and c).

[a] Plasma versus urine ($p < 0.001$).

[b] RBC versus urine ($p < 0.01$).

three different biological matrices, such as human plasma, RBC and urine.

Although the extraction procedure for plasma and erythrocyte citrulline was adapted from Adams [30], the latter extraction procedure failed to yield a significant recovery of urinary citrulline. A different extraction scheme, using two sets of ion exchange resins, and adapted from that used for the separation of glutamine [31], was therefore used for urine citrulline.

The derivatization procedure leading to the formation of propyl-hepta-fluoro-butyryl ester derivatives has been used for many other amino acids, e.g., glutamine [32]. Although we tried

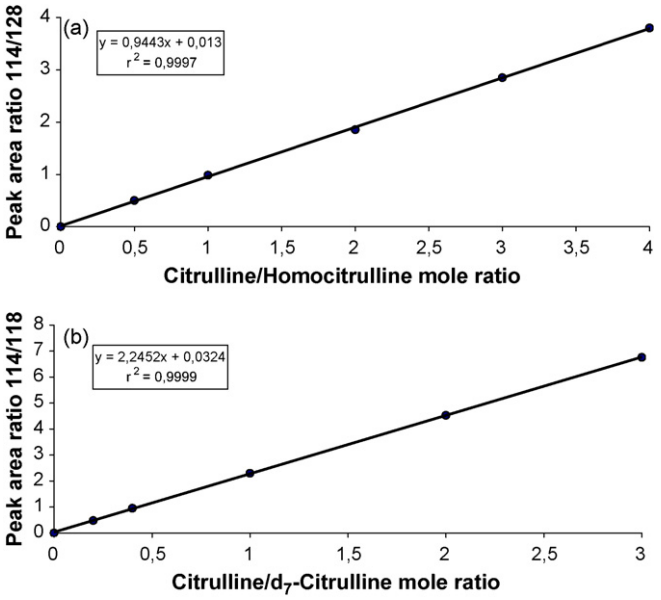

Fig. 3. (a) Standard curve for the GC/MS assay of citrulline, using homocitrulline as an internal standard. Relationship between 114/128 peak area ratio, and the citrulline/homocitrulline mole ratio in a set of standard aqueous solutions. (b) Standard curve for the GC/MS assay of citrulline, using L-[2,3, 3, 4, 4, 5, 5-$^2H_7$] citrulline as an internal standard. Relationship between 114/118 peak area ratio, and the citrulline/d_7-citrulline mole in a set of standard aqueous ratio solutions.

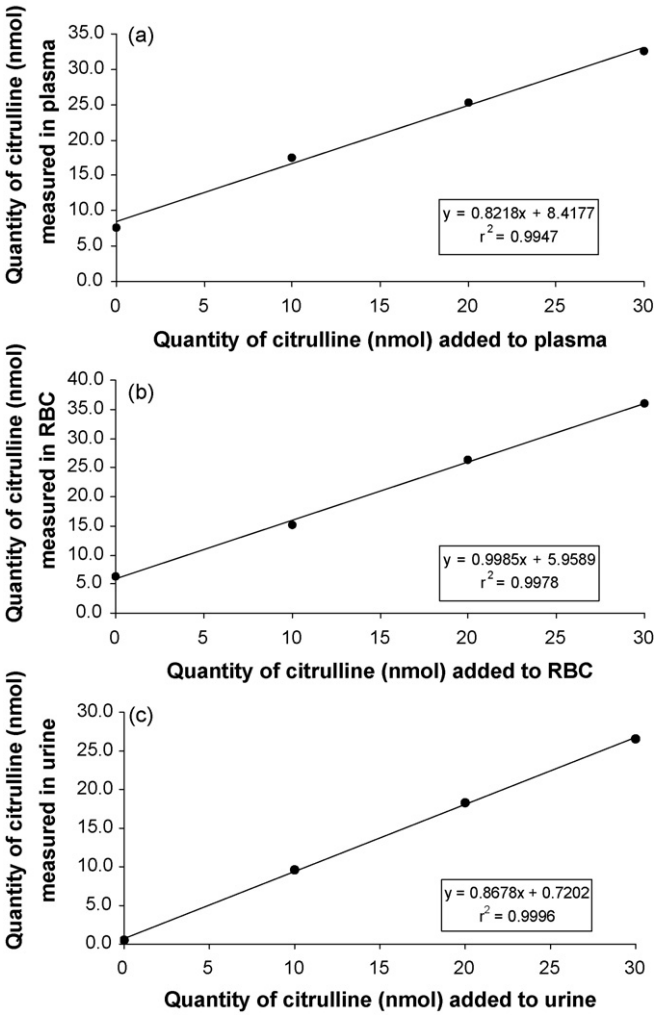

Fig. 4. (a) Relationship between the quantity of citrulline (nmol) measured with the current method in a biological sample, and the quantity of natural citrulline (nmol) spiked into that sample prior to extraction and derivatization: relationship is shown in plasma (a), RBC (b), and urine (c).

several derivatization procedures such as the tertbutyl, dimethylsilyl esters or methyl, heptafluorobutyl esters used by other workers [33,7], in our hands the use of propyl-hepta-fluoro-butyryl ester derivatives was found to produce better results in terms of peak shape, and stability of samples (data not shown).

Similarly, several internal standards such as thiocitrulline, $^{15}N_2$-citrulline and ^{13}C-citrulline were tried in the current study (data not shown): the best results were obtained for homocitrulline and L-[2,3, 3, 4, 4, 5, 5-$^2H_7$] citrulline. Indeed, calibration curves obtained for each set of internal standard were highly linear, with r^2 consistently between 0.999 and 1.000.

The current method proved sensitive, as attested by its low limit of detection (20 pmol of citrulline, i.e., less than 50 μL of plasma), and has satisfactory assay precision, reproducibility, and accuracy in the various biological fluids tested, as attested by the within-assay and day-to-day CV < 5%, and the >90% recovery. It is quite robust as derivatized samples can be stored for weeks prior to analysis, and assay can be performed using the electron impact mode of operation, a 'workhorse' instrument which

Author's personal copy

involves a lower cost of maintenance than chemical ionization GC/MS or liquid chromatography–mass spectrometry [34–35].

The plasma and urine citrulline levels obtained using the current method are consistent with those reported using other methods in similar in healthy adults [16,17,21,2,29]. We are not, however, aware of previous reports regarding RBC citrulline levels. The current method may thus prove useful for the measurement of the citrulline content in the intracellular compartment.

As many methods have been published for the determination of citrulline (e.g., [16–27]), the pros and cons of the present method deserve discussion. Like all techniques involving GC/MS [1,25], the current method involves a rather tedious extraction and derivatization procedure, a clear disadvantage compared to ion exchange chromatography [17], HPLC [23,24], or LC–MS [2,22]. On the other hand, like all methods using mass spectrometry as a technique of detection [1,25], the method opens the way to the performance of kinetic studies using stable isotope-labeled citrulline. Compared to previously reported GC/MS assays [1,25], the current method furthermore relies on electron impact GC/MS, a 'workhorse' instrument that is more widely available than LC–MS systems in analytical laboratories, and is a relatively low cost, low maintenance equipment. Finally, to the best of our knowledge, the current method is the only one tested in three biological matrices, i.e., plasma, red blood cells, and urine.

As the current method is robust and sensitive and can be used on fluids other than plasma, it appears suitable for use in clinical studies in populations of frail subjects or patients (e.g., preterm infants) in whom limiting the volume of blood draws is critical.

For instance, if citrulline were to be used as a therapeutic agent [14,15], it is important to determine how much citrulline is lost in urine. Similarly, when blood sampling is limited, measuring citrulline concentration in red blood cells may be helpful: as a matter fact, when blood is sampled in critically ill patients (e.g., premature infants), plasma is primarily used for the clinical monitoring of the patient's condition (measurement of glucose, electrolytes) whereas red cell pellets are usually disposed of as "waste": these waste samples could be used, provided red blood cell citrulline reflects plasma citrulline level. As such, the described method, should help in expanding the scope of clinical investigation of citrulline metabolism.

Acknowledgments

Carole Rougé was the recipient of a doctoral research fellowship from Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Switzerland). Olivier Le Bacquer was supported, in part, by a Nutricia postdoctoral fellowship. Part of this work was supported by grants from: the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2003) from the French Ministry of Health, and the Délégation à la Recherche Clinique (DRC 2003), CHU de Nantes and, the Agence Nationale de la Recherche (ANR PRNA-2005). We thank M. Chétiveaux, S. Crossouard, and V. Ferchaud-Roucher for their technical assistance, and gratefully acknowledge the volunteers who took part in the study.

References

[1] T. Lau, W. Owen, Y.M. Yu, N. Noviski, J. Lyons, D. Zurakowski, R. Tsay, A. Ajami, V.R. Young, L. Castillo, J. Clin. Invest. 105 (2000) 1217.
[2] J. Martens-Lobenhoffer, S.M. Bode-Böger, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 798 (2003) 231.
[3] A. Perry, in: A. Lajtha (Ed.), Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, New York, 1982.
[4] H. Wiesinger, Prog. Neurobiol. 64 (2001) 365.
[5] D. Rabier, P. Kamoun, Amino Acids 9 (1995) 299.
[6] E. Curis, I. Nicolis, C. Moinard, S. Osowska, N. Zerrouk, S. Benazeth, L. Cynober, Amino Acids 29 (2005) 177.
[7] L. Castillo, L. Beaumier, A.M. Ajami, V.R. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1996) 11460.
[8] P. Crenn, C. Coudray-Lucas, F. Thuillier, L. Cynober, B. Messing, Gastroenterology 119 (2000) 1496.
[9] J.M. Rhoads, E. Plunkett, J. Galanko, S. Lichtman, L. Taylor, A. Maynor, T. Weiner, K. Freeman, J.L. Guarisco, G.Y. Wu, J. Pediatr. 146 (2005) 542.
[10] P. Crenn, K. Vahedi, A. Lavergne-Slove, L. Cynober, C. Matuchansky, M. Messing, Gastroenterology 124 (2003) 1210.
[11] P.A. Pappas, J.M. Saudubray, A.G. Tzakis, D. Rabier, M.R. Carreno, O. Gomez-Marin, F. Huijing, B. Gelman, D.M. Levi, J.R. Nery, T. Kato, N. Mittal, S. Nishida, J.F. Thompson, P. Ruiz, Transplant. Proc. 34 (2002) 915.
[12] G. Gondolesi, T. Fishbein, M. Chehade, A. Tschernia, M. Magid, S. Kaufman, K. Raymond, C. Sansaricq, N. LeLeiko, Transplant. Proc. 34 (2002) 918.
[13] L.C. Lutgens, N.M. Blijlevens, N.E. Deutz, J.P. Donnellu, P. Lambin, B.E. de Pauw, Cancer 103 (2005) 191.
[14] S. Osowska, C. Moinard, N. Neveux, C. Loi, L. Cynober, Gut 53 (2004) 1781.
[15] S. Osowska, T. Duchemann, S. Walrand, A. Paillard, Y. Boirie, L. Cynober, C. Moinard, Am. J. Physiol. 291 (2006) E582.
[16] P. Kamoun, P. Parvy, L. Cathelineau, Clin. Chem. 29 (1983) 398.
[17] J. Le Boucher, C. Charret, C. Coudray-Lucas, J. Giboudeau, L. Cynober, Clin. Chem. 43 (1997) 1421.
[18] W.Z. Zhang, D.M. Kaye, Anal. Biochem. 326 (2004) 87.
[19] D. Fekkes, A. van Dalen, M. Edelman, A. Voskuilen, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 669 (1995) 177.
[20] A.S. Feste, J. Chromatogr. 574 (1992) 23.
[21] B. Alteheld, P. Stehle, P. Fürst, in: L. Cynober (Ed.), Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2004, p. 29 (Chapter 2).
[22] M.H. Van Eijk, D.R. Rooyakkers, P.B. Soeters, N.E.P. Deutz, Anal. Biochem. 271 (1999) 8.
[23] G. Wu, J. Chromatogr. 641 (1993) 168.
[24] H.M. Van Eijk, D.R. Rooyakkers, N.E. Deutz, J. Chromatogr. 620 (1993) 143.
[25] L. Castillo, T.E. Chapman, M. Sanchez, Y.M. Yu, J.F. Burke, A.M. Ajami, J. Vogt, V.R. Young, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993) 7749.
[26] K. Igarashi, Y. Sugiyama, F. Kasuya, H. Inoue, R. Matoba, N. Castagnoli, J. Chromatogr. B 746 (2000) 33.
[27] I. Pérez-Neri, S. Montes, M.C. Boll, J. Ramírez-Bermúdez, C. Ríos, J. Chromatogr. B 806 (2004) 133.
[28] P.R. Parvy, J.I. Bardet, D.M. Rabier, P.P. Kamoun, Clin. Chem. 34 (1988) 2092.
[29] N. Neveux, P. David, L. Cynober, in: L. Cynober (Ed.), Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, 2004, p. 17 (Chapter 1).
[30] R.F. Adams, J. Chromatogr. 95 (1995) 189.

Author's personal copy

[31] D. Darmaun, M.J. Manary, D.E. Matthews, Anal. Biochem. 147 (1985) 92.
[32] O. Le Bacquer, H. Nazih, H. Blottière, D. Meynial-Denis, C. Laboisse, D. Darmaun, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281 (2001) G1340.
[33] I. Nissim, M. Yudkoff, T. Terwilliger, S. Segal, Anal. Biochem. 131 (1983) 75.
[34] P.G. Boelens, G.C. Melis, P.A. Van Leeuwen, G.A. Ten Have, N.E. Deutz, Am. J. Physiol. 291 (2006) E683.
[35] M.C. Van de Poll, M.P. Siroen, P.A. Van Leeuwen, P.B. Soeters, G.C. Melis, P.G. Boelens, N.E. Deutz, C.H. Dejong, Am. J. Clin. Nutr. 85 (2007) 167.

ETUDE 5 : Manipulation de la disponibilité de la citrulline chez l'homme.

Rougé C, Desrobert C, Robins A, Le Bacquer O, Volteau C, De La Cochetière MF et Darmaun D.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007, **293** : G1061-7.

Bien que les concentrations de citrulline plasmatique et urinaire aient été quantifiées de longue date chez l'homme, les facteurs susceptibles de moduler la disponibilité de cet acide aminé n'ont pas été encore beaucoup explorés. Plusieurs études ont rapporté chez l'homme, que l'administration de glutamine exogène, principal précurseur de la citrulline, entraînait une augmentation dose-dépendante de la citrullinémie [77]. En revanche, les effets de la dépletion en glutamine sur la citrulline plasmatique n'ont pas encore été étudiés chez l'homme. Par ailleurs, chez l'homme, peu de choses sont connues concernant l'effet de l'administration de citrulline exogène sur les taux circulants et l'excrétion de la citrulline, et sur les concentrations des autres substrats azotés associés au métabolisme de la citrulline.

Dans ce contexte, les objectifs de notre étude ont été de déterminer 1) si les concentrations de citrulline circulante pouvaient être réduites *in vivo* chez l'homme, en induisant une déplétion en glutamine, et augmentées par l'administration de citrulline exogène, et 2) si la disponibilité en citrulline affectait l'excrétion rénale de citrulline, les concentrations des acides aminés associés au métabolisme de la citrulline, ainsi que ceux du NO, et de l'urée.

Dix adultes sains ont été recrutés, après signature d'un formulaire de consentement éclairé, lor d'un protocole réalisé en 2003 après accord du CCPPRB des Pays-de-la-Loire, et ont été étudiés à 3 reprises : 1) à l'état basal, 2) après prise orale de citrulline (0,18g/Kg/j), dans le but d'augmenter la concentration circulante de citrulline, et 3) après 24 heures de traitement par le phénylbutyrate de sodium *per os* (0,36g/Kg/j réparties en 6 prises), dans le but de faire baisser la concentration circulante de citrulline. Les concentrations de citrulline plasmatique, globulaire et urinaire ont été déterminées par chromatographie gazeuse couplée à

la spectrométrie de masse à 3 heures d'intervalle entre 11H00 et 20H00 pour chacun des 3 jours de l'étude.

Quel que soit le jour de l'étude, la citrulline globulaire était plus faible que la citrulline plasmatique et le ratio Citrulline globulaire/Citrulline plasmatique était de 0,60 ± 0,04 et l'excrétion de citrulline urinaire était inférieure à 1% de la citrulline filtrée par les reins. Le traitement au phénylbutyrate a induit une diminution de 7% de la glutamine plasmatique ($p=0,013$) et une diminution de 18 ± 14% ($p<0,0001$) et de 19 ± 17% ($p<0,01$) de la citrulline plasmatique et urinaire, respectivement, sans altération de la citrulline globulaire. L'administration orale de citrulline exogène était associée avec 1) une augmentation de la citrulline plasmatique (39 ± 4 *versus* 225 ± 44 µmol/L), urinaire (0,9 ± 0,3 *versus* 6,2 ± 3,8 µmol/mmol creatinine) et globulaire (23 ± 1 *versus* 52 ± 9 µmol/L) et 2) une augmentation des taux d'arginine plasmatique (multipliés par 2) sans altération des taux d'urée plasmatique et de l'excrétion urinaire d'urée et 3) une amélioration du bilan azoté (+57%).

Les résultats mis en évidence au cours de notre étude nous permettent de conclure que chez l'homme sain, la déplétion en glutamine plasmatique, principal précurseur de la citrulline entraîne une diminution de la citrulline plasmatique, et à l'inverse, que l'administration orale de citrulline exogène améliore la disponibilité en citrulline et arginine plasmatique ainsi que le bilan azoté.

Carole Rougé, Clotilde Des Robert, Alexander Robins, Olivier Le Bacquer, Christelle Volteau, Marie-France De La Cochetière and Dominique Darmaun
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293:1061-1067, 2007. First published Sep 27, 2007;
doi:10.1152/ajpgi.00289.2007

You might find this additional information useful...

This article cites 37 articles, 14 of which you can access free at:
http://ajpgi.physiology.org/cgi/content/full/293/5/G1061#BIBL

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:
http://ajpgi.physiology.org/cgi/content/full/293/5/G1061

Additional material and information about ***AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*** can be found at:
http://www.the-aps.org/publications/ajpgi

This information is current as of November 11, 2007 .

AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology publishes original articles pertaining to all aspects of research involving normal or abnormal function of the gastrointestinal tract, hepatobiliary system, and pancreas. It is published 12 times a year (monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2005 by the American Physiological Society. ISSN: 0193-1857, ESSN: 1522-1547. Visit our website at http://www.the-aps.org/.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293: G1061–G1067, 2007.
First published September 27, 2007; doi:10.1152/ajpgi.00289.2007.

Manipulation of citrulline availability in humans

Carole Rougé,[1] Clotilde Des Robert,[1,2,4] Alexander Robins,[1] Olivier Le Bacquer,[1] Christelle Volteau,[5] Marie-France De La Cochetière,[3] and Dominique Darmaun[1,4]

[1]*Unité mixte de recherche 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Institut National de la Recherche Agronomique and University of Nantes, Human Nutrition Research Center, Nantes;* [2]*Néonatologie, Hôpital Mère-et-Enfant, Centre hospitalier universitaire (CHU) de Nantes;* [3]*EA 3826, Thérapeutiques cliniques et expérimentales des maladies infectieuses, University of Nantes;* [4]*Centre d'Investigation Clinique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Centre hospitalier universitaire (CHU) de Nantes; and* [5]*Biostatistiques, Pôle Information médicale, épidémiologie et santé publique, CHU de Nantes, Nantes, France*

Submitted 25 June 2007; accepted in final form 20 September 2007

Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, Volteau C, De La Cochetière M-F, Darmaun D. Manipulation of citrulline availability in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1061–G1067, 2007. First published September 27, 2007; doi:10.1152/ajpgi.00289.2007.—To determine whether circulating citrulline can be manipulated in vivo in humans, and, if so, whether citrulline availability affects the levels of related amino acids, nitric oxide, urinary citrulline, and urea nitrogen, 10 healthy volunteers were studied on 3 separate days: *1*) under baseline conditions; *2*) after a 24-h treatment with phenylbutyrate (0.36 $g \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$), a glutamine "trapping" agent; and *3*) during oral L-citrulline supplementation (0.18 $g \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$), in randomized order. Plasma, erythrocyte (RBC), and urinary citrulline concentrations were determined by gas chromatography-mass spectrometry at 3-h intervals between 1100 and 2000 on each study day. Regardless of treatment, RBC citrulline was lower than plasma citrulline, with an RBC-to-plasma ratio of 0.60 ± 0.04, and urinary citrulline excretion accounted for <1% of the citrulline load filtered by kidney. Phenylbutyrate induced an ~7% drop in plasma glutamine ($P = 0.013$), and 18 ± 14% ($P < 0.0001$) and 19 ± 17% ($P < 0.01$) declines in plasma and urine citrulline, respectively, with no alteration in RBC citrulline. Oral L-citrulline administration was associated with *1*) a rise in plasma, urine, and RBC citrulline (39 ± 4 vs. 225 ± 44 μmol/l, 0.9 ± 0.3 vs. 6.2 ± 3.8 μmol/mmol creatinine, and 23 ± 1 vs. 52 ± 9 μmol/l, respectively); and *2*) a doubling in plasma arginine level, without altering blood urea or urinary urea nitrogen excretion, and thus enhanced nitrogen balance. We conclude that *1*) depletion of glutamine, the main precursor of citrulline, depletes plasma citrulline; *2*) oral citrulline can be used to enhance systemic citrulline and arginine availability, because citrulline is bioavailable and very little citrulline is lost in urine; and *3*) further studies are warranted to determine the mechanisms by which citrulline may enhance nitrogen balance in vivo in humans.

nutrition; gut; glutamine; protein metabolism

CITRULLINE IS A NONPROTEIN amino acid found as a free amino acid in most biological fluids such as plasma, urine, and cerebrospinal fluid (20, 24, 31, 38, 39, 41). Two main pathways account for citrulline production (9, 32, 38, 39; Rougé C, Des Robert C, Robins A, Le Bacquer O, De La Cochetière MF, Darmaun D, unpublished observations): *1*) citrulline is synthesized from glutamine in enterocytes, by condensation of ornithine and carbamyl phosphate (a reaction catalyzed by ornithine carbamyl-transferase); and *2*) the conversion of arginine to nitric oxide produces citrulline as well, in a reaction catalyzed by nitric oxide (NO) synthetase (NOS) in most NO-producing tissues. Using stable isotope-labeled arginine and citrulline, other workers have found the contribution of arginine to citrulline synthesis to account for ~10% of circulating citrulline flux, and nearly 90% arise from glutamine (6, 38, 39, 43). Citrulline produced by gut is released as such into the bloodstream. Approximately 83% of the circulating citrulline is taken up by kidney (38, 39, 43), where citrulline is converted to arginine by arginosuccinate synthase (ASS) and arginosuccinate lyase (ASL) in cells of the proximal tubules (22). The production of arginine from citrulline accounts for 60% of the overall rate of de novo arginine synthesis in the body, but only 5–15% of circulating arginine (6, 26). Released as such into the bloodstream, arginine is used by most tissues for protein synthesis and other purposes (11, 14).

Interest about citrulline has risen substantially in the last decade, because plasma citrulline has been proposed as a noninvasive index of intestinal function. Plasma citrulline level indeed correlated with residual bowel length after extensive small intestinal resection (7, 33) or with small intestinal mass in celiac disease (8), intestinal transplantation (30, 16), or radiation-induced enteritis (23). In addition, recent animal studies suggest that citrulline may have a protein anabolic effect under specific settings: a citrulline-enriched diet indeed enhanced nitrogen balance after extensive small intestinal resection (28) and muscle protein synthesis in old, undernourished rats (29).

Even though several workers have reported plasma and urinary citrulline levels in various age groups in humans (5, 18, 24, 27), the factors that may regulate citrulline availability have not been specifically investigated. Since glutamine is the main precursor of citrulline, several groups have shown that enteral glutamine supplementation resulted in a rise in plasma citrulline concentration: for instance, plasma citrulline rose ~33, 30, and 27% in healthy volunteers who received enteral glutamine at rates of 0.04 (12), 0.05 (25), and 0.09 $g \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ (35), respectively. Yet, the effects of glutamine depletion, such as observed in stress, on plasma citrulline have not been addressed. Moreover, little is known on the effect of exogenous citrulline administration on the circulating levels and excretion rates of citrulline, other related nitrogen substrates, or urinary urea in vivo in humans.

Address for reprint requests and other correspondence: D. Darmaun, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Hotel-Dieu Hospital, 2ème étage aile nord, 44093 Nantes cedex 1, France (e-mail: ddarmaun@chu-nantes.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

 0193-1857/07 $8.00 Copyright © 2007 the American Physiological Society

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

The aims of the present study therefore were *1*) to determine whether circulating citrulline levels can be decreased in vivo in humans, by depleting glutamine, its main endogenous precursor, and raised by oral citrulline supplementation, and *2*) if so, whether citrulline availability affects the levels of related amino acids, nitric oxide, urinary citrulline, and urea nitrogen.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

All chemicals (propan-1-ol, acetylchloride, hydrogen chloride, ammonium hydroxide, potassium hydroxide, 5-sulfosalicylic acid, ethylacetate, and heptafluorobutyric anhydride), citrulline (L-2-amino-5-ureidovaleric acid), and ion exchange resins (Dowex 50WX8–200 and Dowex 1X8) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L-[2,3,3,4,4,5,5-$^2H_7$] citrulline (d7-citrulline) was obtained from CDN Isotopes (Cil Cluzeau Info Labo; SteFoy la Grande, France) and homocitrulline (ε-carbamoyl lysine) from Advanced Asymetrics (Millstadt). Phenylbutyrate (Ammoniaps) was purchased from Orphan Europe (Paris-La Défense, France), and L-citrulline (Stimol) from Biocodex (Gentilly, France).

Subjects

Ten young, healthy adult male volunteers were enrolled in studies performed in the Clinical Investigation Center at the Hôtel-Dieu Hospital, Nantes, France after signing an informed consent form, according to protocols approved by the local Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes n°2 des Pays de la Loire). Only subjects who were free of any gastrointestinal, metabolic, renal, or hematological disease and were not taking any medication were recruited. Subjects were 24.2 ± 3.3 yr old (range 20–32) and had a mean body mass index (weight/height^2) of 22.5 ± 2.3 kg/m^2.

Experimental Design

Each subject underwent three separate studies with a 1-wk washout period in between study days. On each study day, subjects reported after an overnight fast to the Clinical Investigation Center at Hotel-Dieu Hospital, Nantes, France, where they stayed all day. They remained at rest and received a standard diet (35 kcal·kg^{-1}·day^{-1}, 16% protein, 30% fat, and 54% carbohydrate) supplied as three daily meals at 0830, 1230, and 1900. Each subject was studied on three occasions: *1*) under baseline conditions; *2*) during oral L-citrulline administration (0.18 g·kg^{-1}·day^{-1}) divided into five equal doses given at 3-h intervals between 0700 and 1900 to increase circulating citrulline; and *3*) after 24 h of treatment with phenylbutyrate per os (0.36 g·kg^{-1}·day^{-1}) split in six equal doses given at 4-h intervals to decrease circulating citrulline.

The baseline study was always performed first, the order of the other two studies was randomized. The dose of phenylbutyrate chosen was shown to result in an ~25% decline in plasma glutamine concentration (10). The dose of citrulline was chosen so as to represent approximately four times plasma citrulline flux, based on studies by other workers (6, 38, 39).

On each study day, 5 ml of blood were obtained at 1100, 1400, 1700, and 2000 into sampling tubes containing EDTA, and urine was collected two times, between 0800 and 1400 and between 1400 and 2000. Blood cells and plasma were immediately separated by centrifugation at 3,000 *g* for 10 min at 4°C, and the resulting samples were stored at −80°C until analysis. Urine samples were aliquoted and stored immediately at −80°C until analysis.

Analytical Methods

GC-MS. Blood samples (5 ml) were drawn into sampling tubes containing EDTA. Blood cells and plasma were immediately separated by centrifugation at 3,000 *g* for 10 min at 4°C, and the resulting samples were stored at −80°C until analysis. The concentration of citrulline in plasma, erythrocytes (RBCs), and urine was measured by GC-MS as described (Rougé et al., unpublished observations).

Briefly, before analysis of plasma and RBC, a 10-nmol aliquot of 0.1 mol/l homocitrulline, an analog of citrulline, was added to 200 μl of sample, as an internal standard. Citrulline was extracted from deproteinized plasma and blood cells on Dowex 50 cation exchange resin. Urine samples were aliquoted soon after collection and stored immediately at −80°C until analysis. Before analysis of urine, a 10-nmol aliquot of d_7-citrulline was added to 400 μl of urine, as an internal standard. Urine samples were first passed on a Dowex 1X8 anion exchange resin and then on Dowex 50WX8 cation exchange resin.

Citrulline from plasma, RBC, or urine extracts was derivatized to its propyl heptafluorobutyryl derivative (Rougé et al., unpublished observations), and analysis was performed using an HP 5890 series II gas chromatograph coupled with a 5971 mass selective detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) using a DB-1 (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness; J & W Scientific, Courtaboeuf, France) capillary column operated in the splitless mode. The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization mode. The acquisition time was 14 min. Ions at m/z = 114, 118, and 128, representing natural citrulline, d_7-citrulline, and homocitrulline, respectively, were selectively monitored.

Amino acid analyzer. Glutamine, ornithine, and arginine analyses were performed by using a Biotronik LC5001 automatic amino acid analyzer.

Nitrate and nitrite assay. Urinary nitrates and nitrites were quantified by a commercial kit (Roche-Diagnostic, Meylan, France), following the Griess method.

Total urinary nitrogen excretion was quantified by the Kjeldhal method.

Calculations

The renal clearance of creatinine, a measure of glomerular filtration rate (GFR; ml/min), was calculated as GFR = $[creat]_u \times V/[creat]_p$, where $[creat]_u$ and $[creat]_p$ are the concentrations of creatinine in urine and plasma (nmol/ml), respectively, and V is urinary output (ml/min). Citrulline clearance (ml/min) was calculated as: $V \times [cit]_u/[cit]_p$, where $[cit]_u$ is urinary citrulline concentration (nmol/ml), and $[cit]_u$ is the concentration of citrulline in urine (nmol/ml). The fraction (%) of citrulline filtered by glomerulus that was excreted into urine was calculated as $(100 \times V \times [cit]_u)/([cit]_p \times GFR)$. Nitrogen balance (N balance, mmol N/12 h) was estimated as N balance = $N_{in} - N_{out}$, where N_{in} is overall nitrogen intake (mmol nitrogen/12 h). Nitrogen intake was calculated as the sum of dietary protein nitrogen (based on food composition tables), plus nitrogen provided as oral citrulline, and N_{out} is total urinary nitrogen output, as quantified by the Kjeldhal method, between 0800 and 2000.

Statistical Analysis

Results are reported as means ± SD for amino acid quantification. Mixed linear models were used to test order of treatment and the effects of time, phenylbutyrate treatment, and oral citrulline on amino acids concentrations and to assess the relationships between plasma and RBC citrulline levels and between plasma and urine citrulline levels. The use of a mixed linear model provided correlations that did not suffer from pseudoreplication, since it is especially designed for repeated data points obtained at various time points (13), contrary to conventional linear models.

RESULTS

Order of Regimens

Because the order of regimens per se affected neither plasma nor RBC or urine citrulline (data not shown), the 10 subjects

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

were considered as a single group studied under three separate regimens: control (baseline), phenylbutyrate treatment, and oral citrulline supplementation.

Diurnal Variation of Plasma and RBC Citrulline

On the control day, plasma citrulline tended to decline at 1400 and 2000, compared with the earlier samples (Fig. 1; Table 1). In contrast, RBC citrulline level did not vary significantly throughout the day.

Effect of Oral Phenylbutyrate

As expected, treatment with phenylbutyrate (0.36 $g \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) induced a significant, 7.3 ± 9.2% ($P = 0.013$) decline in plasma glutamine, from 501 ± 103 μmol/l to 464 ± 106 μmol/l ($n = 10$ subjects, 1 sampling time per subject at 1100). As a consequence, and as expected, phenylbutyrate treatment was associated with a significant, 18 ± 14% ($P < 0.0001$) decline in plasma citrulline (39 ± 4 μmol/l vs. 32 ± 3 μmol/l; $n = 10$ subjects, 4 sampling times per subject; baseline vs. phenylbutyrate treatment), and a 19 ± 17% ($P < 0.01$) decline in urinary citrulline (0.9 ± 0.3 μmol/mmol of creatinine vs. 0.7 ± 0.2 μmol/mmol of creatinine; baseline vs. phenylbutyrate treatment). RBC citrulline was not altered ($P = 0.19$), nor was plasma ornithine ($P = 0.26$), plasma arginine ($P = 0.26$), or urinary arginine ($P = 0.14$).

Phenylbutyrate treatment was associated with a significant reduction in urinary nitrate (15 ± 39%; $P = 0.06$), and urinary urea excretion (17 ± 15% $P < 0.0001$), without any alteration in plasma urea ($P = 0.40$).

Effect of Oral Citrulline Supplementation

As expected, oral L-citrulline administration induced a dramatic, 488 ± 92% rise in plasma citrulline (from 39 ± 4 to 225 ± 44 μmol/l; $P < 0.0001$). Urinary citrulline excretion rose accordingly (+571 ± 266%; from 0.9 ± 0.3 to 6.2 ± 3.8 μmol/mmol of creatinine; $P < 0.001$), whereas RBC citrulline only rose 139 ± 52% (from 23 ± 1 to 52 ± 9 μmol/l; $P < 0.0001$). Plasma glutamine, ornithine, and arginine rose 24 ± 21% (from 501 ± 103 to 614 ± 110 μmol/l; $P = 0.0007$), 73 ± 42% (from 90 ± 29 to 150 ± 46 μmol/l; $P = 0.0003$), and 92 ± 57% (from 134 ± 33 to 247 ± 62 μmol/l; $P = 0.00005$), respectively. Oral citrulline supplementation did not alter urinary arginine ($P = 0.15$), nor plasma urea ($P = 0.23$), urinary urea ($P = 0.56$), or urinary nitrate excretion ($P = 0.55$).

Because GFR was assessed by using creatinine clearance, the load of citrulline filtered by glomerulus could be calculated (see *Calculations*), as well as the fraction of this load that is eventually excreted into urine. During exogenous citrulline supplementation, 0.2 ± 0.1% of the citrulline load filtered by glomerulus, and 0.4 ± 0.2% of the arginine filtered, were excreted in urine. The ratio of urinary urea nitrogen to total urinary nitrogen was 77 ± 11% on the control day, and 85 ± 8% on the citrulline supplementation day ($P = 0.15$; not significant). Oral citrulline supplementation was associated with an appreciable rise in nitrogen balance (+57%, from 683 ± 246 to 970 ± 187 mmol nitrogen/12 h; $P = 0.0053$) (Fig. 2).

RBC vs. Plasma Citrulline Concentrations

On each of the 3 study days, RBC citrulline was significantly lower than plasma citrulline (Table 1). Even though the average ratio of RBC-to-plasma citrulline concentration (RBC/P) was 0.60 ± 0.04, this ratio varied widely between subjects, ranging between 0.26 and 1.09. Five subjects indeed had RBC/P ratios between 0.74 and 1.09 (not different from 1.0), i.e., they had no significant citrulline concentration gradient across red cell membrane, whereas five other subjects had RBC/P ratios that were below 1.0 (0.26–0.40). The RBC/P ratio was unaltered (0.71 ± 0.07; $P = 0.126$) after phenylbutyrate treatment but declined to 0.23 ± 0.03 ($P = 0.001$) during oral citrulline supplementation.

Relationship Between Changes in Red Cell and Plasma Citrulline

There was a significant linear relationship between RBC citrulline and plasma citrulline levels under baseline conditions ($P = 0.024$), and during oral citrulline supplementation ($P < 0.0001$) (Fig. 3). The slope of the regression line describing the correlation was, however, weak, and no significant linear relation was observed between plasma and RBC citrulline during phenylbutyrate treatment ($P = 0.49$).

Relationship Between Changes in Urine and Plasma Citrulline

Even though urinary citrulline excretion and plasma citrulline concentration changed in the same direction, and even though the rise with oral citrulline supplementation and the decline during phenylbutyrate treatment were of the same

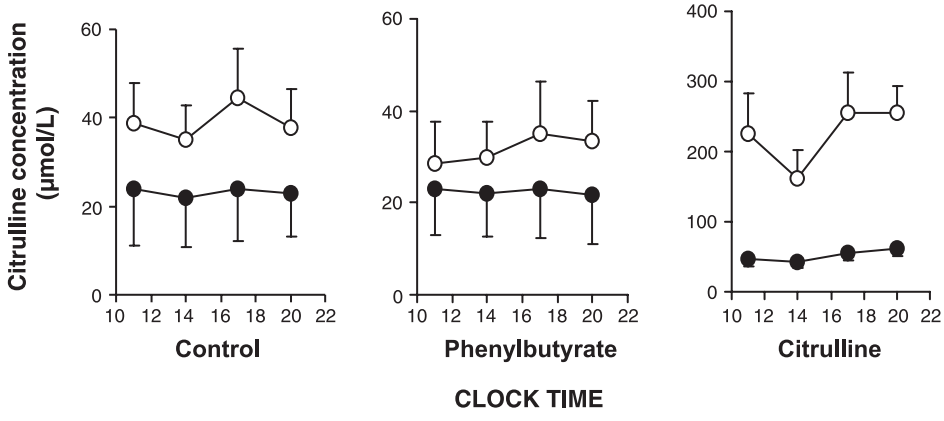

Fig. 1. Composite time course of plasma citrulline (○) and erythrocyte (RBC) citrulline (●) concentration under baseline conditions (*left*), after phenylbutyrate treatment (*middle*), and during oral citrulline supplementation (*right*) in 10 healthy adult subjects.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

Table 1. *Plasma citrulline concentration, and urinary excretion of citrulline and related nitrogen compounds under control conditions, and during treatment with phenylbutyrate or oral citrulline supplementation*

		Regimen								
		Baseline			Phenylbutyrate			Citrulline Supplementation		
	Time	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Plasma citrulline, μmol/l	1100–2000	39	4	39	32	3	30	225	44	32
RBC citrulline, μmol/l	1100–2000	23	1	21	22	1	20	52	9	50
RBC/plasma citrulline	1100–2000	0.60	0.04	0.57	0.71	0.07	0.62	0.23	0.03	0.23
Urinary citrulline, μmol/mmol of creatinine	0800–2000	0.90	0.14	0.8	0.65	0.07	0.6	6.60	0.99	5.2
Plasma glutamine, μmol/l		501	103	528	464	106	483	614	110	635
Plasma ornithine, μmol/l	1100	90	29	88	83	25	79	150	46	127
Plasma arginine, μmol/l	1100	134	33	137	122	37	122	247	62	245
Urine arginine, μmol/mmol of creatinine	1100	1.2	0.8	1.3	3.4	2.0	3.0	8.6	14.7	3.5
Urine nitrates, mmol N/12 h	0800–2000	1.0	0.6	0.8	0.8	0.5	0.6	0.9	0.7	0.6
Urinary urea excretion, mmol N/12 h	0800–2000	415.2	133.3	227.5	374.0	84.6	124.5	437.7	98.9	163
Plasma urea, mmol/l	0800–2000	5.2	1.3	5.1	4.2	0.9	4.0	5.0	1.1	4.5
Total urinary nitrogen, mmol N/12 h*	0800–2000	683	246	776	538	135	494	970	187	975
GFR, ml/min†	0800–2000	134.4	22.6	132.2	129.2	22.6	139.4	151.5	28.1	154.6
Clearance of citrulline, ml/min	0800–2000	0.27	0.12	0.21	0.27	0.12	0.23	0.36	0.24	0.27
Clearance of arginine, ml/min	0800–1200	0.16	0.23	0.09	0.40	0.39	0.32	0.58	0.33	0.59
% Citrulline excreted into urine	0800–2000	0.20	0.08	0.18	0.21	0.07	0.20	0.22	0.12	0.17
% Arginine excreted into urine	0800–1200	0.11	0.14	0.06	0.32	0.29	0.22	0.37	0.20	0.34

Amino acid concentrations, clearance, and % of amino acids excreted into urine were averaged for each subject on each study day. RBC, erythrocytes; N, nitrogen. *Total urinary nitrogen was quantified in 8 of the 10 volunteers. †Glomerular filtration rate (GFR) was calculated as urinary creatinine excretion (μmol/min)/plasma creatinine concentration (μmol/ml).

magnitude in urine and plasma, no significant linear relationship was observed between urine citrulline and plasma citrulline levels under any of the regimens.

DISCUSSION

The findings of the present study suggest plasma citrulline levels can be lowered by glutamine depletion and raised by oral citrulline administration. The data further suggest incomplete equilibration of citrulline between plasma and RBCs and extensive reabsorption of citrulline by renal tubule, because <1% of an oral dose of citrulline is excreted in urine. Finally, to the best of our knowledge, the present study is first to demonstrate that oral citrulline can be used to enhance the availability of citrulline and arginine in systemic bloodstream, whereas it does not enhance urea excretion and may thus improve nitrogen balance in vivo in humans.

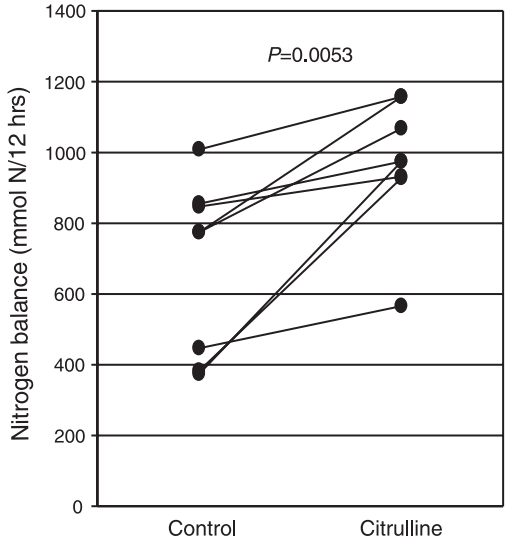

Fig. 2. Nitrogen balance under baseline conditions and during oral citrulline supplementation in 8 healthy volunteers.

Even though the plasma and urine citrulline levels found in our subjects are consistent with earlier reports (7, 15, 17, 21, 24, 27), we observed fluctuations in plasma citrulline through the day under baseline conditions. The exact mechanism for the fluctuations in plasma citrulline on the control day is unclear: although protein does not contain any citrulline, meal protein supplies amino acids that are potential precursors for citrulline synthesis, such as glutamate and glutamine, which could potentially increase plasma citrulline. However, we observed a decline in plasma citrulline: this suggests that either the amino acids derived from meal protein are predominantly used for purposes other than citrulline synthesis (e.g., protein synthesis) or citrulline utilization is increased after meals. Accordingly, Rabier and Kamoun (32) showed that plasma citrulline declined after a high-protein meal and returned to normal value 4 h later. This finding implies that if plasma citrulline is used as a noninvasive marker to monitor intestinal function attention should be paid to the time of sampling.

The present data suggest plasma citrulline can be depleted by treatment with phenylbutyrate, a glutamine-trapping agent. The ~18% decline in plasma citrulline observed in the present study during phenylbutyrate treatment is likely secondary to the 7% drop in plasma glutamine, the main precursor of citrulline. The lesser degree of glutamine depletion observed in this study, compared with our previous study (~7% vs. ~25%; $P = 0.01$) despite the same dose of phenylbutyrate (0.36 $g \cdot kg^{-1} \cdot day^{-1}$) (10), likely reflects differences in study design, since subjects were fed in the present study, rather than fasted as in earlier reports (10). The ~17% decline in plasma and urinary urea during treatment with phenylbutyrate is consistent with the fact that glutamine is the main precursor of urea. The fact that plasma citrulline depends on prevailing glutamine

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

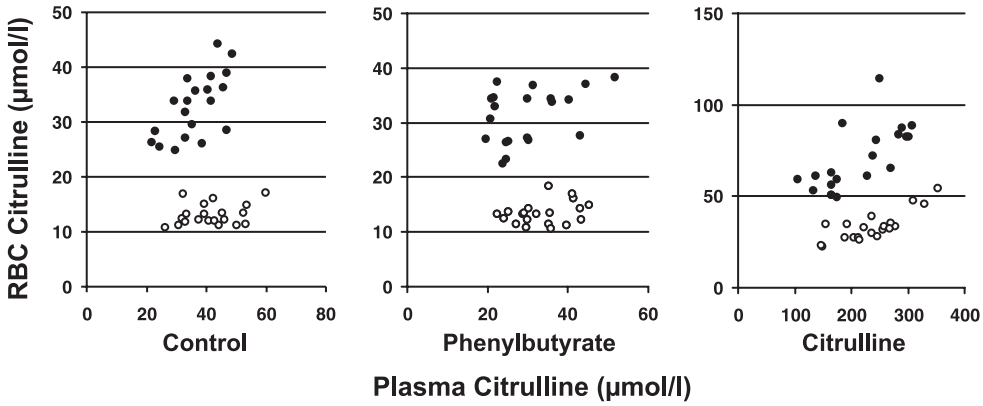

Fig. 3. Relationship between citrulline concentrations in plasma (P) and RBCs under baseline conditions (*left*), after phenylbutyrate treatment (*middle*), and during oral citrulline supplementation (*right*) in 10 healthy adult subjects. ●, Subjects in whom baseline RBC/P citrulline concentration ratio did not significantly differ from 1 (0.74–1.09); ○, subjects in whom baseline RBC/P ratio was below 1 (0.26–0.40).

levels suggests that caution should be exercised when using plasma citrulline as an index of intestinal function in clinical situations known to produce glutamine depletion, such as acute illness and stress (40).

We are not aware of earlier studies on RBC citrulline in humans. The concomitant assessment of RBC and plasma citrulline concentration revealed a wide range of variation in the RBC/P citrulline concentration ratio. Under baseline conditions, citrulline concentration was consistently lower in RBC than plasma; yet, whereas RBC/P ratio was close to 1.0 in five subjects, it was below 1.0 (0.26–0.40) in the remaining five. When the entire data set is considered as a whole, the correlation between plasma and RBC citrulline levels is weak (Fig. 3). This may be due to the heterogeneity of the population studied. When the population was divided in two subgroups, based on the RBC/P citrulline concentrations under baseline conditions, a different picture emerged. In subjects who had a low baseline RBC/P ratio (<1.0), changes in RBC citrulline did not correlate with changes in plasma citrulline. In contrast, in the five other subjects in whom baseline RBC/P ratio was close to 1.0, the changes in RBC citrulline induced by phenylbutyrate and oral citrulline tended to correlate with changes in plasma.

The observation that two groups were identified with regard to plasma-to-RBC citrulline ratio is intriguing. This heterogeneity may reflect differences either in citrulline metabolism or in citrulline transport across the membrane of RBC. Citrulline uptake involves an active, Na^+-dependent transport in rat small intestine (37) and in Caco-2 cells, a model of human enterocytes (3). Although citrulline transport has been characterized in arterial smooth muscle (42) and neurons as well (36), we are not aware of studies of citrulline transport across the RBC membrane. Studies using incubation of fresh RBCs in the presence of labeled citrulline would be required to address this issue. On the other hand, differences in the expression of enzymes involved in RBC citrulline metabolism among subjects could explain the results. In a population of healthy volunteers, Apostol and Tayek (2) observed two different patterns in the response of plasma citrulline to arginine supplementation: some increased plasma citrulline, whereas others did not. They speculate that NO synthase activity differed widely between these groups (2). The differences we observed in RBC citrulline could result from differences in NOS activities; Kang et al. (19), however, reported that NOS is not active in RBCs, so this mechanism cannot account for our findings. In contrast, arginase is abundant in RBC. Differences in arginase activities in RBC have been reported in humans, since patients with sickle cell disease had a 60% elevation in RBC arginase activity, compared with controls (26). As arginine is both a product and a precursor of citrulline via ornithine, differences in arginase activity could play a role as well. This is, however, unlikely, because differences in arginase activity were reported in African Americans who suffer from sickle cell disease, and our subjects were Caucasian and had normal blood counts. Further studies would be warranted to determine the precise mechanisms responsible for the apparent compartmentation of citrulline between plasma and RBCs observed in a substantial fraction of the healthy volunteers.

Little is known about the handling and potential effects of an exogenous load of citrulline in humans. In the present study, plasma citrulline rose nearly fivefold (~490%) in volunteers supplemented with oral citrulline, implying that exogenous citrulline is efficiently absorbed in the gut and may escape uptake in splanchnic territory without any significant conversion to urea, as plasma urea remained unaltered (Table 1). Even though low levels of citrulline have been reported in urine from subjects of various age groups, the fraction of citrulline reabsorbed by kidney is not known. Because urine was collected throughout the study, and because creatinine clearance reflects glomerular filtration rate in healthy subjects, we were able to calculate that $<1\%$ of the amount of citrulline filtered by glomerulus is excreted as such; the rest, $>99\%$, is therefore either reabsorbed or converted to arginine. Accordingly, the fivefold rise in plasma citrulline resulted in a near doubling in plasma arginine. Regardless of the specific mechanisms of citrulline reabsorption and/or metabolic conversion in kidney, the present data therefore suggest that orally administered citrulline is highly bioavailable, since systemic citrulline rose dramatically, whereas urinary citrulline loss was minimal. This finding implies that the oral route could be used effectively to increase citrulline and arginine availability in specific clinical situations.

During exogenous citrulline supplementation, the bulk of the citrulline administered was thus presumably converted to arginine. Arginine can be utilized by three main pathways: urea synthesis, NO production, and incorporation into protein synthesis (11, 14). In the present study, neither plasma urea nor urea excretion rose during oral citrulline administration, suggesting that little arginine underwent conversion to urea. Similarly, the excretion of nitrate and nitrite remained unaltered.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

We therefore speculate that the incorporation of arginine into protein synthesis may have risen. Even though rates of protein synthesis were not assessed in the present study, calculated nitrogen balance rose appreciably (+57%, from 683 to 970 mmol of nitrogen/12 h; $P = 0.0053$) during citrulline administration. This improved nitrogen balance is consistent with a putative rise in the rate of whole body protein synthesis and agrees with the enhanced rate of nitrogen accretion observed upon citrulline supplementation in animals by Osowska et al. (28, 29).

Taken together, the findings of the present study lead us to speculate oral citrulline could be used, either as a means to deliver arginine to the systemic circulation or as a putative protein anabolic agent, in specific clinical situations. Arginine indeed may become a conditionally essential amino acid in conditions associated with intestinal damage, such as radiation-induced enteritis (23), celiac disease (8), short bowel syndrome (7, 33), or premature birth (4, 44). For instance, after intestinal resection, the main site of citrulline production is essentially removed, and consequently plasma arginine level is reduced. Accordingly, citrulline supplementation increased arginine pools and restored nitrogen balance in rodents who had undergone extensive intestinal resection (28). The authors argue that citrulline may be a better candidate than arginine for supplementation, because extensive uptake and metabolism of arginine by the liver may cause excessive ureagenesis (9). In preterm infants, the limited expression of pyrroline-5-carboxylase, ASS, and ASL results in low rates of citrulline and arginine synthesis (4, 44). Because arginine is a precursor of NO, arginine deficiency results in decreased NO production, which could lead to intestinal dysfunction or necrotizing enterocolitis. Accordingly, in a clinical trial, arginine supplementation prevented necrotizing enterocolitis in a group of very-low-birth-weight infants (1). ASS and ASL activities can be enhanced by corticosteroid treatment (44). To our knowledge, the effects of combined corticosteroids and citrulline to raise arginine availability and potentially prevent necrotizing enterocolitis have yet to be examined in the latter population of patients.

In summary, the present study demonstrates that plasma citrulline can be depleted by depletion of glutamine and raised by oral citrulline supplementation, implying that citrulline is efficiently absorbed in the gut and reabsorbed by the kidney. In addition, to the best of our knowledge, this study is the first to suggest that oral citrulline can be used to raise arginine availability without affecting urea excretion and may enhance nitrogen balance in healthy humans. Further studies are warranted to determine whether citrulline has a true protein anabolic effect in vivo in humans and, if so, determine what mechanism(s) could mediate this putative effect.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Colleaux (Institut National de Recherche Agronomique, Systèmes d'Elevage et Nutrition Animale et Humaine, S^{t} Gilles, France) and J. Le Garzic (Laboratoire de Biologie médicale, Centre Régional de Gériatrie, Chantepie, France) for technical assistance and gratefully acknowledge the volunteers who took part in the study.

GRANTS

C. Rougé was the recipient of a doctoral research fellowship from Nestlé (Vers-chez-les-Blanc, Switzerland). O. Le Bacquer was supported, in part, by a Nutricia postdoctoral fellowship. Part of this work was supported by grants from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2003) from the French Ministry of Health; the Délégation à la Recherche Clinique (DRC 2003), CHU de Nantes; and the Agence Nationale de la Recherche (ANR PRNA-2005).

REFERENCES

1. **Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD, Fick GH, Butzner JD, Parsons HG, Scott RB.** Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr* 140: 389–391, 2002.
2. **Apostol AT, Tayek JA.** A decrease in glucose production is associated with an increase in plasma citrulline response to oral arginine in normal volunteers. *Metabolism* 52: 1512–1516, 2003.
3. **Bahri S, Curis E, Aussel C, Chaumeil J, Cynober L, Zerrouk N.** Characterization of L-citrulline transport in human intestinal Caco-2 cells. *Nutr Clin Métab* 20, *Suppl* 2: S111–S112, 2006.
4. **Becker RM, Wu G, Galanko JA, Chen W, Maynor A, Bose CL, Rhoads JM.** Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 137: 785–793, 2000.
5. **Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, Przyrembel H, Wadman SK.** *Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis*. Baltimore, MD: Urban and Schwarzenberg, p. 203–227, 1981.
6. **Castillo L, Beaumier L, Ajami AM, Young VR.** Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [^{15}N]arginine-to-[^{15}N]citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11460–11465, 1996.
7. **Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing M.** Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology* 119: 1496–1505, 2000.
8. **Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing M.** Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology* 124: 1210–1219, 2003.
9. **Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Benazeth S, Cynober L.** Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 29: 177–205, 2005.
10. **Dhanakoti SN, Brosnan JT, Herzberg GR, Brosnan ME.** Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 259: E437–E442, 1990.
11. **Darmaun D, Welch S, Rini A, Sager BK, Altomare A, Haymond MW.** Phenylbutyrate-induced glutamine depletion in humans: effect on leucine metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E801–E807, 1998.
12. **Déchelotte P, Darmaun D, Rongier M, Hecketsweiler B, Rigal O, Desjeux JF.** Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 260: G677–G682, 1991.
13. **Diggle PJ, Heagerty P, Liang KY, Zeger SL.** *Analysis of Longitudinal Data*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1994.
14. **Featherston WR, Rogers QR, Freedland RA.** Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. *Am J Physiol* 224: 127–129, 1973.
15. **Fekkes D, van Dalen A, Edelman M, Voskuilen A.** Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde. *J Chromatogr B* 669: 177–186, 1995.
16. **Gondolesi G, Fishbein T, Chehade M, Tschernia A, Magid M, Kaufman S, Raymond K, Sansaricq C, LeLeiko N.** Serum citrulline is a potential marker for rejection of intestinal allografts. *Transplant Proc* 34: 918–920, 2002.
17. **Kamoun P, Parvy P, Cathelineau L.** A rapid and simple method for citrulline determination in plasma. *Clin Chem* 29: 398–400, 1983.
18. **Kamoun P, Parvy PH, Rabier D.** Indications et interpretation de la chromatographie des acides amines pour le diagnostic des maladies métaboliques. In: *Maladies métaboliques*, edited by Saudubray JM. Paris, France: Doin, p. 1–13, 1991.
19. **Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR.** Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med* 135: 444–451, 2000.
20. **Lau T, Owen W, Yu YM, Noviski N, Lyons J, Zurakowski D, Tsay R, Ajami A, Young VR, Castillo L.** Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest* 105: 1217–1225, 2000.
21. **Le Boucher J, Charret C, Coudray-Lucas C, Giboudeau J, Cynober L.** Amino acid determination in biological fluids by automated ion ex-

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

change chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clin Chem* 43: 1421–1428, 1997.
22. **Levillain O, Parvy P, Hassler C.** Amino acid handling in uremic rats: citrulline, a reliable marker of renal insufficiency and proximal tubular dysfunction. *Metabolism* 46: 611–618, 1997.
23. **Lutgens LC, Blijlevens NM, Deutz NE, Donnellu JP, Lambin P, de Pauw BE.** Monitoring myeloalative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: a comparison with sugar permeability test. *Cancer* 103: 191–199, 2005.
24. **Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM.** Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B* 798: 231–239, 2003.
25. **Melis GC, Boelens PG, van der Sijp JR, Popovici T, De Bandt JP, Cynober L, van Leeuwen PA.** The feeding route (enteral or parenteral) affects the plasma response of the dipeptide Ala-Gln and the amino acids glutamine, citrulline and arginine, with the administration of Ala-Gln in preoperative patients. *Br J Nutr* 94: 19–26, 2005.
26. **Morris SM Jr.** Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis. In: *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, edited by Ignarro LG. San Diego, CA: Academic, p. 187–197, 2000.
27. **Neveux N, David P, Cynober L.** Measurement of amino acids concentrations in biological fluids and tissues using ion exchange chromatography. In: *Metabolic and Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition* (2nd ed.), edited by Cynober L. Boca Raton, FL: CRC, p. 17–28, 2004.
28. **Osowska S, Moinard C, Neveux N, Loi C, Cynober L.** Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut* 53: 1781–1786, 2004.
29. **Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L, Moinard C.** Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E582–E586, 2006.
30. **Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marin O, Huijing F, Gelman B, Levi DM, Nery JR, Kato T, Mittal N, Nishida S, Thompson JF, Ruiz P.** Serum citrulline as a marker of acute cellular rejection for intestinal transplantation. *Transplant Proc* 34: 915–917, 2002.
31. **Perry TL.** *Chemical and cellular architecture.* **In:** *Handbook of Neurochemistry*, edited by Lajtha A. New York: Plenum, 1982, p. 151–180.
32. **Rabier D, Kamoun P.** Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids* 9: 299–316, 1995.
33. **Rhoads JM, Plunkett E, Galanko J, Lichtman S, Taylor L, Maynor A, Weiner T, Freeman K, Guarisco JL, Wu GY.** Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr* 146: 542–547, 2005.
35. **Rutten EP, Engelen MP, Wouters EF, Schols AM, Deutz NE.** Metabolic effects of glutamine and glutamate ingestion in healthy subjects and in persons with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr* 83: 115–123, 2006.
36. **Schmidlin A, Fischer S, Wiesinger H.** Transport of L-citrulline in neural cell cultures. *Dev Neurosci* 22: 393–398, 2000.
37. **Vadgama JV, Evered DF.** Characteristics of L-citrulline transport across rat small intestine in vitro. *Pediatr Res* 32: 472–478, 1992.
38. **Van de Poll MC, Siroen MP, Van Leeuwen PA, Soeters PB, Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, Dejong CH.** Interorgan amino acid exchange in humans: consequences for arginine and citrulline metabolism. *Am J Clin Nutr* 85: 167–172, 2007.
39. **Van de Poll MC, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, Van Leeuwenen PA, Dejong CH.** Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *J Physiol* 581: 819–827, 2007.
40. **Vinnars E, Bergström J, Fürst P.** Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg* 182: 665–671, 1975.
41. **Wiesinger H.** Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 64: 365–391, 2001.
42. **Wileman SM, Mann GE, Pearson JD, Baydoun AR.** Role of L-citrulline transport in nitric oxide synthesis in rat aortic smooth muscle cells activated with LPS and interferon-gamma. *Br J Pharmacol* 140: 179–185, 2003.
43. **Windmueller HG, Spaeth AE.** Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 241: E473–E480, 1981.
44. **Wu G, Jaeger LA, Bazer FW, Rhoads JM.** Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J Nutr Biochem* 15: 447–451, 2004.

Downloaded from ajpgi.physiology.org on November 11, 2007

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

◈ *Etude clinique probiotiques*

Dans le cadre de notre étude clinique menée chez le nouveau-né prématuré de très faible poids de naissance, la supplémentation orale en *B. longum* BB536 et *L. rhamnosus* GG n'a pas amélioré la tolérance digestive à l'égard de l'alimentation entérale. Ce résultat qui est en accord avec des précédents travaux [33, 180] peut s'expliquer par la présence de deux populations différentes parmi les enfants étudiés (définis sur la base de leur poids de naissance). Chez les enfants ayant un poids de naissance <1001g, la supplémentation orale en probiotiques n'a pas amélioré la tolérance digestive à l'égard de l'alimentation entérale. Ce résultat peut être expliqué par le fait que ces enfants ont été moins souvent colonisés par les souches probiotiques, comparés aux enfants ayant un poids de naissance >1000g. Au cours de notre étude, nous avons rapporté que la colonisation par les souches probiotiques était négativement affectée par le nombre de jours d'antibiothérapie postnatale ou par le nombre de jours sans alimentation entérale. Comme les enfants ayant un poids de naissance <1001g ont reçu plus fréquemment une antibiothérapie postnatale et ont eu plus souvent des arrêts d'alimentation entérale que les enfants ayant un poids de naissance >1000g, ces données suggèrent que ces variables pourraient empêcher la colonisation intestinale par les souches probiotiques, et par conséquent, la capacité des probiotiques a amélioré la fonction intestinale. En revanche, chez les enfants ayant un poids de naissance >1000g, la supplémentation orale en probiotiques a réduit significativement le délai d'obtention de l'alimentation entérale par une amélioration de la tolérance gastro-intestinale. Ce résultat est en accord avec les précédents travaux de Kitajima *et al.* [159] et la méta-analyse de Desphande *et al.* [81]. Cependant, les mécanismes par lesquels les probiotiques peuvent améliorer la fonction intestinale chez ces enfants ne sont pas clairs et demandent à être élucidés.

Dans notre étude, la supplémentation orale en probiotiques n'a pas amélioré l'évolution clinique des nouveau-nés prématurés durant leur hospitalisation. En accord avec les données de la littérature [33, 62, 74], nous avons montré que la supplémentation orale en BB536 et LGG n'a pas réduit significativement l'incidence des infections nosocomiales et des sepsis avec hémocultures positives. Par ailleurs, nous avons rapporté que cette supplémentation orale en probiotiques n'a pas réduit significativement l'incidence de l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN), ni l'incidence de la mortalité. Trois études prospectives et randomisées (probiotiques *versus* placebo), menées chez le nouveau-né prématuré ont étudié l'effet de la supplémentation orale en probiotiques sur l'incidence et la sévérité de l'ECUN [33, 74, 180].

Les travaux de Lin *et al.* et Bin-Nun *et al.* ont clairement montré une réduction de l'incidence et de la sévérité de l'ECUN chez des enfants supplémentés en probiotiques, comparés à des enfants témoins [33, 180]. Les souches bactériennes utilisées dans ces deux précédentes études étaient *B. infantis, S. thermophilus, B. bifidus* pour l'une [33], et *L. acidophilus* et *B. infantis* pour l'autre [180]. Deux récentes méta-analyses portant sur les études contrôlées d'administration de probiotiques chez le prématuré suggèrent que l'apport de probiotiques dans l'alimentation du prématuré est une stratégie intéressante dans la prévention et le traitement de l'ECUN [22, 81]. Contrairement aux données de la littérature, la supplémentation orale en BB536 et LGG n'a pas amélioré l'incidence de l'ECUN chez nos enfants prématurés. Néanmoins, dans notre population contrôle, l'incidence de l'ECUN était faible (environ 3%) et significativement inférieure à celle rapportée par Lin *et al.* et Bin-Nun *et al.* dans leurs groupes contrôles (12,8% et 16,4%, respectivement) [33, 180]. Rappelons que la réduction de l'incidence de l'ECUN n'était pas l'objectif de notre étude, le nombre d'enfants inclus dans notre étude était insuffisant pour analyser l'effet de la supplémentation orale en probiotiques sur l'ECUN, en raison de cette faible incidence. Des études multicentriques portant sur des populations plus importantes de prématurés devraient être menées pour confirmer les données actuelles de la littérature. Par ailleurs, dans le cadre de ces futures études, il serait intéressant d'identifier clairement les doses, la durée et le type de souches probiotiques (espèces, souches, seules ou combinées, vivantes ou tuées).

Sur 46 enfants analysés, les souches probiotiques *B. longum* BB536 et *L. rhamnosus* GG ont été isolées dans les selles de 22 enfants (19 enfants, groupe probiotique et 3 enfants, groupe placebo) à des taux de 10^3-10^8 ufc/g de selles. Parmi les enfants colonisés par les souches probiotiques, trois correspondaient au groupe placebo. Chacun des trois enfants avait un jumeau recevant la supplémentation orale en probiotiques. Dans une précédente étude « probiotique *versus* placebo», LGG a été également isolé chez un nouveau-né prématuré non supplémenté en probiotique [207]. Le résultat que nous avons obtenu suggère que soit les enfants du groupe placebo colonisés par BB536 et LGG ont reçu par erreur les probiotiques, soit ils ont été colonisés par les souches probiotiques présentes dans l'environnement au moment de l'étude. La deuxième hypothèse semble la moins probable, car BB536 est une bactérie anaérobie stricte non sporulée et donc on peut douter qu'elle survive dans un environement aérobie. Trois enfants prématurés appartenant au groupe probiotique n'ont pas été colonisés par les souches probiotiques durant le suivi. Ce résultat peut être expliqué par le fait que ces enfants ont reçu à plusieurs reprises une antibiothérapie postnatale à large spectre.

Parmi les enfants colonisés par les souches probiotiques BB536 et LGG, le délai d'obtention de l'alimentation entérale totale était atteint plus précocement que chez les enfants non colonisés par les souches probiotiques. Ce résultat suggère que la présence des souches probiotiques dans le tractus gastro-intestinal des enfants est capable d'améliorer la tolérance digestive, mais les mécanismes impliqués demandent à être élucidés.

L'analyse du MI du prématuré par la culture a rapporté que le TGI de ces enfants hébergeait une diversité bactérienne réduite, confirmant les données de la littérature [34, 111, 122, 258, 264, 289]. Malgré les nombreux milieux de culture disponibles, une large part des espèces microbiennes du microbiote fécal dominant de l'homme adulte échappe à la culture, induisant une sous-estimation des populations bactériennes [174, 216, 292]. Ainsi, il se peut que de nombreuses espèces microbiennes du microbiote fécal du prématuré échappent à la culture, expliquant la faible diversité bactérienne observée par culture. Dans notre étude, l'analyse du MI du prématuré par des techniques indépendantes de la culture (TTGE, DHPLC et inventaire moléculaire) a montré que le MI de ces enfants présentait une diversité moléculaire restreinte, confirmant les données de la littérature [78, 192, 206, 270]. En accord avec les travaux de Magne *et al.* et Millar *et al.* [192, 206], notre analyse moléculaire du MI a montré que toutes les espèces moléculaires identifiées avaient un représentant dans les bases de données et étaient cultivables.

Nous avons montré que le TGI du prématuré était colonisé rapidement par *Staphylococcus*, puis par *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* et *Clostridium*, et plus tardivement et plus rarement par *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Ces données suggèrent que le TGI du prématuré se colonise à la naissance plus avec les bactéries environnementales qu'avec le microbiote maternel. Cette séquence d'implantation peut s'expliquer par le fait que ces enfants 1) naissent plus fréquemment par césarienne, 2) se retrouvent séparés de leur mère, 3) sont placés dans un environnement de soins intensifs très aseptisé, et 4) sont éventuellement soumis à une antibiothérapie à large spectre.

En accord avec des précédents travaux [4, 62, 209], nous avons montré que la supplémentation orale en probiotiques entraînait une augmentation du nombre et de l'incidence de colonisation des bifidobactéries, et également des lactobacilles. Tous les isolats correspondaient aux souches probiotiques administrées. Outre l'effet observé sur la colonisation intestinale par les souches probiotiques, la supplémentation orale en probiotiques

n' a pas eu d'effet sur le reste du MI. D'après les données de la littérature, certains auteurs ont rapporté que l'augmentation des bifidobactéries était associée à la réduction du réservoir de bactéries potentiellement pathogènes [62, 209]. Cependant, dans l'étude de Costalos *et al.* [62], la significativité annoncée des résultats (p. ex. taux de colonisation à *E. coli* (groupe probiotique : 2,67 ± 0,045 log_{10} ufc/g de selles *vs.* groupe placebo : 2,75 ± 0,058 log_{10} ufc/g de selles, $p<0,001$) a-t-elle une significativité biologique pertinente? Par ailleurs, dans l'étude de Mohan *et al.* [209], la composition du MI n'était pas comparable avec nos données, puisque le MI de leurs enfants était proche de celle d'un nouveau-né à terme.

De nombreux éléments peuvent influencer l'établissement du MI, parmi lesquels l'âge gestationnel de naissance, le mode d'accouchement, l'environnement, le régime alimentaire ainsi que l'antibiothérapie administrée à la mère et/ou à l'enfant après la naissance. L'influence de ces facteurs sur l'implantation du MI du prématuré n'a été que très rarement étudiée. Notre étude n'a montré que des modifications ponctuelles de l'implantation du MI, avec l'âge gestationnel de naissance et le mode d'accouchement. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature rapportées chez le prématuré [46, 111, 122, 264]. Dans notre étude, un effet centre a été observé avec un microbiote plus diversifié chez les nouveau-nés parisiens. Contrairement aux enfants parisiens, le tractus gastro-intestinal des enfants nantais était peu, voire non colonisé par les genres *Enterococcus, Enterobacteriaceae* et *Clostridium*. La différence observée entre les 2 centres d'étude suggère que l'environnement est un facteur important dans l'établissement du MI du nouveau-né prématuré et confirme les résultats obtenus par deux autres équipes [122, 270]. Enfin, en accord avec les données de la littérature [26, 34, 46, 111, 122, 270], les premières analyses que nous avons faites suggèrent que le régime alimentaire (changement de lait, arrêt de l'alimentation entérale) et l'antibiothérapie administrée à la mère et/ou à l'enfant après la naissance influencent l'établissement du MI. Cependant, ces analyses demandent à être approfondies et sont actuellement en cours.

Dans notre étude, nous avons étudié la cinétique de la calprotectine fécale, marqueur de l'inflammation intestinale. Les taux de calprotectine fécale étaient élevés et présentaient d'importantes variations intra- et inter-individuelles, confirmant les données de la littérature [48, 52, 145, 230]. Ces taux élevés de calprotectine fécale pourraient refléter l'augmentation de la migration des granulocytes neutrophiles et/ou macrophages à travers la barrière intestinale. Comme Berstad *et al.* ont rapporté qu'il existait une corrélation significative entre

la calprotectine fécale et la perméabilité intestinale, l'augmentation de la migration des granulocytes neutrophiles et/ou macrophages pourrait être reliée à une augmentation de la perméabilité intestinale associée à une immaturité de la muqueuse intestinale [32]. Bien que Van Elburg *et al.* [313] aient rapporté que la perméabilité intestinale était plus élevée chez les prématurés que chez les nouveau-nés à terme sains, les taux de calprotectine fécale sont cependant similaires dans ces deux populations. Ces données suggèrent qu'il existe d'autres facteurs pouvant expliquer ces taux élevés de calprotectine fécale.

Ces variations intra- et inter- individuelles ne peuvent pas être liées à une instabilité de la protéine car celle-ci est résistante à la protéolyse et stable à température ambiante pendant huit jours. Comme les échantillons de selles sont collectés dans la couche des enfants, la part aqueuse des prélevements fécaux peut être plus ou moins absorbée par la couche et être responsable des variations observées. Cependant, Olafsdottir *et al.* [237] ont montré que ces variations ne pouvaient pas excéder 30%. Or, dans notre étude, les variations étaient supérieures à ce chiffre. Par conséquent, la technique d'échantillonnage ne peut pas être prise en compte pour expliquer ces variations. De même, les changements observés ne peuvent pas être liés à l'ingestion de calprotectine présente dans le lait humain, puisqu' en accord avec des données précédentes [237], nous avons rapporté que le lait humain ne contenait pas de calprotectine.

Dans notre étude, les principaux facteurs permettant d'expliquer ces variations de la calprotectine fécale ont été identifiés et incluent 1) l'antibiothérapie anténatale, 2) l'arrêt de l'alimentation entérale non plannifié, 3) le volume de l'alimentation entérale (mL/kg/j) et 4) la colonisation bactérienne intestinale par des clostridies et des staphylocoques. Nos résultats suggèrent que la calprotectine fécale pourrait refléter un état d'inflammation physiologique en réponse de l'adaptation du tractus gastro-intestinal immature du nouveau-né à l'égard des apports antigéniques d'origine alimentaire et bactérienne durant la période néonatale.

La supplémentation orale en probiotiques n'a pas modifié l'excrétion de la calprotectine fécale, suggérant que l'apport de BB536 et LGG dans l'alimentation du prématuré n'a pas réduit cette inflammation physiologique intestinale.

L'absence d'effet bénéfique de la supplémentation orale en probiotiques sur la tolérance digestive à l'égard de l'alimentation entérale (excepté pour les enfants ayant un poids de

naissance >1000g), l'évolution clinique, la composition du MI (hormis la colonisation par les souches probiotiques) et l'excrétion de la calprotectine fécale peut s'expliquer par le fait que la colonisation gastro-intestinale par les souches probiotiques était insuffisante ou que les souches probiotiques étaient inadaptées aux réponses attendues. Le fait que notre étude soit « négative » sur les paramètres étudiés n'écarte pas l'intérêt potentiel d'autres souches bactériennes chez le nouveau-né prématuré, puisque nous savons que chacune d'entre elles a des propriétés intrinsèques spécifiques. Par ailleurs, bien que nous n'ayons pas étudié l'influence de la supplémentation orale en probiotiques sur le métabolisme du MI ainsi que sur le SII, il est possible que l'apport de probiotiques dans l'alimentation du prématuré ait un effet sur ces paramètres.

Enfin, de façon générale, nous savons que les bactéries ingérées ne colonisent pas durablement le TGI humain. Elles persistent pendant la période où les sujets consomment les probiotiques et sont ensuite éliminées en quelques jours, de manière parallèle, voire plus rapide, que celle d'un marqueur de transit. Toutefois, quelques auteurs ont observé la persistance prolongée de souches probiotiques dans les selles ou sur la muqueuse intestinale de sujets sains [4, 6, 114, 140]. Il serait intéressant de savoir si l'on retrouve nos souches probiotiques BB536 et LGG dans les selles des enfants inclus dans notre étude après l'arrêt de la consommation des souches probiotiques.

◈ *Etude clinique Citrulline*

Au cours de la thèse, une méthode robuste et sensible de dosage de la citrulline a été développée en GC-MS en impact électronique permettant d'effectuer le dosage de cet acide aminé dans de faibles volumes de plasma, de culots globulaires et d'urine. Le développement de cette nouvelle méthode pouvant utiliser des traceurs aux isotopes stables permettra d'explorer facilement et sans danger l'aspect cinétique du métabolisme de cet acide aminé chez l'homme et en particulier, chez des sujets où les volumes de sang sont limités comme chez le nouveau-né prématuré. Dans des situations cliniques spécifiques où la citrulline est utilisée comme agent thérapeutique, notre méthode permettra de quantifier les pertes de cet acide aminé dans les urines. Par ailleurs, comme la citrulline est présente dans de nombreux fluides et tissus biologiques, la méthode que nous avons développée permettra éventuellement son dosage dans ces différentes matrices biologiques.

Dans le cadre de notre étude clinique réalisée chez dix adultes sains, nous avons rapporté que les concentrations de citrulline plasmatique et urinaire étaient similaires à celles décrites dans la littérature chez l'homme adulte sain [65, 100, 149, 177, 199, 228]. Quelle que soit la période de l'étude considérée, les taux de citrulline plasmatique diminuaient significativement après les repas. Les mécanismes sous-jacents à ces fluctuations ne sont pas clairs. Il est possible qu'après la prise d'un repas, les précurseurs de citrulline soient utilisées en vue de la synthèse protéique ou que l'utilisation de la citrulline plasmatique soit augmentée. Rabier et Kamoun ont rapporté que les taux de citrulline plasmatique diminuaient après la prise d'un repas riche en protéines et revenaient à la normale quatre heures plus tard [248]. Compte-tenu de ces fluctuations, si la citrulline est utilisée comme marqueur de fonctionnement intestinal, des précautions devront être prises lors des dosages de cet acide aminé.

Quelle que soit la période de l'étude considérée, nous avons trouvé que les taux de citrulline plasmatique étaient significativement supérieurs aux taux de citrulline globulaire et qu'il existait une faible corrélation entre les taux de citrulline plasmatique et globulaire. Cette faible corrélation pourrait être liée à l'hétérogénéité de la population étudiée : A l'état basal, nous avons constaté que la moitié de nos sujets avait un ratio [Citrulline globulaire]/[Citrulline plasmatique] proche de 1, et que l'autre moitié avait un ratio inférieur à 1. Parmi les sujets dont le ratio [Citrulline globulaire]/[Citrulline plasmatique] était proche de 1, nous avons observé une corrélation (forte tendance) entre la citrulline plasmatique et globulaire, mais aucune corrélation mise en évidence pour les autres sujets. Ces résultats peuvent refléter des différences existant 1) dans le métabolisme de la citrulline au niveau des globules rouges ou 2) dans le transport de la citrulline à travers la membrane des globules rouges. Bien que des transporteurs de citrulline aient été caractérisés au niveau des muscles [328], des neurones [267], des entérocytes [18], aucune étude n'a décrit de transporteurs de la citrulline au niveau de la membrane des globules rouges. Des études utilisant des cultures cellulaires de globules rouges en présence de citrulline marquée seraient nécessaires pour savoir s'il existe entre les individus des différences dans le transport de la citrulline à travers la membrane des globules rouges. Des différences dans l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de la citrulline globulaire pourraient également exister entre les individus. Apostol et Tayek ont montré que la supplémentation orale en arginine chez l'homme augmentait les taux de citrulline plasmatique chez certains de ces sujets, mais pas chez d'autres. Ces auteurs ont suggéré que l'activité de la NOS était différente dans ces deux

groupes [11]. Il se peut que les différences de taux de citrulline plasmatique et globulaire que nous observons dans la population étudiée puissent provenir d'une activité différente de la NOS. Cependant, Kang *et al.* ont montré que la NOS était inactive dans les globules rouges [150]. Par conséquent, nous ne pouvons pas retenir cette hypothèse. En revanche, l'arginase est abondante dans les globules rouges et des différences d'activité de cette enzyme ont été rapportées chez l'homme. Comme l'arginine est à la fois un produit et un précurseur de citrulline via l'ornithine, cette activité arginase pourrait jouer un rôle. Cependant, ces données ne sont peut-être pas pertinentes pour interpréter nos résultats, puisque ces différences d'activités de l'arginase ont été rapportées chez des sujets Afro-Américains atteints de dérpanocytose, une anémie hémolytique liée à une anomalie génétique de l'hémoglobine. Or, nos sujets étaient caucasiens et leur numération globulaire normale. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes précis responsables de la compartimentation apparente de la citrulline entre le plasma et les globules rouges.

Dans notre étude, nous avons rapporté que la déplétion en glutamine (7%), principal précurseur de la citrulline entraînait une diminution significative de la citrulline plasmatique (18%). Dans une étude précédente [75], Darmaun *et al.* ont montré en utilisant les mêmes doses de phénylbutyrate, que la déplétion en glutamine plasmatique était plus élevée (25%). Cependant, dans cette étude, les sujets n'étaient pas à l'état nourri, contrairement aux sujets de notre étude. Le traitement au phénylbutyrate a induit une diminution de l'urée plasmatique et urinaire (17%). Ce résultat est en accord avec le fait que la glutamine soit le principal précurseur d'urée. Par ailleurs, le fait que les taux de citrulline plasmatique soient dépendants de la disponibilité en glutamine plasmatique, des précautions devront être prises si la citrulline plasmatique est utilisée comme marqueur de fonctionnement intestinal, chez des sujets où la déplétion en glutamine est connue, comme par exemple dans des situations de stress sévère [316].

A l'inverse, nous avons montré que l'administration orale de citrulline exogène chez l'homme adulte sain entraînait une augmentation significative des taux de citrulline plasmatique (490%), sans modification des taux d'urée plasmatique. Ce résultat implique que la citrulline exogène apportée par voie orale a été efficacement absorbée par le tube digestif et a échappé à la captation par le territoire splanchnique. Bien que des faibles taux de citrulline urinaire aient été rapportés dans la littérature [199, 228], la fraction de citrulline réabsorbée par les reins n'est pas connue. Dans notre étude, nous avons trouvé que moins de 1% de la citrulline filtrée par les glomérules étaient excrétés dans les urines et que plus de 99% de la

citrulline filtrée étaient réabsorbés et/ou convertis en arginine. L'augmentation des taux de citrulline plasmatique a entraîné une augmentation significative des taux circulants d'arginine (X2). La supplémentation orale en citrulline exogène permet à l'organisme d'un adulte sain d'avoir à disposition de grandes quantités circulantes de citrulline, puisque lors de la supplémentation orale en citrulline exogène, les taux de citrulline augmentent fortement et les pertes urinaires de citrulline sont minimes. En cas de réduction de la masse intestinale active (syndrome du grêle court, maladie coeliaque, lésions intestinales induites par radiothérapie), le site principal de synthèse de la citrulline est grandement réduit. Plusieurs auteurs ont rapporté que dans ces situations, les taux de citrulline et d'arginine circulants étaient significativement diminués [80, 64, 65, 239, 321], suggérant que l'arginine devenait un acide aminé essentiel. Dans ce contexte, la supplémentation avec de l'arginine serait une solution intéressante pour restaurer le pool d'arginine circulant. Cependant, le fait que l'arginine soit captée et fortement métabolisée par le foie remet en question cette stratégie thérapeutique. Si nos résultats obtenus chez l'homme sain peuvent être transposés chez des sujets malades ayant une déplétion en arginine plasmatique (syndrome du grêle court, maladie coeliaque, lésions intestinales induites par radiothérapie), l'apport de citrulline exogène par voie orale pourrait être utilisée comme agent thérapeutique pour augmenter la biodisponibilé de la citrulline et de l'arginine plasmatique. Par ailleurs, chez le nouveau-né prématuré, les taux de citrulline plasmatique et la synthèse d'arginine sont faibles, du fait de l'expression limitée des enzymes P5CS, ASS et ASL [24, 336]. Comme l'arginine est un précurseur de NO, la déficience de cet acide aminé entraîne une production limitée de ce composé et peut être à l'origine de disfonctionnements intestinaux tel que l'ECUN. Dans une étude clinique récente, la supplémentation orale en arginine chez le nouveau-né prématuré a réduit l'incidence de l'ECUN [9]. L'activité des enzymes ASS et ASL peut être améliorée par un traitement utilisant des corticostéroïdes [336]. A notre connaissance, comme les effets combinés de la citrulline et des corticostéroïdes n'ont pas été encore examinés sur les taux circulants de l'arginine et sur l'incidence de l'ECUN chez le nouveau-né prématuré, il serait intéressant de mener ces recherches dans cette population.

Durant la supplémentation orale en citrulline exogène, la citrulline convertie en arginine pourra être impliquée dans la synthèse d'urée, de NO ou dans la synthèse protéique. Dans notre étude, les taux d'urée plasmatique et l'excrétion d'urée urinaire restaient inchangés. De même, l'excrétion urinaire des nitrates et des nitrites restait inchangée. Par conséquent, dans ce contexte, il est tentant de spéculer que l'incorporation d'arginine dans la synthèse protéique

a peut être été augmentée. Dans notre étude, nous n'avons pas évalué le taux de synthèse protéique. Cependant, nous avons dressé le bilan azoté et celui-ci était amélioré (+57%) durant l'administration de citrulline exogène. Ce résultat est compatible avec une augmentation potentielle de la synthèse protéique au niveau du corps entier, et est en accord avec les travaux de Osowska *et al.* menés chez l'animal [238, 239]. La question se pose alors de savoir comment la citrulline, un acide aminé non incorporé dans les protéines améliore le bilan azoté ? De récentes études menées chez l'animal rapportent que la citrulline pourrait stimuler la synthèse protéique musculaire. Moinard et Cynober suggèrent que la stimulation de la synthèse protéique par la citrulline pourrait se faire soit de façon indirecte, par la capacité de la citrulline à générer de l'arginine, stimulant la sécrétion d'insuline et d'hormone de croissance ou par le fait que la citrulline constitue un apport d'azote aux muscles, soit de façon directe, par le fait que la citrulline aurait un effet de signal stimulant la transduction [211]. Des résultats obtenus après l'incubation de muscle isolé chez le rat en présence de fortes concentrations de citrulline (2,5 mM) suggèrent que la citrulline serait capable de stimuler directement la synthèse protéique [214] et que son action ne serait pas reliée à la production d'autres acides aminés, puisque les profils d'acides aminés musculaires mis en évidence restaient inchangés après prise orale de citrulline [212]. Le mécanisme d'action impliquerait mTOR, une protéine-clé dans la régulation de la synthèse protéique [213].

En conclusion, les résultats obtenus au cours de la thèse ont montré que la supplémentation orale de grands prématurés avec les 2 souches probiotiques *Bifidobacterium longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* GG n'a pas accéléré la maturation intestinale (excepté pour les enfants ayant un poids de naissance >1000g), ni amélioré l'évolution clinique des enfants, ni modifié la composition du MI hormis la colonisation du tube digestif par les souches probiotiques, ni enfin diminué le taux de calprotectine fécale. En revanche, aucun effet délétère n'a été associé à cette supplémentation. Notre travail a confirmé l'implantation anormale et retardée du microbiote instestinal chez le grand prématuré. La comparaison des résultats de la la culture et des 2 techniques moléculaires utilisées (TTGE et DHPLC) nous a permis de confirmer l'absence de bactéries non cultivables dans cette population et de valider l'utilisation de la DHPLC comme nouvel outil de caractérisation du MI chez le prématuré. L'étude de la cinétique et des facteurs de variation de la calprotectine fécale, marqueur de l'inflammation intestinale, nous a permis de suggérer l'existence d'une inflammation intestinale physiologique due vraisemblablement à l'adaptation du tube digestif

immature aux antigènes bactériens et alimentaires. Enfin, après développement d'une méthode de dosage en GCMS, nous avons montré chez l'adulte sain que, même si les valeurs de citrulline globulaire et urinaire varient dans le même sens que la citrulline plasmatique, la citrulline urinaire n'est probablement pas un reflet fidèle de la citrulline plasmatique. L'utilité de la citrulline urinaire comme marqueur reste donc à établir chez le prématuré.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adams E, Frank L.** Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu Rev Biochem*. 1980, 49 : 1005-1061. Review.

2. **Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, Mellander L, Svanborg C, Wold AE, Hanson LA.** Intestinal colonization with enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr Scand*. 1991, 80 : 602-610.

3. **Agarwal R, Sharma N, Chaudhry R, Deorari A, Paul VK, Gewolb IH, Panigrahi P.** Effects of oral Lactobacillus GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003, 36 : 397-402.

4. **Akiyama K, Shimada M, Ishizeki S.** Effects of administration of Bifidobacterium in extremely premature infants development of intestinal microflora by orally administered *Bifidobacterium longum*. *Acta neonatologica Japonica*. 1994, 30 : 257-263.

5. **Alam M, Midtvedt T, Uribe A.** Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol*. 1994, 29 : 445-451.

6. **Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela, Mattila-Sandholm T, von Wright A.** Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, Lactobacillus rhamnosus GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol*. 1999, 65 : 351-354.

7. **Alteheld B, Stehle P, Fürst P.** Measurement of amino acid concentrations in biological fluids and tissues using reversed-phase HPLC-based methods. In: Cynober L (ed) Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition, chap. 2, 2nd edn. *CRC Press, Boca Raton*. 2004, p. 29-44.

8. **American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition.** Nutritional needs of low-birthweight infants. *Pediatrics*. 1985, 75 : 976-986.

9. **Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD, Fick GH, Butzner JD, Parsons HG, Scott RB.** Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr*. 2002,140 : 389-391.

10. **Anyon CP, Clarkson KG.** The faecal excretion of low molecular weight fatty acids in premature babies. *Aust Paediatr J*. 1971, 7 : 34-36.

11. **Apostol AT, Tayek JA.** A decrease in glucose production is associated with an increase in plasma citrulline response to oral arginine in normal volunteers. *Metabolism*. 2003, 52 : 1512-1516.

12. **Arant BS.** Sodium chloride and Potassium. In : Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S, eds. Nutritional needs of the preterm infant. Scientific Basis and Practical Guidelines. *Pawling, Cadeus Medical Publisher*. Inc, 1993 : 157-175.

13. **Araya-Kojima T, Yaeshima T, Ishibashi N, Shimamura S, Hayasawa.** Inhibitory effects of Bifidobacterium longum BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria Microflora*. 1995, 14 : 59-66.

14. **Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Ojetti V, Cammarota G, Anti M, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A.** The effect of oral administration of Lactobacillus GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during Helicobacter pylori eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001, 15 : 163-169.

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

16. **Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI.** Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005, 307 : 1915-1920. Review.

17. **Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI.** The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101: 15718-15723.

18. **Bahri S, Curis E, Aussel C, Chaumeil J, Cynober L, Zerrouk N.** Caracterization of L-citrulline transport in human intestinal Caco-2 cells. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2006, 20 (Suppl 2) : S111-112.

19. **Ballongue J, Grill JP, Baratte-Euloge P.** Action sur la flore intestinale de laits fermentés au *Bifidobacterium*. *Lait*. 1993, 73 : 249-256.

20. **Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, Degermann S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A.** Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med*. 1990, 172 : 239-244.

21. **Barbul A.** Arginine and immune function. *Nutrition*. 1990, 6 : 53-58. Review.

22. **Barclay AR, Stenson B, Simpson JH, Weaver LT, Wilson DC.** Probiotics for necrotizing enterocolitis: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007, 45 : 569-576. Review.

23. **Basu S, Chatterjee M, Ganguly S, Chandra PK.** Effect of Lactobacillus rhamnosus GG in persistent diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol*. 2007, 41 : 756-760.

24. **Becker RM, Wu G, Galanko JA, Chen W, Maynor A, Bose CL, Rhoads JM.** Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 2000, 137 : 785-793.

25. **Bennet R, Nord CE.** Developmental of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection*. 1987, 15 : 332-336.

26. **Bennet T, Eriksson M, Nord CE, Zetterström R.** Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimen. *Pediatr Infect Dis.* 1986, 5 : 533-539.

27. **Benno Y, Mitsuoka T.** Impact of Bifidobacterium longum on human fecal microflora. *Microbiol Immunol*. 1992, 36 : 683-694.

28. **Berg RD.** The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 1996, 4 : 430-435.

29. **Berntzen HB, Fagerhol MK.** L1, a major granulocyte protein; isolation of high quantities of its subunits. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990, 50 : 769-774.

30. **Berntzen HB, Fagerhol MK.** L1, a major granulocyte protein : antigenic properties of its subunits. *Scand J Clin Lab Invest*. 1988, 48 : 647-652.

31. **Berseth CL.** Effect of early feeding on maturation of the preterm infant's small intestine. *J Pediatr*. 1992, 120 : 947-953.

32. **Berstad A, Arslan G, Folvik G.** Relationship between intestinal permeability and calprotectin concentration in gut lavage fluid. *Scan J Gastroenterol*. 2000, 35 : 64-69.

33. **Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, Kaplan M, Rudensky B, Caplan M, Hammerman C.** Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr*. 2005, 147 : 192-196.

34. **Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, Bishop RF, Campbell NT, Gillam GL.** Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J Med Microbiol*. 1982, 15 : 519-529.

35. **Blijlevens NM, Lutgens LC, Schattenberg AV, Donnelly JP.** Citrulline : a potentially simple quantitative marker of intestinal epithelial damage following myeloablative therapy. *Bone Marrow Transplant*. 2004, 34 : 193-196.

36. **Boehm G, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Marini A.** Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatr Suppl*. 2003, 91 : 64-67.

37. **Boehm G, Lidestri M, Casetta P, Jelinek J, Negretti F, Stahl B, Marini A.** Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal neonatal Ed*. 2002, 86 : F178-181.

38. **Boirie Y, Gachon P, Beaufrère B.** Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr*. 1997, 65 : 489-495.

39. **Bonnemaison E, Lanotte P, Cantagrel S, Thionois S, Quentin R, Chamboux C, Laugier J.** Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate*. 2003, 84 : 304-310.

40. **Brandtzaeg P, Gabrielsen TO, Dale I, Müller F, Steinbakk M, Fagerhol MK.** The leucocyte protein L1 (calprotectin): a putative nonspecific defence factor at epithelial surfaces. *Adv Exp Med Biol.* 1995, 371A : 201-206. Review.

41. **Bremner A, Roked S, Robinson R, Philips I, Beattie M.** Faecal calprotectin in children with chronic gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr*. 2005, 94 : 1855-1858.

42. **Brun JG, Ulvestad E, Fagerhol MK, Jonsson R.** Effects of human calprotectin (L1) on in vitro immunoglobulin synthesis. *Scand J Immunol*. 1994, 40 : 675-680.

43. **Brunner G, Neupert W.** Localisation of proline oxidase and delta-pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase in rat liver. *FEBS Lett*. 1969, 3 : 283-286.

44. **Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Gray ES, Olson S, Golden BE.** Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001, 33 : 14-22.

45. **Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE.** Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001, 32 : 171-177.

46. **Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L, Kalach N, Leroux B, Dupont C.** Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007, 44 : 577-582.

47. **Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel MJ.** Establishment of the intestinal microflora in neonates. *Gastroenterol Clin Biol*. 2007, 31 : 533-542. Review.

48. **Campeotto F, Kalach N, Lapillonne A, Butel MJ, Dupont C, Kapel N.** Time course of faecal calprotectin in preterm newborns during the first month of life. *Acta Paediatr*. 2007, 96 : 1531-1533.

49. **Canani RB, Tanturri de Horatio L, Terrin G, Romano MT, Miele E, Staiano A, Rapacciuolo L, Polito G, Bisesti V, Manguso F, Vallone G, Sodano A, Troncone R.** Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006, 42 : 9-15.

50. **Canani RB, Rapacciuolo L, Romano MT, Tanturri de Horatio L, Terrin G, Manguso F, Cirillo P, Paparo F, Troncone R.** Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2004, 36 : 467-470.

51. **Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, Scalici C, Montalto G, Di Fede G, Rini G, Notarbartolo A, Averna MR.** Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome : a prospective study in adults and children. *Clin Chem*. 2003, 49 : 861-867.

52. Carroll D, Corfield A, Spicer R, Cairns P. Faecal calprotectin concentrations and diagnostis of necrotising enterocolitis. *Lancet*. 2003, 361 : 310-311.

53. Castillo L, Beaumier L, Ajami AM, Young VR. Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [^{15}N]arginine-to-[^{15}N]citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93 : 11460-11465.

54. Castillo L, Sanchez M, Vogt J, Chapman TE, DeRojas-Walker TC, Tannenbaum SR, Ajami AM, Young VR. Plasma arginine, citrulline, and ornithine kinetics in adults, with observations on nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 1995, 268 : E360-367.

55. Castillo L, Chapman TE, Sanchez M, Yu YM, Burke JF, Ajami AM, Vogt J, Young VR. Plasma arginine and citrulline kinetics in adults given adequate and arginine-free diets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90 : 7749-7753.

56. Ceballos I, Chauveau P, Guerin V, Bardet J, Parvy P, Kamoun P, Junqers P. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. *Clin Chim Acta*. 1990, 188 : 101-108.

57. Chierici R, Sawatzki G, Thurl S, Tovar K, Vigi V. Experimental milk formulae with reduced protein content and desialylated milk proteins: influence on the faecal flora and the growth of term newborn infants. *Acta Paediatr*. 1997, 86 : 557-563.

58. Clark BR, Kelly SE, Fleming S. Calgranulin expression and association with the keratinocyte cytoskeleton. *J Pathol*. 1990, 160 : 25-30.

59. Cooke R, Hollis B, Conner C, Watson D, Werkman S, Chesney R. Vitamin D and mineral metabolism in the very low birth weight infant receiving 400 IU of Vitamin D. *J Pediatr*. 1990, 116 : 423-428.

60. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, Ricchiuti A, Marchi S, Bottai M. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut*. 2005, 54 : 364-368.

61. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S, Maltini G. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis*. 2003, 35 : 642-647.

62. Costalos C, Skouteri V, Gounaris A, Sevastiadou S, Triandafilidou A, Ekonomidou C, Kontaxaki F, Petrochilou V. Enteral feeding of premature infants with Saccharomyces boulardii. *Early Hum Dev*. 2003, 74 : 89-96.

63. Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of different probiotic preparations on anti-helicobacter pylori therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol*. 2002, 97 : 2744-2749.

64. **Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing M.** Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*. 2003, 124 : 1210-1219.

65. **Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing M.** Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology*. 2000, 119 : 1496-1505.

66. **Cummings JH, Macfarlane GT.** The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*. 1991, 70 : 443-459. Review.

67. **Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, Cynober L.** Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*. 2005, 29 : 177 : 205.

68. **Cynober L.** Plasma amino acids levels with a note on membrane transport : characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition*. 2002, 18 : 761-766.

69. **Cynober L, Le Boucher J, Vasson MP.** Arginine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1995, 6 : 402-413.

70. **Cynober L.** Can arginine and ornithine support gut functions? *Gut*. 1994, 35 : S42-45. Review.

71. **Dabard J, Bridonneau C, Philippe C, Anglade P, Molle D, Nardi M, Ladire M, Girardin H, Marcille F, Gomez A, Fons M.** Ruminococcin A, a new lantibiotic oroduced by a Ruminococcus gnavus strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2001, 67 : 4111-4118.

72. **Dai D.** Role of bacterial colonization in neonatal necrotizing enterocolitis and its prevention. *Acta Paed Sin*. 1998, 6 : 357-365.

73. **Dale I, Fagerhol MK, Naesgaard I.** Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *Eur J Biochem*. 1983, 134 : 1-6.

74. **Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF.** Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biol Neonate*. 2002, 82 : 103-108.

75. **Darmaun D, Welch S, Rini A, Sager BK, Altomare A, Haymond MW.** Phenylbutyrate-induced glutamine depletion in humans: effect on leucine metabolism. *Am J Physiol*. 1998, 274 : E801-807.

76. **De Bandt JP, Cynober L, Lim SK, Coudray-Lucas C, Poupon R, Giboudeau J.** Metabolism of ornithine, alpha-ketoglutarate and arginine in isolated perfused rat liver. *Br J Nutr*. 1995, 73 : 227-239.

77. **Déchelotte P, Darmaun D, Rongier M, Hecketsweiler B, Rigal O, Desjeux JF.** Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am. J. Physiol.* 1991, 260 : G677-G682.

78. **De la Cochetière MF, Piloquet H, des Robert C, Darmaun D, Galmiche JP, Roze JC.** Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium. *Pediatr Res*. 2004, 56 : 366-370.

79. **De Groote MA, Frank DN, Dowell E, Glode MP, Pace NR.** Lactobacillus rhamnosus GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 2005, 24 : 278-280.

80. **Dejong CH, Welters CF, Deutz NE, Heineman E, Soeters PB.** Renal arginine metabolism in fasted rats with subacute short bowel syndrome. *Clin Sci (Lond)*. 1998, 4 : 409-418.

81. **Deshpande G, Rao S, Patole S.** Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*. 2007, 369 : 1614-20. Review.

82. **Dhanakoti SN, Brosnan JT, Herzberg GR, Brosnan ME.** Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. *Am J Physiol*. 1990, 259 : E437-442.

83. **Dickinson JC, Rosenblum H, Hamilton PB.** Ion exchange chromatography of the free amino acids in the plasma of the newborn infant. *Pediatrics*. 1965, 36 : 2-13.

84. **Donohue DC, Deighton M, Ahokas JT, Salminen S.** Toxicity of lactic acid bacteria. In : Salminen S and Wright (eds). Lactic acid bacteria. *M Dekker Inc., New York USA*. 1993, Chapt 11 : 307-313.

85. **Doré J, Rigottier-Gois L.** Molecular analysis of the colonic microflora. *Gastroenterol Clin Biol*. 2001, 25 : C74-78.

86. **Dorin JR, Emslie E, van Heyningen V.** Related calcium-binding proteins map to the same subregion of chromosome 1q and to an extended region of synteny on mouse chromosome 3. *Genomics*. 1990, 8 : 420-426.

87. **Dorin JR, Novak M, Hill R, Brock D, Secher D, van Heyningen V.** A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene. *Nature*. 1987, 326 : 614-617.

88. **Duchemann T, Osowska S, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L, Moinard C.** La citrulline améliore l'accrétion protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via une stimulation de la synthèse protéique. *Nut Clin Metabol*. 2004, 18 : S20.

89. **Engelke UF, Liebrand-van Sambeek ML, de Jong JG, Leroy JG, Morava E, Smeitink JA, Wevers RA.** N-acetylated metabolites in urine: proton nuclear magnetic resonance spectroscopic study on patients with inborn errors of metabolism. *Clin Chem*. 2004, 50 : 58-66.

90. **Fagerberg UL, Lööf L, Myrdal U, Hansson LO, Finkel Y.** Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol*. 2005, 40 : 450-455.

91. **Fagerberg UL, Lööf L, Merzoug RD, Hansson LO, Finkel Y.** Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003, 37 : 468-472.

92. **Fagerhol MK.** Nomenclature for proteins : is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein ? *J Clin Pathol : Mol Pathol*.1996, 49 : M74-79.

93. **Fagerhol MK, Anderson KB, Naess-Andresen CF, Brantzaeg P, Dale I.** Calprotectin (the L1 leukocyte orotein). In : Smith VL, Dedman JR, eds. Stimulus response coupling : the role of intracellular calcium-binding proteins. *Boca Raton : CRC Press Inc*. 1990, 187-210.

94. **Fagerhol MK, Dale I, Anderson I.** Release and quantification of a leucocyte derived protein (L1). *Scand J Haematol*. 1980, 24 : 393-398.

95. **Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI.** Creatining and maintaining the gastrointestinal ecosystem : what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998, 62 : 1157-1170.

96. **Fangnan L, Li T, Nan L, et al.** Determination of serum citrulline levels in normal Chinese people with HPLC. *Parenter Enteral Nutri*. 2004, 11 : 116.

97. **FAO/WHO.** Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with life lactic acid bacteria. Food and Agriculture Administration of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. (http://www.who.int/food-safety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).

98. **Favre A, Szylit O, Popot F, Catala I, Rondeau C, Maurage C, Gold F, Borderon JC, Butel MJ.** Diet, length of gestation, and fecal short chain fatty acids in healthy premature neonates. *J Parenter Enteral Nutr*. 2002, 26 : 51-56.

99. **Fay JP, Farias RN.** The inhibitory action of fatty acids on the growth of Escherichia coli. *J Gen Microbiol*. 1975, 91 : 233-240.

100. **Fekkes D, van Dalen A, Edelman M, Voskuilen A.** Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995, 669 : 177-186.

101. **Felig P, Owen DE, Wahren J, Cahill GF.** Amino acid metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*. 1969, 48 : 584-598.

102. **Felske A, Vancanneyt M, Kersters K, Akkermans AD.** Application of temperature-gradient gel electrophoresis in taxonomy of coryneform bacteria. *Int J Syst Bacteriol*. 1999, 49 : 113-121.

103. **Feste AS.** Reversed-phase chromatography of phenylthiocarbamyl amino acid derivatives of physiological amino acids: an evaluation and a comparison with analysis by ion-exchange chromatography. *J Chromatogr*. 1992, 574 : 23-34.

104. Finke B, Stahl B, Pfenninger A, Karas M, Daniel H, Sawatzki G. Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. *Anal Chem*. 1999, 71 : 3755-3362.

105. Forget P, Sinaasappel M, Bouquet J, Deutz NE, Smeets C. Fecal polyamine concentration in children with and without nutrient malabsorption. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997, 24 : 285-288.

106. Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*. 1998, 64 : 3336-3345.

107. Freter R. Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*. 1974, 27 : 1409-1416.

108. Fujii T, Ohtsuka Y, Lee T, Kudi T, Shoji H, Sato H, Nagata S, Shimizu T, Yamashiro Y. Bifidobacterium breve enhances transforming growth factor beta1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol nutr*. 2006, 43 : 83-88.

109. Gaboriau-Routhiau V, Moreau MC. Oral tolerance to ovalbumin in mice: induction and long-term persistence unaffected by Staphylococcus aureus enterotoxin B and Clostridium perfringens type A enterotoxin. *Pediatr Res*. 1997, 42 : 503-508.

110. Gaya DR, Lyon TD, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, Liddell C, Stanley AJ, Morris AJ, Mackensie JF. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *QJM*. 2005, 98 : 435-441.

111. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999, 80 : F167-173.

112. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995, 125 : 1401-1412. Review.

113. Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, Noyer-Weidner M, Hong G, Bereswill S, Göbel UB. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods*. 2007, 68 : 94-105.

114. Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of Lactobacillus species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci*. 1992, 37 : 121-128.

115. Gondolesi G, Fishbein T, Chehade M, Tschernia A, Magid M, Kaufman S, Raymond K, Sansaricq C, LeLeiko N. Serum citrulline is a potential marker for rejection of intestinal allografts. *Transplantation Proceedings*. 2002, 34 : 918-920.

116. Gorbach SL, Goldin BR. Lactobacillus strains and methods of selection. *US Pat. 4839281*. 1989.

117. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999, 28 : 19-25.

118. Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997, 25 : 516-519.

119. Guignard F, Mauël J, Markert M. The monoclonal antibody Mac 387 recognizes three S100 proteins in human neutrophils. *Immunol Cell Biol*. 1996, 74 : 105-107.

120. Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med*. 1991, 173 : 471-481.

121. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2005, 14 : 49-57. Review.

122. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child*. 1990, 65 : 185-188.

123. Hällström M, Eerola E, Vuento R, Janas M, Tammela O. Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004, 23 : 463-470.

124. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000, 30 : 61-67.

125. Hayashi N, Kido J, Kido R, Wada C, Kataoka M, Shinohara Y, Nagata T. Regulation of calprotectin expression by interleukin-1alpha and transforming growth factor-beta in human gingival keratinocytes. *J Periodontal Res*. 2007, 42 : 1-7.

126. Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. Efficacy of Lactobacillus GG as a diarrheal preventive in travelers. *J Travel Med*. 1997, 4 : 41-43.

127. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JL. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001 291 : 881-884.

128. Hosoda M, He H, Hiramatu M, Hasimoto H, Benno Y. Effects of Lactobacillus GG strain intake on fecal microflora and defecation in healthy volunteers. *Bifidus*. 1994, 8 : 21-28.

129. Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002, 40 : 4423-4427.

130. Hungate RE. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In : Norris JR, Ribbons DW, eds. Methods in microbiology, vol. 3B. *New York : Academic Press*. 1969 : 117-132.

131. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoinne A. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem*. 2003, 270 : 1887-1899. Review.

132. Isaksen B, Fagerhol MK. Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc. *Mol Pathol*. 2001, 54 : 289-292.

133. Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*. 2000, 30 : 1604-1610.

134. Isolauri E, Kaila M, Mykkänen H, Ling WH, Salminen S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci*. 1994, 39 : 2595-2600.

135. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. A human Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*. 1991, 88 : 90-97.

136. Iwabuchi N, Takahashi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K. In vitro Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiol Immunol*. 2007, 51 : 649-660.

137. Jauniaux E, Gulbis B, Gerloo E. Free amino acids in human fetal liver and fluids at 12-17 weeks of gestation. *Hum Reprod*. 1999, 14 : 1638-1641.

138. Jensen C, Buist NRM, Wilson T. Absorption of individual fatty acids from long chain or medium chain triglycerides in very small infants. *Am J Clin Nutr*. 1986, 43 : 745-751.

139. Jianfeng G, Weiming Z, Ning L, Fangnan L, Li T, Nan L, Jieshou L. Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *J Surg Res*. 2005, 127 : 177-182.

140. Johansson ML, Molin G, Jeppsson B, Nobaek S, Ahrné S, Bengmark S. Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup : in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl Environ Microbiol*. 1993, 59 : 15-20.

141. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol*. 1997, 50 : 113-123.

142. Johnson AB, Strecker HJ. The interconversion of glutamic acid and proline. IV. The oxidation of proline by rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 1962, 237 : 1876-1882.

143. Jones ME. Conversion of glutamate to ornithine and proline: pyrroline-5-carboxylate, a possible modulator of arginine requirements. *J Nutr*. 1985, 115 : 509-515.

144. **Jones ME.** Catalysts of the urea cycle. *Trans. NY Acad. Sci*. 1981, 41 : 77-82.

145. **Josefsson S, Bunn SK, Domellof M.** Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007, 44 : 407-413.

146. **Kaila M, Isolauri I, Stoppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H.** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. *Pediatr Res*. 1992, 32 : 141-144.

147. **Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E.** Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003, 361 : 1869-1871.

148. **Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E.** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001, 357 : 1076-1079.

149. **Kamoun P, Parvy P, Cathrlineau L.** A rapid and simple method for citrulline determination in plasma. *Clin Chem*. 1983, 29 : 398-400.

150. **Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR.** Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med*. 2000, 135 : 444-451.

151. **Kapiki A, Costalos C, Oikonomidou C, Triantafyllidou A, Loukatou E, Pertrohilou V.** The effect of a fructo-oligosaccharide supplemented formula on gut flora of preterm infants. *Early Hum Dev*. 2007, 83 : 335-339.

152. **Kelly SE, Hunter JA, Jones DBN, Clark BR, Fleming S.** Morphological evidence for calcium-dependent association of calgranulin with the epidermal cytoskeleton in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol*. 1991, 124 : 403-409.

153. **Kennedy KA, Tyson JE, Chamnanvanikij S.** Early versus delayed initiation of progressive enteral feedings for parenterally fed low birth weight or preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000, (2) : CD001970. Review.

154. **Kien CL, Mc Clead RE, Codero L Jr.** In vivo lactose digestion in preterm infants. *Am J Clin Nutr*. 1996, 64 : 700-705.

155. **Kien CL.** Carbohydrates. In : Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S, eds. Nutritional needs of the preterm infant. Scientific Basis and Practical Guidelines. *Pawling, Cadeus Medical Publisher*. Inc, 1993 : 47-63.

156. **Kien CL.** Colonic fermentation of carbohydrate in the premature infant: possible relevance to necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*. 1990, 117 : S52-58. Review.

157. **Kien CL, Liechty EA, Myerberg DZ, Mullett MD.** Dietary carbohydrate assimilation in the premature infant: evidence for a nutritionally significant bacterial ecosystem in the colon. *Am J Clin Nutr*. 1987, 46 : 456-460.

158. Kirjavainen PV, Tuomola EM, Crittenden RG, Ouwehand AC, Harty DW, Morris LF, Rautelin H, Playne MJ, Donohue DC, Salminen SJ. In vitro adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli. *Infect Immun*. 1999, 67 : 2653-2655.

159. Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants : randomised controlled trial. *Arch Dis Child*. 1997, 76 : F101-107.

160. Kleessen B, Bunke H, Tovar K, Noack J, Sawazki G. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr*. 1995, 84 : 1347-1356.

161. Klein G, Hallmann C, Casas L, Abad J, Louwers J, Reuter G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of Lactobacillus reuteri and Lactobacillus rhamnosus used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J Appl Microbiol*. 2000, 89 : 815-824.

162. Kliegman RM, Walke WA, Yolken RH. Necrotizing enterocolitis : research agenda for a disease unknown etiology and pathogenesis. *Pediatr Res*. 1993, 34 : 701-708.

163. Knipp M, Vasak M. A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline. *Anal Biochem*. 2000, 286 : 257-264.

164. Knol J, Boehm G, Lidestri M, Negretti F, Jelinek J, Agosti M, Stahl B, Marini A, Mosca F. Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. *Acta Paediatr Suppl*. 2005, 94 : 31-33.

165. Koo WWK, Tsang RC. Calcium, Magnesium, Phosphorus, and vitamin D. In : Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S, eds. Nutritional needs of the preterm infant. Scientific Basis and Practical Guidelines. *Pawling, Cadeus Medical Publisher*. Inc, 1993 : 135-155.

166. Kristinsson J, Nygaard K, Aadland E, Barstad S, Sauar J, Hofstad N, Stallemo A, Haug B, Ugstad M, Ton H, Fuglerud P. Screening of first degree relatives of patients operated for colorectal cancer: evaluation of fecal calprotectin vs. hemoccult II. *Digestion*. 2001, 64 : 104-110.

167. Kunz AN, Noel JM, Fairchok MP. Two cases of Lactobacillus bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004, 38 : 457-458.

168. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*. 2000, 20 : 699-722. Review.

169. Kunz C, Rudloff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr*. 1993, 82 : 903-912. Review.

170. Kunz C, Lonnerdal B. Re-evaluation of the whey protein-casein ratio of human milk. *Acta Paediatr*. 1992, 81 : 107-112.

171. Kusenda CB, Borowitz S, Krenitsky J. Lactobacillus bacteremia in a patient with short bowel syndrome receiving enteral Lactobacillus GG supplementation. *Nutrition Practice Poster*. 2005, 20 : 129.

172. Laforgia N, Baldassarre ME, Pontrelli G, Indrio F, Altomare MA, Di Bitonto G, Mautone A. Calprotectin levels in meconium. *Acta Paediatr*. 2003, 92 : 463-466.

173. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*. 2005, 115 : 178-181.

174. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. With genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol*. 1995, 61 : 3069-3075.

175. Langhorst J, Elsenburch S, Mueller T, Rueffer A, Spahn G, Michalsen A, Dobos GJ. Comparison of 4 neutrophil-derived proteins in feces as indicators of disease activity in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2005, 11 : 1085-1091.

176. Lau T, Owen W, Yu YM, Noviski N, Lyons J, Zurakowski D, Tsay R, Ajami A, Young VR, Castillo L. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest*. 2000, 105 : 1217-1225.

177. Le Boucher J, Charret C, Coudray-Lucas C, Giboudeau J, Cynober L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clin Chem*. 1997, 43 : 1421-1428.

178. Lepage N, Mc Donald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem*. 1997, 43 : 2397-2402.

179. Levillain O , Parvy P, Hassler C. Amino acid handling in uremic rats: citrulline, a reliable marker of renal insufficiency and proximal tubular dysfunction. *Metabolism*. 1997, 46 : 611-618.

180. Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, Oh W. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2005, 115 : 1-4.

181. Ling WH, Lorpela R, Mykkänen H, Salminen S, Hänninen O. Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J Nutr*. 1994, 124 : 18-23.

182. Livesey G. Energy values of unavailable carbohydrate and diets: an inquiry and analysis. *Am J Clin Nutr*. 1990, 51 : 617-637.

183. Lodinova-Zadnikova R, Tlaskalova-Hogenova H, Sonneborn U. Local and serum antibody response in full term and premature infants after artificial colonization of the intestine with E. coli strain Nissle 1917 (Mutaflor ®). *Pediatr Allergy Immunol*. 1992, 3 : 43-48.

184. Long SS, Swenson RM. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr*. 1977, 91 : 298-301.

185. Löser C, Eisel A, Harms D, Fölsch UR. Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut*. 1999, 44 : 12-16.

186. Luo M, Fernandez-Estivariz C, Manatunga AK, Bazargan N, Gu LH, Jones DP, Klapproth JM, Sitaraman SV, Leader LM, Galloway JR, Ziegler TR. Are plasma citrulline and glutamine biomarkers of intestinal absorptive function in patients with short bowel syndrome? *J Parenter Enteral Nutr*. 2007, 31 : 1-7.

187. Lusitani D, Malawista SE, Montgomery RR. Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymophonuclear leukocytes, inhibits the growth of Borrelia burgdorferi. *Infect Immun*. 2003, 71 : 4711-4716.

188. Lutgens LC, Blijlevens NM, Deutz NE, Donnellu JP, Lambin P, de Pauw BE. Monitoring myeloalative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: a comparison with sugar permeability test. *Cancer*. 2005, 103 : 191-199.

189. Macfarlane GT, Gibson GR. Metabolic activities of the normal colonic flora. In : Gibson SAW, ed. Human Health. The contribution of microorganisms. Londres : Springer-Verlag, 1994 : 17-52.

190. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999, 69 : 1035S-1045S. Review.

191. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004, 4 : 478-485.

192. Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, Pochart P, Suau A. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006, 57 : 128-138.

193. Magne F, Suau A, Pochart P, Desjeux JF. Fecal microbial community in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005, 41 : 386-392. Review.

194. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997, 99 : 179-185.

195. Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG. *Ann Nutr Metab*. 1996, 40 : 137-145.

196. Mallett AK, Bearne CA, Rowland IR, Farthing MJ, Cole CB, Fuller R. The use of rats associated with a human faecal flora as a model for studying the effects of diet on the human gut microflora. *J Appl Bacteriol*. 1987, 63 : 39-45.

197. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, Latino MA, Gomirato G. Oral supplementation with Lactobacillus casei subspecies rhamnosus prevents enteric colonization by Candida species in preterm neonates : A randomized study. *Clin Inf Dis*. 2006. 47 : 1735-1742.

198. Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2001, 67 : 4939-4942.

199. Martens-Löbenhoffer J, Bode-Böger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003, 798 : 231-239.

200. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2004, 70 : 7220-7228.

201. Matsumoto S, Setoyama H, Umesaki Y. Differential induction of major histocompatibility complex molecules on mouse intestine by bacterial colonization. *Gastroenterology*. 1992, 103 : 1777-1782.

202. Meling TR, Aabakken L, Roseth A, Osnes M. Faecal calprotectin shedding after short-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterol*. 1996, 31 : 339-344.

203. Meulemans A. Electrochemical detection of nitroso-arginine as an intermediate between N-hydroxy-arginine and citrulline. An *in vitro* versus in vivo study using microcarbon electrodes in neuronal nitric oxide synthase and mice brain. *Neurosci Lett*. 2000, 294 : 125-129.

204. Micheli JL. Protein. In : Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S, eds. Nutritional needs of the preterm infant. Scientific Basis and Practical Guidelines. *Pawling, Cadeus Medical Publisher*. Inc, 1993 : 29-46.

205. Mihatsch WA, Hoegel J, Pohlandt F. Prebiotic oligosaccharides reduce stool viscosity and accelerate gastrointestinal transport in preterm infants. *Acta Paediatr*. 2006, 95 : 843-848.

206. Millar MR, Linton CJ, Cade A, Glancy D, Hall M, Jalal H. Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol*. 1996, 34 : 2506-2510.

207. Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA. Enteral feeding of premature infants with Lactobacillus GG. *Arch Dis Child*. 1993, 69 : 483-487.

208. Miyasaki KT, Bodeau AL, Murthy AR, Lehrer RI. In vitro antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against Capnocytophaga sputigena. *J Dent Res*. 1993, 72 : 517-523.

209. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, Radke M, Blaut M. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants : a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *J Clin Microbiol*. 2006, 44 : 4025-4031.

210. Mohyuddin F, Scriver CR. Amino acid transport in mammalian kidney: Multiple systems for imino acids and glycine in rat kidney. *Am J Physiol*. 1970, 219 : 1-8.

211. Moinard C, Cynober L. Citrulline : a new player in the control of nitrogen homeostasis. *J Nutr*. 2007, 137 : 1621S-1625S.

212. Moinard C, Jourdan M, Walrand S, Le Plenier S, Boirie Y, Cynober L. Citrulline directly modulates muscle protein synthesis : Evidence from in vitro studies. 2007, Abstract n° P321, p.155, 29th Congress of ESPEN.

213. Moinard C, Le Plenier S, Perret C, Cynober L. La citrulline module la synthèse protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via l'activation de S6R et de P70S6 kinase 1. Nutr Clin Métabol. 2007, S32, Abstract n° O-0004, 25ème Congrès de la Société Francophone de Nutrition clinique et Métabolisme.

214. Moinard C, Jourdan M, Walrand S, Cynober L. Use of citrulline in malnourished state. Patent 06/09077. 2006 Jul 8.

215. Montgomery RK, Mulberg AE, Grand RJ. Development of the human gastrointestinal tract : Twenty years of progress. *Gastroenterol*. 1999, 116 : 702-731.

216. Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora : the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol*. 1974, 27 : 961-979.

217. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the Gut-Associated Lymphoid Tissue. *Microb Ecol Health Dis*. 2001, 13 : 65-86.

218. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymhoid tissue. In R. Fuller and Perdigon (ed.), probiotics, vol 3. *Kluwer Academic Publishers*. 2000.

219. Moreau MC, Thomasson M, Ducluzeau R, Raibaud P. Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait. *Reprod Nutr Dévelop*. 1986, 26 : 745-753.

220. Morris SM Jr. Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis. In: Ignarro LJ (ed) Nitric oxide: biology and pathobiology, chap 11, *Academic press, San Diego*. 2000, pp 187-197.

221. **Mowat AM.** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003, 3 : 331-341. Review.

222. **Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M.** Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol*. 2006, 72 : 1027-1033.

223. **Muyzer G, Smalla K.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek*. 1998, 73 : 127-141.

224. **Naess-Andresen CF, Egelandsal B, Fagerhol MK.** Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of calprotectin (L1 protein). *J Clin Pathol : Mol Pathol*. 1995, 48 : M278-284.

225. **Neu J.** The "myth" of asphyxia and hypoxia-ischemia as primary causes of necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate*. 2005, 87 : 97-98.

226. **Neu J, Weiss MD.** Necrotizing enterocolitis : pathophysiology and prevention. *J Parenter Enteral Nutr*. 1999, 23 : S13-17.

227. **Neu J, Koldovsky O.** Nutrient absorption in the preterm neonate. *Clin Perinatol*. 1996, 23 : 229-243. Review.

228. **Neveux N, David P, Cynober L.** Measurement of amino acids concentrations in biological fluids and tissues using ion exchange chromatography. In: Cynober L (ed) Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition, chap 1, 2nd edn. *CRC press, Boca Raton*. 2004, p. 17-28.

229. **Newburg DS.** Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000, 30 : S8-17. Review.

230. **Nissen AC, van Gils CE, Menheere PP, Van den Neucker AM, van der Hoeven MA, Forget PP.** Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004, 38 : 107-108.

231. **Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H.** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*. 1996, 178 : 5636-5643.

232. **Odamaki T, Xiao JZ, Iwabuchi N, Sakamoto M, Takahashi N, Kondo S, Miyaji K, Iwatsuki K, Togashi H, Enomoto T, Benno Y.** Influence of Bifidobacterium longum BB536 intake on faecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season. *J Med Microbiol*. 2007, 56 : 1301-1308.

233. Odamaki T, Xiao JZ, Iwabuchi N, Sakamoto M, Takahashi N, Kondo S, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto T, Benno Y. Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007, 17 : 92-100.

234. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*. 1987, 330 : 80-82.

235. Ogata T, Nakamura T, Anjitsu K, Yaeshima T, Takahashi S, Fukuwatari Y, Ishibashi N, Hayasawa H, Fujisawa T, Iino H. Effect of *Bifidobacterium longum* BB536 administration on the intestinal environment, defecation frequency and fecal characteristics of human volunteers. *Bioscience Microflora*. 1997, 16 : 53-58.

236. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hämäläinen P, Ihantola-Vormisto A, Muurasniermi-Isoviita S, Nikkari S, Oksanen T, Pörsti I, Salminen E, et al. Prevention of travellers' diarrhoea by Lactobacillus GG. *Ann Med*. 1990, 22 : 53-56.

237. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children.. *Acta Paediatr*. 2002, 91 : 45-50.

238. Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L, Moinard C. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol*. 2006, 291 : E582-586.

239. Osowska S, Moinard C, Neveux N, Loi C, Cynober L. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*. 2004, 53 : 1781-1786.

240. Pacy PJ, Price GM, Halliday D, Quevedo MR, Millward DJ. Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses of protein synthesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. *Clin Sci (Lond)*. 1994, 86 : 103-116.

241. Papadia C, Sherwood RA, Kalantzis C, Wallis K, Volta U, Fiorini E, Forbes A. Plasma citrulline concentration: a reliable marker of small bowel absorptive capacity independent of intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol*. 2007, 102 : 1474-1482.

242. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marin O, Huijing F, Gelman B, Levi DM, Nery JR, Kato T, Mittal N, Nishida S, Thompson JF, Ruiz P. Serum citrulline as a marker of acute cellular rejection for intestinal transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2002, 34 : 915-917.

243. Parvy PR, Bardet JI, Rabier DM, Saudubray JM, Kamoun PP. Ion-exchange chromatography and clinical criteria in the screening of the aminoacidopathies. *Clin Chim Acta*. 1988, 176 : 269-277.

244. Perez GO, Epstein M, Rietberg B, Loutzenhiser R. Metabolism of arginine by the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol*. 1978, 235 : F376-380.

245. Perry. Chemical and cellular architecture. In: Lajtha A (Ed) Handbook of neurochemistry, Plenum Press, New York. 1982.

246. Pohajvuori E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O, Savilahti E. Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004, 114 : 131-136.

247. Putet G. Energy. In : Tsang RC, Lucas A, Uauy R, Zlotkin S, eds. Nutritional needs of the preterm infant. Scientific Basis and Practical Guidelines. *Pawling, Cadeus Medical Publisher*. Inc, 1993 : 15-28.

248. Rabier D, Kamoun P. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids*. 1995, 9 : 299-316.

249. Raibaud P, Ducluzeau R, Tancrede C. L'effet de barrière microbien dans le tube digestif : moyen de défense de l'hôte contre les bactéries exogènes. *Médecine et Maladies infectieuses*. 1977, 7 : 130-134.

250. Raftery MJ, Harrison CA, Jones A, Geczy CL. Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells : characterization of post-translational modification of zinc binding. *Biochem J*. 1996, 316 : 285-293.

251. Rastegar-Lari A, Gold F, Borderon JC, Laugier J, Lafont JP. Implantation and in vivo antagonistic effects of antibiotic susceptible *Escherichia coli* strains administered to premature infants. *Biol Neonate*. 1990, S8 : 73-78.

252. Rautanen T, Isolauri E, Salo E, Vesikari T. Management of acute diarrhoea with low osmolarity oral rehydration solutions and Lactobacillus strain GG. *Arch Dis Child*. 1998, 79 : 157-160.

253. Rhoads JM, Plunkett E, Galanko J, Lichtman S, Taylor L, Maynor A, Weiner T, Freeman K, Guarisco JL, Wu GY. Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr*. 2005, 146 : 542-547.

254. Rigottier-Gois L, Le Bourhis AG, Gramet G, Rochet V, Doré J. Fluorescent hybridization combined with flow cytometry and hybridization of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faecal samples using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003, 43 : 237-245.

255. Roseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1999, 34 : 50-54.

256. Roseth AG, Kristinsson J, Fagerhol MK, Scjonsby H, Aadland E, Nygaard K, Roald B. Faecal calprotectin: a novel test for the diagnosis of colorectal cancer? *Scand J Gastroenterol*. 1993, 28 : 1073-1076.

257. Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol*. 1992, 27 : 793-798.

258. Rotimi VO, Olowe SA, Ahmed I. The development of bacterial flora of premature neonates. *J Hyg (London)*. 1985, 94 : 309-318.

259. Rouwet EV, Heineman E, Buurman WA, ter Riet G, Ramsay G, Blanco CE. Intestinal permeability and carrier-mediated monosaccharide absorption in preterm neonates during the early postnatal period. *Pediatr Res*. 2002, 51 : 64-70.

260. Rugtveit J, Fagerhol MK. Age-dependent variations in fecal calprotectin concentrations in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002, 34 : 323-324.

261. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*. 1980, 78 : 1500-1507.

262. Ruseler-van Embden JGH, van Lieshout LMC, Gosselink MJ, Marteau P. Inability of Lactobacillus casei strain GG, L. acidophilus, and Bifidobacterium to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand J Gastroenterol*. 1995, 30 : 675-680.

263. Sairanen U, Piirainen, Grasten S, Tompuri T, Mättö J, Saarela M, Korpela R. The effect of probiotic fermented milk and inulin on the functions and microecology of the intestine. *J Dairy Res*. 2007, 74 : 367-373.

264. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985, 144 : 186-190.

265. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 2001, 67 : 504-513.

266. Schäfer H, Muyzer G. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology*. 2001, 30 : 425-468.

267. Schmidlin A, Fischer S, Wiesinger H. Transport of L-citrulline in neural cell cultures. *Dev Neurosci*. 2000, 22 : 393-398.

268. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol*. 2004, 4 : 5.

269. Schumann A, Nutten S, Donnicola D, Comelli EM, Mansourian R, Cherbut C, Corthesy-Theulaz I, Garcia-Rodenas C. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiol Genomics*. 2005, 23 : 235-245.

270. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalised preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*. 2003, 54 : 393-399.

271. Scriver CR, Davies E. Endogenous renal clearance rates of free amino acids in pre-pubertal children. (Employing an accelerated procedure for elution chromatography of basic amino acids on ion exchange resin). *Pediatrics*. 1965, 36 : 592-598.

272. Senterre J. Les besoins en calcium et en phosphore du premature. In : Salle BL, Putet G. L'alimentation du nouveau-né et du prématuré. Paris : Doin 1986, 167-180.

273. Senterre J. Contribution à l'étude de l'alimentation optimale du prématuré. Liège : Vailland Carmanne SA. 1976.

274. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Doré J. Quantification of bacterial goups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*. 2000, 66 : 2263-2266.

275. Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002, 16 : 915-931. Review.

276. Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R, Kirkkola AL. Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med*. 1990, 22 : 57-59.

277. Silberer H, Küppers B, Mickisch O, Baniewicz W, Drescher M, Traber L, Kempf A, Schmidt-Gayk H. Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Clin Lab*. 2005, 51 : 117-126.

278. Silberstein M, Lane D, Dodd S, Opeskin K. Identification of a by-product of nitric oxide synthase activity in human acute brain injury with in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2002, 23 : 389-392.

279. Simhon A, Douglas JR, Drasar BS, Soothill JF. Effect of feeding on infants' faecal flora. *Arch Dis Child*. 1982, 57 : 54-58.

280. Smith AD, Benziman M, Strecker HJ. The formation of ornithine from proline in animal tissues. *Biochem J*. 1967, 104 : 557-563.

281. Sohnle PG, Hunter MJ, Hahn B, Chazin WJ. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis*. 2000, 182 : 1272-1275.

282. Sohnle PG, Hahn BL, Santhanagopalan V. Inhibition of Candida albicans growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. *J Infect Dis*. 1996, 174 : 1369-1372.

283. Sohnle PG, Collins-Lech C, Wiessner JH. Antimicrobial activity of an abundant calcium-binding protein in the cytoplasm of human neutrophils. *J Infect Dis*. 1991, 163 : 187-192.

284. Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*. 2005, 307 : 1955-1959.

285. Sorg C. The calcium binding proteins MRP8 and MRP14 in acute and chronic inflammation. *Behringer Inst Mitt*. 1992, 91 : 126-137.

286. Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M, Sawatzki G. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1994, 223 : 218-226.

287. Stansbridge EM, Walker V, Hall MA, Smith SL, Millar MR, Bacon C, Chen S. Effects of feeding premature infants with Lactobacillus GG on gut fermentation. *Arch Dis Child*. 1993, 69 : 488-492.

288. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002, 99 : 15451-15455.

289. Stark PL, Lee A. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *J Hyg (Lond)*. 1982, 89 : 59-67.

290. Steinbakk M, Naess-Andressen CF, Lingaas E, Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*. 1990, 336 : 763-765.

291. Stoll B, Chang X, Fan MZ, Reeds PJ, Burrin DG. Enteral nutrient intake level determines intestinal protein synthesis and accretion rates in neonatal pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000, 279 : G288-294.

292. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999, 65 : 4799-4807.

293. Sudan D, Vargas L, Sun Y, Bok L, Dijkstra, Langnas A. Calprotectin : a novel non-invasive marker for intestinal allograft monitoring. *Ann Surg*. 2007, 246 : 311-315.

294. Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, Shreeve DR. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol hepatol*. 2002, 14 : 841-845.

295. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowitcz JZ, Armanska M, Mikolojczyk W. Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr*. 2001, 138 : 361-365.

296. Szylit O, Maurage C, Gasqui P, Popot F, Favre A, Gold F, Borderon JC. Fecal short-chain fatty acids predict digestive disorders in premature infants. *J Parenter Enteral Nutr*. 1998, 22 : 136-141.

297. Takahashi N, Kitazawa H, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Iwatsuki K, Kokubo S, Saito T. An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of Bifidobacterium longum inhibits IgE production in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006, 46 : 461-469.

298. Takahashi N, Kitazawa H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K, Saito. Oral administration of an immunostimulatory DNA sequence from Bifidobacterium longum improves Th1/Th2 balance in a murine model. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006, 70 : 2013-2017.

299. Takahashi N, Kitazawa H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K, Saito T. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from Bifidobacterium longum suppresses Th2 immune responses in a murine model. *Clin Exp Immunol*. 2006, 145 : 130-138.

300. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut*. 2000, 47 : 506-513.

301. Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2000, 119 : 15-22.

302. Tomoda T, Nakano Y, Kageyama T. Effect of yogurt supplement with *Bifidobacterium* and /or lactulose in healthy persons : A comparative study. *Bifidobacteria Microflora*. 1991, 10 : 123-130.

303. Tomoda T, Nakano Y, Kageyama T. Intestinal *Candida* overgrowth and *Candida* infection in patients with leukemia : Effect of *Bifidobacterium* administration. *Bifidobacteria Microflora*. 1988, 7 : 71-74.

304. Ton H, Brandsnes, Dale S, Hotlund J, Skuibina E, Schonsby, Johne B. Improved assay for fecal calprotectin. *Clin Chim Acta*. 2000, 292 : 41-54.

305. Trahair JF, Sangild PT. Fetal organ growth in response to oesophageal infusion of amniotic fluid, colostrums, milk or gastrin-releasing peptide : a study in fetal sheep. *Reprod Fertil Dev*. 2000, 12 : 87-95.

306. Tynkkynen S, Singh KV, Varmanen P. Vancomycin resistance factor of Lactobacillus rhamnosus GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *Int J Food Microbiol*. 1998, 41 : 195-204.

307. van de Poll MC, Siroen MP, van Leeuwen PA, Soeters PB, Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, Dejong CH. Interorgan amino acid exchange in humans: consequences for arginine and citrulline metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2007, 85 : 167-172.

308. van de Poll MC, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, van Leeuwen PA, Dejong CH. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *J Physiol*. 2007, 581 : 819-827.

309. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr*. 1999, 135 : 564-568.

310. van Eijk HM, Rooyakkers DR, Soeters PB, Deutz NE. Determination of amino acid isotope enrichment using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1999, 271 : 8-17.

311. van Eijk HM, Rooyakkers DR, Deutz NE. Rapid routine determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography with a 2-3 microns Spherisorb ODS II column. *J Chromatogr*. 1993, 620 : 143-148.

312. van Eijk HM, van der Heijden MA, van Berlo, Soeters PB. Fully automated liquid-chromatographic determination of amino acids. *Clin Chem*. 1988, 34 : 2510-2513.

313. van Elburg RM, Fetter WP, Bunkers CM, Heymans HS. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003, 88 : F52-55.

314. Vasquez A, Ahrné S, Pettersson B, Molin G. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus zeae and Lactobacillus rhamnosus. *Lett Appl Microbiol*. 2001, 32 : 215-219.

315. Viljanen M, Pohjavuori E, Haahtela T, Korpela R, Kuitunen M, Sarnesto A, Vaarala O, Savilahti E. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2005, 115 : 1254-1259..

316. Vinnars E, Bergström J, Fürst P. Influence of the postoperative state on the intracellular free amino acids in human muscle tissue. *Ann Surg*. 1975, 182 : 665-671.

317. Visek WJ. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr*. 1986, 116 : 36-46.

318. Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol*. 2001, 70 : 130-134.

319. von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, Reese GE, Darzi AW, Teare JP, Paraskeva P, Tekkis PP. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*. 2007, 102 : 803-813.

320. Wakabahashi Y. The glutamate crossway. In : Cynober L, editor. Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. 2nd ed. Boca Raton : CRC Press. 2004, p. 135-152.

321. Wakabayashi Y, Yamada E, Yoshida T, Takahashi H. Arginine becomes an essential amino acid after massive resection of rat small intestine. *J Biol Chem*. 1994, 269 : 32667-32671.

322. Wakabayashi Y, Jones ME. Pyrroline-5-carboxylate synthesis from glutamate by rat intestinal mucosa. *J Biol Chem*. 1983, 258 : 3865-3872.

323. Walker V, Mills GA, Hall MA et al. Carbohydrate fermentation by gut microflora in preterm neonates. *Arch Dis Child*. 1989, 64 : 1367-1373.

324. Westerbeek EA, van den Berg, Lafeber HN, Knol J, Fetter WP, van Elburg RM. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clin Nutr*. 2006, 25 : 361-368. Review.

325. Wharton BA. Nutrition and Feeding of Preterm infants. *Oxford : Blackwell Scientific Publications*. 1987, 2-27.

326. Wharton BA. Nutrition and Feeding of Preterm infants. *Oxford : Blackwell Scientific Publications*. 1987, 37-46.

327. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001, 64 : 365-391.

328. Wileman SM, Mann GE, Pearson JD, Baydoun AR. Role of L-citrulline transport in nitric oxide synthesis in rat aortic smooth muscle cells activated with LPS and interferon-gamma. *Br J Pharmacol*. 2003, 140 : 179-185.

329. Wilkinson MM, Busuttil A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding protein in normal and abnormal tissues. *J Cell Sci*. 1988, 91 : 221-230.

330. Wilson KH, Blitchington RH. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*. 1996, 62 : 2273-2278.

331. Wilson GB, Jahn TL, Fonseca JR. Demonstration of serum protein differences in cystic fibrosis by isoelectric focussing in thin-layer polyacrylamide gels. *Clin Chim Acta*. 1973, 49 : 79-85.

332. Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol*. 1981, 241 : E473-480.

333. Windmueller HG, Spaeth AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J Biol Chem*. 1980, 255 : 107-112.

334. Wostmann BS, Pleasants JR. The germ-free animal fed chemically defined diet: a unique tool. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991, 198 : 539-546. Review.

335. Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. *Lab Anim Sci*. 1983, 33 : 46-50.

336. **Wu G, Jaeger LA, Bazer FW, Rhoads JM.** Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *J Nutr Biochem*. 2004, 15 : 447-451.

337. **Wu G.** Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr*. 1998, 128 : 1249-1252.

338. **Wu G.** Determination of proline by reversed-phase high performance liquid chromatography with automated pre-column *o*-phthaldialdehyde derivatization. *J. Chromatogr*. 1993, 641 : 168-175.

339. **Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Miyaji K, Enomoto K, Sakoda T, Iwatsuki K, Enomoto T.** Clinical efficacy of probiotic Bifidobacterium longum for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit. *Allergol Int*. 2007, 56 : 67-75.

340. **Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T.** Effect of probiotic Bifidobacterium longum BB536 [corrected] in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006, 16 : 86-93. Erratum in : *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006, 16 : 273.

341. **Yaeshima T, Takahashi S, Matsumoto N, Ishibashi N, Hayasawa H, Iino H.** Effect of yogurt containing Bifidobacterium longum BB536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency : A comparison with standard yogurt. *Bioscience microflora*. 1997, 16 : 73-77.

342. **Yamazaki S, Machii S, Tsuyuki S, Kawashima T, Ueda K.** Immunological responses to monoassociated Bifidobacterium longum and their relation to prevention of invasion. *Immunology*. 1985, 56 : 43-50.

343. **Yamazaki S, Kamimura H, Momose H, Kawashima T, Ueda K.** Protective effect of Bifidobacterium-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*. *Bifidobacteria Microflora*. 1982, 1 : 55-59.

344. **Young RJ, Vanderhoof JA.** Two cases of Lactobacillus bacteremia during probiotic treatment of short gut syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004, 39 : 436-437.

345. **Yui S, Mikami M, Yamazaki M.** Induction of apoptotic cell death in mouse lymphoma and human leukemia cell lines by a calcium-binding protein complex, calprotectin, derived from inflammatory peritoneal exudate cells. *J Leukoc Biol*. 1995, 58 : 650-658.

346. **Zhang WZ, Kaye DM.** Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Anal Biochem*. 2004, 326 : 87-92.

347. **Ziegler EE, Fomont ST.** Lactose enhances mineral absorption in infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1983, 2 : 288-294.

348. Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006, 23 : 1567-1574.

349. Zoetendal EG, Akkermans ADL, de Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Env Microbiol*. 1998, 64 : 3854-3859.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Fiche informative sur les souches *B. longum* BB536 et *L. rhamnosus* GG

◈ *Bifidobacterium longum* BB536

La souche *B. longum* BB536 a été isolée pour la première fois en 1969 dans les selles d'un nouveau-né sain par le Docteur S. Shimamura (Institut Central de Morinaga Co Ltd) [342]. Cette souche est actuellement maintenue en culture dans la collection de Morinaga Milk Industry Co. Ltd et également, dans la collection du Centre de Recherche Nestlé, sous la référence NCC 3001. Le génome entier de BB536 a été séquencé (*Communication personnelle, Centre de Recherche Nestlé, Suisse*). Aucune séquence génomique de BB536 ne correspond à celle de gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans des processus pathogéniques (IgA protéase, fibrinolysine, hémolysine, hyaluronidase, endotoxine, neurotoxine…). L'analyse du génome de BB536 n'a pas mis en évidence de gènes connus, impliqués dans les processus de transfert de résistance aux antibiotiques. BB536 a été pleinement caractérisé et peut être identifié et suivi par des méthodes indépendantes de la culture (*Communication personnelle, Centre de Recherche Nestlé, Suisse*). BB536 a été testé pour sa sensibilité à l'égard de nombreux antibiotiques (*Communication personnelle, Centre de Recherche Nestlé, Suisse*). Il en résulte que cette souche est sensible aux antibiotiques à large spectre ainsi qu'aux antibiotiques spécifiques des bactéries gram+, et est insensible à de nombreux aminoglycosides et à la vancomycine.

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont été réalisées *in vitro* [13, 136, 297] et *in vivo*, chez l'animal [298, 299, 343] et l'homme, rapportant les effets bénéfiques de cette souche pour l'hôte. Dans cette fiche informative, seuls les effets bénéfiques de BB536 rapportés chez l'homme seront mis en avant **(Tableau 14)**. Plusieurs études cliniques menées chez l'homme sain ou malade ont rapporté que l'administration de BB536 pouvait agir sur : 1) l'équilibre du MI, 2) le transit gastro-intestinal et les caractéristiques des selles, 3) le système immunitaire (Effet immunomodulateur) et 4) sur le traitement et la prévention des allergies.

Tableau 14. Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 observés chez l'homme.

Souche probiotique *B. longum* BB536			**Populations étudiées**			**Effets observés**	**Références**
Dose	Durée	Mode d'administration	Indication	Effectifs	Age (Années)		
nd	13 sem	Yaourt	Allergie pollen	44	nd	**Composition du MI** → Maintien MI normal/allergie pollen	Odamaki 2007 [232] [Japon]
2 x 100 g/jour	14 sem	Yaourt	Allergie pollen	40	nd	**Composition du MI** → Maintien MI normal/allergie pollen	Odamaki 2007 [233] [Japon]
						↘ Symptômes cliniques/allergie pollen ↘ Marqueurs sanguins d'allergie pollen	Xiao 2006 [340] [Japon]
5.10^{10} ufc, 2 fois/jour	4 sem	Poudre	Allergie pollen	24	nd	↘ Symptômes cliniques/allergie pollen	Xiao 2007 [339] [Japon]
3 g/jour (Levenin)	3 mois	Poudre	Leucémie	134	nd	**Composition du MI** ↘ Incidence des infections à *Candida sp*	Tomoda 1988 [303] [Japon]
3 x 200 mL/jour	3 sem	Lait fermenté (*Bifidobacterium spp* 420 + *L. acidophilus* ± Inuline)	Sain	66	40[a] (22-60)[b]	**Composition du MI** ↗ des bifidobactéries ↗ des lactobacilles	Sairanen 2007 [263] [Japon]
2.10^{9} ufc/jour ou 2.10^{10} ufc/jour	1 sem	Lait	Sain	12	(21-57)	**Composition du MI**	Ogata 1997 [235] [Japon]
2.10^{9} ufc/jour	3 sem	Lait		40	(20-28)	**↗ Fréquence des selles** **Caractéristiques des selles** Amélioration de la consistance des selles ↗ pourcentage d'eau ↘ de la [ammoniaque] ↘ activités β-glucuronidase, uréase et tryptophanase	

Légende : L'âge est exprimé en [a]moyenne et/ou en [b]intervalle entre les valeurs minimales et maximales, nd=pas de donnée.

Tableau 14 (suite). Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* BB536 observés chez l'homme.

Souche probiotique *B. longum* BB536			**Populations étudiées**			**Effets observés**	**Références**
Dose	Durée	Mode d'administration	Indication	Effectifs	Age (Années)		
100 g/jour	2 sem	Yaourt	Sain	11	nd	**Composition du MI** ↗ des bifidobactéries (< 1 log)	Yaeshima 1997 [341] [Japon]
	3 sem			39	nd	↗ **Fréquence des selles**	
5.10^8 ufc/jour	8 sem	Eau stérile	Sain	10	Prématurés	**Composition du MI** ↗ des bifidobactéries	Akiyama 1994 [4] [Japon]
Au moins 10^7 ufc/g (125 g, 3 fois/jour)	3 sem	Lait fermenté	Sain	45	nd	**Composition du MI** ↗ des bifidobactéries ↗ des bactéries anaérobies strictes ↘ des clostridies, *Bacteroides* et *E. coli*	Ballongue 1993 [19] [France]
De 2.10^5 à 5.10^5 ufc/g (3 g/jour)	5 sem	Poudre	Sain	5	31,5[a] (26-38)[b]	**Composition du MI** ↘ des clostridies lécithinase négative (CLN) ↘ % des CLN et % *Bacteroides* ↘ *C. paraputrificum* et *C. inocuum* **Caractéristiques des selles** ↘ du pH fécal ↘ de la [ammoniaque]	Benno 1992 [27] [Japon]
10^8 ufc/g (130 g/jour)	3-6 sem	Yaourt (± lactulose)	Sain	10	(20-60)	**Composition du MI** ↗ des bifidobactéries ↗ **Fréquence des selles** **Caractéristiques des selles** ↘ de la [ammoniaque]	Tomoda 1991 [302] [Japon]

Légende : L'âge est exprimé en [a]médiane et/ou en [b]intervalle entre les valeurs minimales et maximales, nd=pas de donnée, AGCC : acides gras à chaîne courte.

◈ *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) a été isolé pour la première fois par Gorbach et Goldin, dans le milieu des années 1980, à partir du MI d'un homme sain [116]. Depuis sa découverte, elle a été déposée dans la collection originale américaine ATCC 53103 et est maintenue en culture dans la collection dans la collection du Centre de Recherche Nestlé, sous la référence NCC 4007. Le génome entier de LGG a été séquencé (*Communication personnelle, Centre de Recherche Nestlé, Suisse*). Comme nous venons de le voir pour la souche BB536, aucune séquence génomique de LGG ne correspond à celle de gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans des processus pathogéniques (IgA protéase, fibrinolysine, hémolysine, hyaluronidase, endotoxine, neurotoxine…). L'analyse du génome de LGG n'a pas mis en évidence de gènes connus, impliqués dans les processus de transfert de résistance aux antibiotiques. LGG a été pleinement caractérisé et peut être identifié et suivi par des méthodes indépendantes de la culture (*Communication personnelle, Centre de Recherche Nestlé, Suisse*). LGG a été également testé pour sa sensibilité à l'égard de nombreux antibiotiques (*Communication personnelle, Centre de Recherche Nestlé, Suisse*). Il en résulte que cette souche est sensible aux antibiotiques à large spectre ainsi qu'aux antibiotiques spécifiques des bactéries gram+, et est insensible à de nombreux aminoglycosides. Contrairement à BB536, LGG est résistante à la vancomycine. Cette résitance à la vancomycine semble être inhérent à l'espèce. Aucun gène connu (vanA, van B, vanC, vanH, vanX, vanY, vanZ, vanS, vanR) impliqué dans les processus de transfert de résistance à la vancomycine n'a été identifié pour cette souche [161, 306].

Diverses études menées chez l'animal ont rapporté l'innocuité de LGG [84, 158, 262]. Les propriétés bénéfiques de LGG pour la santé de l'homme ont été étudiées et documentées de façon détaillée **(Tableau 15)**. D'après les nombreuses données da la littérature, il apparaît que l'administration de LGG puisse agir sur : 1) l'équilibre du MI, 2) le métabolisme du MI, 3) le système immunitaire (Effet immunomodulateur), 4) le traitement et la prévention de diverses formes de diarrhées, 5) le traitement et la prévention des allergies et 6) la prévention des rechutes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

Bien que LGG exerce de nombreux effets bénéfiques pour la santé de l'homme, il semble important de garder à l'esprit le fait que de rares cas isolés de bactériémie à LGG ont été décrits, chez des enfants et nouveau-nés ayant un profil clinique très particulier [79, 167, 171, 173, 344].

Tableau 15. Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Lactobacillus rhamnosus* GG observés chez l'homme.

Souche probiotique *L. rhamnosus* GG			**Populations étudiées**			**Effets observés**	**Références**
Dose	Durée	Mode d'administration	Indication	Effectifs	Age		
6.10^9 ufc (1 fois/jour)	6 semaines	Lait humain	Sain	80	Prématurés	**Composition du MI** ↘ Colonisation Candida	Manzoni 2006 [197] [Italie]
10^9 ufc (2 fois/jour)	14 jours	Lait humain/Formule infantile	Sain	71	Prématurés	**Composition du MI** ↗ Diversité bactérienne (Prématurés, PN<1500g)	Agarwal 2003 [3] [Etats-Unis]
10^8 ufc (2 fois/jour)	14 jours	Lait humain/Formule infantile	Sain	20	Prématurés	**Métabolisme du MI** ↗ Ethanol fécal	Stansbridge 1993 [287] [Angleterre]
10^{11} ufc/L (2 x 150mL/jour)	4 semaines	Yaourt	Sain	64	Adultes (20-41 ans)[a]	**Métabolisme du MI** ↘ Activités enzymatiques fécales : β-glucuronidase, nitroréductase et acide glycocholique hydrolase	Ling 1994 [181] [Finlande]
$1,4.10^{10}$ puis $4,5.10^{10}$ ufc (3 fois/jour)	10 jours 10 jours	Lait caillé	Sain	6	Adultes (33-55 ans)	**Composition du MI** ↗ des bifidobactéries et des lactobacilles ↘ des clostridies	Hosoda 1994 [128] [Japon]
nd	nd	nd	DDV	756	Adultes (10-80 ans)	**↘ Incidence de diarrhées des voyageurs**	Oksanen 1990 [236] [Finlande]
2.10^9 ufc (1 fois/jour)	Voyage : 1-3 semaines	Poudre	DDV	245	Adultes (>18 ans)	**↘ Incidence de diarrhées des voyageurs**	Hilton 1997 [126] [Etats-Unis]
6.10^9 ufc (2 fois/jour)	2 semaines	Poudre	DAA	42	Adultes (18-61 ans)	**↘ Incidence de diarrhées associées aux antibiotiques** (Rabeprazole, Clarithromycine Tinidazole)	Cremonini 2002 [63] [Italie]
6.10^9 ufc (2 fois/jour)	2 semaines	Poudre	DAA	60	Adultes (40 ± 12 ans)[b]	**↘ Incidence de diarrhées associées aux antibiotiques** (Rabeprazole, Clarithromycine Tinidazole)	Armuzzi 2001 [14] [Italie]

Légende : DDV=Diarrhées des voyageurs, DAA=Diarrhées associées aux antibiotiques, PN=Poids de naissance. L'âge est exprimé en [a]intervalle entre les valeurs minimales et maximales ou en [b]moyenne ± écart-type, nd=pas de donnée.

Tableau 15 (suite). Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Lactobacillus rhamnosus* GG observés chez l'homme.

Souche probiotique *L. rhamnosus* GG			**Populations étudiées**			**Effets observés**	**Références**
Dose	Durée	Mode d'administration	Indication	Effectifs	Age		
2.10^{10} ufc (2 fois/jour)	7-10 jours	Capsule	DAA	119	Enfants (2 sem-12,8 ans) [a]	↘ **Incidence de diarrhées associées aux antibiotiques** (nombreux)	Arvola 1999 [15] [Finlande]
1.10^{10}-2.10^{10} ufc (1 ou 2 fois/jour)	10 jours	Capsule	DAA	188	Enfants (6 mois-10 ans)	↘ **Incidence de diarrhées associées aux antibiotiques** (nombreux)	Vanderhoof 1999 [309] [Etats-Unis]
125 mL de yaourt (2 fois/jour)	7 jours	Yaourt	DAA	16	Adultes (18-24 ans)	↘ **Durée de diarrhées associées aux antibiotiques** (Erythromycine, Acistrate)	Siitonen 1990 [276] [Finlande]
5.10^{9} ufc (2 fois/jour)	Hospitalisation	Poudre	DAR	123	Enfants (6-36 mois)	↘ **Durée de diarrhées à rotavirus** (92% infection à rotavirus)	Rautanen 1998 [252] [Finlande]
10^{9} ufc (2 fois/jour)	Maximale : 5 jours	Poudre	DAR	100	Enfants (3-36 mois)	↘ **Durée de diarrhées à rotavirus** (61% infection à rotavirus)	Guarino 1997 [118] [Italie]
10^{10} ufc (2 fois/jour)	5 jours	Poudre	DAR	42	Enfants (5-28 mois)	↘ **Durée de diarrhées à rotavirus** (100% infection à rotavirus)	Isolauri 1994 [134] |Finlande]
10^{10-11} ufc (2 fois/jour)	5 jours	Lait fermenté	DAR	39	Enfants (16 ± 6 mois) [b]	↘ **Durée de diarrhées à rotavirus** (88% infection à rotavirus)	Kaila 1992 [146] [Finlande]
10^{10-11} ufc (2 fois/jour)	5 jours	Lait fermenté Poudre	DAR	71	Enfants (4-45 mois)	↘ **Durée de diarrhées à rotavirus** (82% infection à rotavirus)	Isolauri 1991 [135] |Finlande]
6.10^{7} ufc (1 fois/jour)	≥ 7 jours	Poudre	DI	235	Enfants	↘ **Incidence et durée des diarrhées infectieuses persistantes** (*E. coli*, *Shigella sp*, *C. difficile*)	Basu 2007 [23] [Inde]
6.10^{9} ufc (2 fois/jour)	Hospitalisation	nd	DI	81	Enfants (1-36 mois)	↘ **Incidence des diarrhées infectieuses nosocomiales** (Rotavirus)	Szajewska 2001 [295] [Pologne]

Légende : DAA=Diarrhées associées aux antibiotiques, DAR= Diarrhées à rotavirus, DI= Diarrhées infectieuses. L'âge est exprimé en [a]intervalle entre les valeurs minimales et maximales ou en [b]moyenne ± écart-type, nd=pas de donnée.

Tableau 15 (suite). Effets bénéfiques de la supplémentation orale en *Lactobacillus rhamnosus* GG observés chez l'homme.

Souche probiotique *L. rhamnosus* GG			**Populations étudiées**			**Effets observés**	**Références**
Dose	Durée	Mode d'administration	Indication	Effectifs	Age		
5.10^9 ufc (2 fois/jour)	4 semaines	Poudre	Allergie	230	Enfants (1,4-11,5 mois)[a]	**Effet immunomodulateur** (Eczéma atopique/ syndrome de la dermatite et allergie alimentaire) ↗ IgA, ↘ TNFα et α anti-trypsine	Viljanen 2005 [315]
						Effet immunomodulateur ↗ IFNβ	Pohjavuori 2004 [246] [Finlande]
10^{10} ufc (1 fois/jour)	2-4 sem (av. acc.)	Poudre	Allergie	132	Femmes adultes	**↘ Incidence de l'eczéma atopique** (Enfants 2 ans et 4 ans)	Kalliomaki 2001 [147] Kalliomaki 2003 [148] [Finlande]
	6 mois	Lait			Enfants		
5.10^8 ufc/g (1 fois/jour)	nd	Lait (+ *B. lactis* Bb12)	Allergie	27	Nouveau-nés (4,6 mois)[b]	**↘ Sévérité de la dermatite atopique**	Isolauri 2000 [133] [Finlande]
						Effet immunomodulateur ↘ CD4 sériques, ↘ protéine éosinophile X urinaire	
5.10^8 ufc/g (1 fois/jour)	nd	Poudre	Allergie	27	Nouveau-nés	**↘ Sévérité de la dermatite atopique et allergie au lait de vache**	Majamaa 1997 [194] [Finlande]
						Effet immunomodulateur ↘ TNFα et α anti-trypsine	
18.10^9 ufc (1 fois/jour)	12 mois	Poudre	MICI	187	Adultes	**Prévention de la rechute/Colite ulcérante**	Zocco 2006 [348] [Italie]
2.10^9 ufc (1 fois/jour)	6 mois	Poudre	MICI	11	Adultes (34 ans)	**Prévention de la rechute/Maladie de Crohn**	Schültz 2004 [268] [Allemagne]
10^{10} ufc (2 fois/jour)	10 jours	Poudre	MICI	14	Enfants	**Effet immunomodulateur** ↗ Cellules sécrétrices d'IgA	Malin 1996 [195] [Finlande]

Légende : MICI=Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, av. acc.= avant accouchement. L'âge est exprimé en [a]intervalle entre les valeurs minimales et maximales ou en [b]moyenne, nd=pas de donnée.

ANNEXE 2 : Recueil des données relatif aux nouveau-nés prématurés inclus dans l'étude probiotiques (Cahier d'observations)

PROTOCOLE

SUPPLEMENTATION EN PROBIOTIQUES DU NOUVEAU-NE PREMATURE

CAHIER D'OBSERVATION

INVESTIGATEURS

Professeur D. Darmaun : Service de Gastroentérologie et Nutrition, INSERM U539, Hôtel Dieu, Place Alexis Ricordeau, Nantes, 02.40.08.42.75

Professeur JC. Rozé : Service de Néonatologie, CHU de Nantes, Hôpital Mère Enfant, Quai Moncousu, 02.40.08.35.69

Docteur H. Piloquet : Clinique Médicale Pédiatrique, CHU de Nantes, Hôpital Mère Enfant, Quai Moncousu, 02.40.08.35.23

Professeur M. Voyer : Service de Néonatologie, Institut de Puériculture, Boulevard Brune, Paris, 01.40.44.39.39

LIEU DE L'ETUDE NANTES ☐ PARIS ☐

NOM /__/__/__/ (3 premières lettres)

PRENOM /__/__/__/ (3 premières lettres)

N° D'INCLUSION ***/__/__/__/***

MEDECIN RESPONSABLE /_____/

1. INCLUSION

1.1. VERIFICATION DES CRITERES D'INCLUSION

	oui	non
- Poids de naissance inférieur à 1500g	○	○
- Nouveau-nés ayant moins de 15 jours de vie	○	○
- Age gestationnel inférieur à 32 SA	○	○
- Pas de pathologie en dehors de la prématurité et de ses complications	○	○
- Alimentation entérale débutée (quel que soit le volume)	○	○
- Information des parents	○	○
- Accord écrit des parents	○	○

UNE REPONSE NEGATIVE INTERDIT L'INCLUSION

1.2. VERIFICATION DES CRITERES D'EXCLUSION

	oui	non
- Poids de naissance supérieur ou égal à 1500g	○	○
- Nouveau-nés ayant 15 jours ou plus de vie	○	○
- Terme de naissance supérieur ou égal à 32 SA	○	○
- Pathologie interdisant l'alimentation entérale durant les 15 premiers jours	○	○
- Pathologies autres que celles liées à la prématurité et ses complications	○	○
- Absence de consentement des parents	○	○

UNE REPONSE POSITIVE INTERDIT L'INCLUSION

L'enfant peut être inclus si et seulement si : 1) la réponse est <u>OUI</u> à tous les critères d'inclusion et 2) la réponse est <u>NON</u> à tous les critères d'exclusion.

1.3. RANDOMISATION

Date de la randomisation /__/__//__/__//__/__/__/__/

Critères d'ajustement

Centre /_____/

Age gestationnel /__/__/ (jours) /__/__/ (heures)

Poids de naissance /__/__/__/__/ g

Numéro de randomisation /_____/

2. RENSEIGNEMENTS SUR LA MERE

Pathologie antérieure à la grossesse nécessitant une thérapeutique poursuivie pendant la grossesse :
oui ☐ non ☐
Si oui, la ou lesquelles

---

3. RENSEIGNEMENTS SUR LA GROSSESSE

Date des dernières règles (réelle ou corrigée par échographie) /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Geste /__/ Pare /__/

3.1. EVENEMENTS PATHOLOGIQUES PENDANT LA GROSSESSE

a. Pathologie de la mère

Préalable à la grossesse ☐ due à la grossesse ☐ autre ☐
MAP ☐ depuis le /__/__//__/__//__/__/__/__/
HTA mère ☐ RPDE>12H depuis le /__/__//__/__//__/__/__/__/
Autre en clair ☐

Médicaments pendant la grossesse

Anticonvulsivants	oui ☐	non ☐
Anxiolytiques/Antidépresseurs	oui ☐	non ☐
Insuline	oui ☐	non ☐
Médicaments thyroïde	oui ☐	non ☐
Indocid, AINS	oui ☐	non ☐
Antihypertenseurs	oui ☐	non ☐

Si oui, en clair

Tocolyse IV oui ☐ non ☐
Si oui, en clair

Tocolyse per os oui ☐ non ☐
Si oui, en clair

Corticothérapie à visée maturative pulmonaire

Nombre de cures complètes /__/__/ Nombre de cures incomplètes /__/__/

Antibiotiques reçus par la mère durant les 2 derniers mois de la grossesse

1ère Cure

Date du début de la prise d'ATB /__/__//__/__//__/__/__/__/
Durée du traitement en jours /__/__/
Type d'ATB /_____/

2ème Cure

Date du début de la prise d'ATB /__/__//__/__//__/__/__/__/
Durée du traitement en jours /__/__/
Type d'ATB /_____/

b. Pathologie fœtale pendant la grossesse

RCIU ☐ Oligoamnios ☐ Hydramnios ☐
Autre en clair ☐

3.2. TYPE DE GROSSESSE

Simple ☐ Gémellaire ☐ Triple ou + ☐ Monochoriale ☐ Bichoriale ☐

4. RENSEIGNEMENTS SUR L'ACCOUCHEMENT

Présentation Céphalique ☐ Siège ☐ Autre ☐

Déclenchement oui ☐ non ☐

Mode /__/ 1 Voie basse simple 2 Voie basse instrumentale 3 Césarienne

Césarienne avant travail oui ☐ non ☐

Césarienne en cours de travail oui ☐ non ☐

Durée du travail /__/__/(heures) /__/__/(minutes)

Aspect du liquide /__/
1 Clair 2 Teinté en début de travail 3 Teinté pendant le travail
4 Liquide hémorragique 5 Liquide nauséabond putride

Anomalie du RCF oui ☐ non ☐

Gestes en salle de naissance /__/__/

01 Pas de geste
02 Simple aspiration
03 Ventilation masque
04 Intubation
05 MCE
06 MCE + Adrénaline

Médicaments reçus par la mère pendant l'accouchement (autre que l'anesthésie)

Nature	Dose	Durée du traitement

Incidents survenus au cours de l'accouchement

---

5. RENSEIGNEMENTS SUR L'ENFANT A LA NAISSANCE

Date de naissance /__/__//__/__//__/__/__/__/
Terme en semaines /__/__/ SA /__/__/ jours
Sexe F ☐ M ☐
PC de naissance /__/__/cm
Poids de naissance /__/__/__/__/ g
Taille /__/__/ cm
APGAR à 1 minute /__/__/ APGAR à 5 minutes /__/__/

Dans les 12 premières heures de vie de l'enfant

BD maximum
☐ < ou =7.0
☐ de 7.1 à 9.9
☐ de 10 à 14.9
☐ > ou = 15

Minimum FiO_2
☐ < ou = 0.40
☐ de 0.41 à 0.60
☐ de 0.61 à 0.90
☐ de 0.91 à 1.00

Maximum FiO_2
☐ < ou = 0.40
☐ de 0.41 à 0.80
☐ de 0.81 à 0.90
☐ de 0.81 à 1.00

Taux d'acide lactique /_____/ mmol/l /__/__/ heures de vie

Nom /__/__/__/ **Prénom** /__/__/__/ **N° d'inclusion** /__/__/__/

6. SUIVI DE L'ENFANT AU COURS DE SON HOSPITALISATION

Date	Supplémentation	Nutrition Entérale		
	Nbre de supplémentations reçues	*Type de lait et Volume de lait reçu*		*Apport hydrique (ml/j)*
J0	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J1	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J2	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J3	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J4	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J5	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J6	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J7	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J8	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J9	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J10	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	
J11	1☐ 2☐ 3☐ 4☐	Lait pré /_____/ ml/j Lait maternel /_____/ ml/j Lait lactarium /_____/ ml/j	Autre lait n° /__/ /_____/ ml/j % d'enrichissement /____/ % d'enrichissement /____/	

Nom /__/__/__/ **Prénom** /__/__/__/ **N° d'inclusion** /__/__/__/

NB : Noter la taille et le périmètre crânien (PC) une fois par semaine.

Nutrition Parentérale			**Croissance**		
Apport glucidique (g/j)	*Apport lipidique (g/j)*	*Apport protidique (g/j)*	*Taille (cm)*	*Poids (kg)*	*PC (cm)*

La partie [J12……..J99] a été volontairement coupée.

Nom /__/__/__/ Prénom /__/__/__/ N° d'inclusion /__/__/__/

7. SUIVI DES PRELEVEMENTS

Date du début de la supplémentation (T0) : /__/__//__/__//__/__/__/__/

[1] : Noter uniquement la couleur et la consistance des selles prélevées (S_x)
[2] : Noter impérativement la durée des prélèvements d'urine en heures-minutes
[3] : Mettre une croix dans la case quand il y a des fuites d'urine durant le prélèvement (U_x), sinon laisser la case vide
[4] : Mettre une croix dans la case quand il y a présence d'un résidu durant le prélèvement (LG_x), sinon laisser la case vide
[5] *: Noter le numéro de l'échantillon prélevé (S_x pour les selles, U_x pour les urines et LG_x pour le liquide gastrique)*

		Selles		**Urines**			**Liquide Gastrique**	
T	**Date des prélèvements**	[5]*N°*	*Aspects*[1]	[5]*N°*	*Durée du prélèvement (heures-min)*[2]	*Fuite*[3]	[5]*N°*	*Présence d'un résidu*[4]
T0								
T…								
T…								
T7								
T…								
T…								
T14								
T…								
T…								
T21								
T…								
T…								
T28								
T…								
T…								
T35								
T…								
T…								
T42								
T…								
T…								
T49								
T…								
T…								
T56								
T…								
T…								

Nom /__/__/__/ **Prénom /__/__/__/** **N° d'inclusion /__/__/__/**

		Selles		Urines			Liquide Gastrique	
T	**Date des prélèvements**	*[5]N°*	*Aspects[1]*	*[5]N°*	*Durée du prélèvement (heures-min)[2]*	*Fuite[3]*	*[5]N°*	*Présence d'un résidu[4]*
T63								
T…								
T…								
T70								
T…								
T…								
T77								
T…								
T…								
T84								

8. SYNTHESE DE L'HOSPITALISATION

Date de sortie /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Modalité de sortie
☐ décès ☐ transfert vers autre néonat
☐ transfert vers autre institution
☐ transfert vers domicile

Poids de sortie /__/__/__/__/ g
PC de sortie /__/__/__/__/ cm
Taille /__/__/__/__/ cm

8.1. TROUBLES HEMODYNAMIQUES ET LEURS TRAITEMENTS

Début du traitement /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Fin du traitement /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Nature du traitement (noter les doses administrées)

8.2. INFECTIONS OU SUSPICIONS D'INFECTIONS TRAITEES

①
Germes impliqués dans l'infection ----------
Localisation des germes ----------
Nature et dose des antibiotiques reçus (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

②
Germes impliqués dans l'infection ----------
Localisation des germes ----------
Nature et dose des antibiotiques reçus (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

③
Germes impliqués dans l'infection ----------
Localisation des germes ----------
Nature et dose des antibiotiques reçus (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

④
Germes impliqués dans l'infection ----------
Localisation des germes ----------
Nature et dose des antibiotiques reçus (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

⑤
Germes impliqués dans l'infection ----------
Localisation des germes ----------
Nature et dose des antibiotiques reçus (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

8.3. CANAL ARTERIEL (CA)

Traitement Ibuprofen ☐ Chirurgie ☐

Ibuprofen

Dose reçue (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

Chirurgie

Date de l'intervention/__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Nature de l'intervention ----------

8.4. CORTICOTHERAPIE

1ère cure
Dose totale reçue (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

2ème cure
Dose totale reçue (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

3ème cure
Dose totale reçue (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

4ème cure
Dose totale reçue (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

5ème cure
Dose totale reçue (mg/kg) ----------
Date du début de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Date de la fin de l'administration /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/

8.5. PATHOLOGIES RESPIRATOIRES

DUREE DE LA VA SUR SONDE D'INTUBATION /__/__/ jours
DUREE DE LA CPAP NASALE /__/__/ jours
DUREE DE L'OXYGENOTHERAPIE /__/__/ jours

8.6. RECTORRAGIES ISOLEES oui ☐ non ☐

8.7. ECUN oui ☐ non ☐
(Définitions : Syndrome occlusif avec dans les selles, syndrome biologique inflammatoire, pneumatose RX-stade II-éventuellement compliquée d'une péritonite-stade III)

8.8. PERFORATIONS ISOLEES DU TUBE DIGESTIF oui ☐ non ☐

8.9. INTERVENTIONS CHIRURGICALES DIGESTIVES

Date de l'intervention /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Nature de l'intervention ----------

Date de l'intervention /__/__/ /__/__/ /__/__/__/__/
Nature de l'intervention ----------

8.10. AUTRES ----------

8.11. RETINOPATHIE DU PREMATURE stade /_____/

8.12. LESIONS CEREBRALES oui ☐ non☐ (pas de lésion, EEG normaux)

	Gauche	**Droit**
LPV kystiques	oui ☐ non ☐	oui ☐ non ☐
LPV non kystiques	oui ☐ non ☐	oui ☐ non ☐
HIV 2	oui ☐ non ☐	oui ☐ non ☐
HIV 3	oui ☐ non ☐	oui ☐ non ☐
HIV 4	oui ☐ non ☐	oui ☐ non ☐

RÉSUMÉ

Du fait de l'immaturité de ses grandes fonctions physiologiques, le prématuré est exposé à de multiples complications, notamment digestives. Le microbiote intestinal (MI) est capable de stimuler un grand nombre de fonctions intestinales de l'hôte, donc d'affecter l'homéostasie intestinale. Stérile *in utero,* le tractus digestif est colonisé à la naissance par de nombreux micro-organismes. Peu d'études se sont intéressées à l'implantation du MI chez le prématuré, or l'implantation anormale du MI chez le prématuré pourrait être responsable de pathologies digestives et constituer une gêne considérable à l'alimentation entérale. Dans cette population, la modulation du MI représente donc une stratégie thérapeutique intéressante. Nous avons voulu étudieré l'effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en probiotiques (*B. longum* BB536 et *L. rhamnosus* GG) chez le prématuré de très faible poids de naissance. Les résultats de notre étude ont montré que la supplémentation orale en probiotiques n'a pas 1) accéléré la maturation intestinale (excepté pour les enfants ayant un poids de naissance >1000g), ni 2) amélioré l'évolution clinique des enfants, ni 3) modifié la composition du MI (hormis la colonisation par les souches probiotiques), ni enfin 4) diminué les taux de la calprotectine fécale. Par ailleurs, en comparaison avec la culture et des techniques moléculaires établies, nous avons validé l'utilisation de la DHPLC comme nouvel outil de caractérisation du MI chez le prématuré. Dans cette population, peu de marqueurs d'inflammation et de fonction intestinale (FI) sont disponibles. Au cours de notre étude, nous avons établi la cinétique et les facteurs de variation de la calprotectine fécale (marqueur de l'inflammation intestinale). Enfin, la citrulline plasmatique (Cit_p), proposée chez l'adulte comme marqueur de FI ne peut pas être utilisée chez le prématuré pour des raisons éthiques. Nous avons voulu déterminer si la citrulline globulaire (Cit_g) et urinaire (Cit_u) pouvaient être des marqueurs de FI. Après développement d'une méthode de dosage en GCMS, nous avons montré chez l'adulte sain que, même si les valeurs de Cit_g et Cit_u varient dans le même sens que Cit_p, la Cit_u n'est probablement pas un reflet fidèle de la Cit_p. L'utilité de ce marqueur reste donc à établir chez le prématuré.

TITLE:

The gut in preterm infants : Modulation of the intestinal microbiota by probiotics, digestive and nutritional impact of probiotics, and the search for non invasive markers of intestinal function.

ABSTRACT :

As several physiological functions are immature in preterm infants, they are exposed to various complications, particularly in the gastrointestinal tract. The intestinal microbiota (MI) stimulates a range of important intestinal functions of the host and, may affect intestinal homeostasis. Sterile *in utero*, the digestive tract is colonized at birth by various microorganisms. Few studies have been performed in preterm infants to study the establishment of the MI. The impaired intestinal colonization process occurring in preterm infants may be responsible for digestive diseases, and constitute a major obstacle to enteral feeding. In that population, the modulation of the MI represents an attractive therapeutic approach. The aim of our study was to evaluate the digestive and nutritional effect of oral supplementation with probiotics (*B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* GG) in very low birth weight infants. We showed that the oral supplementation with probiotics did not 1) accelerate intestinal maturation (except for the infants weighing >1000g at birth), nor 2) improve the clinical evolution of infant, nor 3) modify the composition of the MI (except for the probiotic strains colonization), or 4) decrease the fecal calprotectin values. In addition, in comparison with culture and established molecular techniques, we validated the use of DHPLC as a new tool for monitoring the MI of preterm infants. In that population, few markers of intestinal inflammation and function are available. We determined the time course and the factors influencing the fecal excretion of calprotectin, a marker of intestinal inflammation. Finally, plasma citrulline (Cit_p), proposed in adults as an index of intestinal function can't be used in preterm infants for ethical reasons. We tried to determined whether red blood cell or urinary citrulline (Cit_{RBC} and Cit_u) can be markers of intestinal function. After validation of a new GCMS method, we reported in healthy adults that although the values of Cit_{RBC} and Cit_u varied in the same direction as Cit_p, Cit_u may not closely reflect Cit_p. So, the usefulness of this marker in preterm infants remains to be established.

Mots clés : nouveau-nés prématurés, nutrition, microbiote intestinal, probiotiques, culture, ADNr 16S, PCR, TTGE, DHPLC, inventaire moléculaire, GCMS, citrulline et calprotectine.

UNITE : INRA, UMR PHAN 1280 (Physiologie des Adaptations Nutritionnelles), Hôtel Dieu, 1er étage aile nord, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes cedex 01.