

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTE DE MÉDECINE

**ECOLE DOCTORALE : Biologie, médecine, santé**

Année 2013

N° 33

# ETUDE DES DETERMINANTS DE LA DERMATITE ATOPIQUE CHEZ LE NOUVEAU-NE PREMATURE ET A TERME.

## **THESE DE DOCTORAT**

Discipline : Biologie, médecine santé

Spécialité : Dermatologie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Sébastien BARBAROT**

*Le 31 octobre 2013, devant le jury ci-dessous*

Président:

Rapporteurs : Madame le Professeur Juliette MAZEREEUW-HAUTIER  
Monsieur le Professeur Gérard LORETTE

Examineurs : Monsieur le Professeur Jean-Philippe LACOUR  
Monsieur le Professeur Franck BORALEVI  
Monsieur le Professeur Jean-François STALDER  
Monsieur le Professeur Dominique DARMAUN  
Monsieur le Professeur Jean-Christophe ROZE

*Directeur de thèse:*

*Monsieur le Professeur Jean-Christophe ROZE*

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	4
<b>PRESENTATION GENERALE DES ETUDES</b> .....	7
Etude I : .....	7
Etude II et III : .....	8
<b>ETUDE I : PREVENTION DE LA DERMATITE ATOPIQUE PAR UN SYMBIOTIQUE CHEZ LE NOUVEAU-NE A TERME.</b> .....	10
INTRODUCTION .....	10
Hypothèse « hygiéniste».....	11
Microbiote intestinal et manifestations atopiques.....	12
Microbiome cutané et manifestations atopiques.....	16
Probiotiques, prebiotiques, symbiotiques .....	17
Objectifs de l'étude .....	20
PATIENTS ET METHODES .....	21
Population .....	21
Lait expérimental .....	21
RANDOMISATION, LAITS ET ADHESION THERAPEUTIQUE. ....	22
Paramètres cliniques.....	22
Paramètres biologiques .....	23
Analyses statistiques .....	24
RESULTATS.....	27
Analyse en intention-de-traiter.....	27
Analyse per protocole .....	33
DISCUSSION .....	34
CONCLUSION .....	42
Perspectives .....	42
<b>ETUDES II et III : Eudes des determinants de la dermatite atopique chez le nouveau né prématuré</b> .....	44
INTRODUCTION .....	44
PATIENTS ET METHODES .....	47
Populations et définitions .....	47
Données périnatales recueillies .....	52

Analyses statistiques .....	53
<b>RESULTATS</b> .....	55
Caractéristiques de la population étudiée .....	55
Association entre l'âge gestationnel et la proportion d'enfants atteints de dermatite atopique.....	59
Association entre âge gestationnel et asthme.....	63
Risque de dermatite atopique, âge gestationnel et caractéristiques des nouveau-nés .....	63
<b>DISCUSSION</b> .....	66
<b>CONCLUSION</b> .....	79
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	81
<b>REFERENCES</b> .....	83
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	93
<b>ANNEXES</b> .....	95
<b>ANNEXE 1 : ARTICLES ORIGINAUX</b> .....	95
An $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic supplemented v. a standard infant formula: a multicentre, double-blind, randomised trial.....	95
Lower risk of atopic dermatitis among infants born extremely preterm compared with higher gestational age...	101
<b>ANNEXE 2 : Synopsis étude REAL2</b> .....	108
<b>ANNEXE 3 : synopsis étude BACUP</b> .....	112

**L'atopie** est définie comme un terrain prédisposant à une réactivité immunologique anormale médiée par les IgE vis-à-vis de certains antigènes environnementaux qualifiés d'allergènes<sup>1</sup>. La prévalence des maladies associées à l'atopie (dermatite atopique, rhinite allergique, asthme allergique, allergie alimentaire) n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies partout dans le monde, avec aujourd'hui en Europe une prévalence cumulée de 15 à 30 % dans la population générale<sup>2</sup>. Les prévalences les plus élevées sont observées dans les pays industrialisés. Dans les pays en voie de développement, la prévalence de l'atopie augmente avec le niveau de vie<sup>2</sup>.

**La dermatite atopique (DA)** ou eczéma atopique est la plus fréquente et la plus précoce des manifestations cliniques associée à l'atopie<sup>3</sup>. La prévalence de la DA de l'enfant en Europe occidentale et aux Etats Unis est estimée à 10 à 15 %. Cette proportion a augmenté régulièrement depuis plusieurs décennies. Cependant, alors que la prévalence augmente rapidement dans les pays émergents, on observe depuis quelques années un plateau de prévalence dans les pays d'Europe du Nord à 20%. Ceci suggère que les facteurs environnementaux exercent dans ces pays une « pression » maximale sur les facteurs génétiques.

La maladie débute le plus souvent lors de la première année de vie et régresse spontanément dans la majorité des cas vers 5 ans. Elle peut cependant persister jusqu'à l'âge adulte chez environ 15% des malades. La DA est associée à l'asthme dans 30 % des cas. L'association de plusieurs manifestations atopiques chez un même malade est classique mais inconstant. Ces manifestations apparaissent habituellement dans l'ordre suivant : DA, allergie alimentaire, asthme, rhinite allergique et conjonctivite allergique. Cette succession temporelle est appelée « marche atopique ».

Une DA précoce et sévère est un facteur de risque d'asthme (OR = 3). Il n'est pas prouvé actuellement qu'une prise en charge précoce des premières manifestations atopiques permette de réduire le risque de développer les manifestations ultérieures.<sup>3-5</sup>

La DA se manifeste par des lésions cutanées inflammatoires prurigineuses plus ou moins étendues sur le corps, associées à une sécheresse cutanée<sup>4</sup>. Ces manifestations sont responsables d'un retentissement important sur la qualité de vie de l'enfant et de sa famille, mais également d'un surcoût notable en termes de soins et d'absentéisme parental au travail<sup>6,7</sup>.

### **Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la DA ne sont pas élucidés.**

*Sur le plan génétique*, la DA est une maladie polygénique complexe. Deux types de gènes semblent être impliqués : des gènes de la barrière épidermique (dont le gène de la filaggrine) et des gènes régulant le système immunitaire spécifique et inné. La concordance de la maladie est de 80% chez les jumeaux monozygotes et de 30% chez les dizygotes. L'augmentation de prévalence de la maladie en Europe et dans les pays émergents suggère un rôle majeur des facteurs d'environnements dans la physiopathologie de la maladie, même si ceux-ci ne sont pas encore clairement identifiés.

*Sur le plan environnemental*, deux phénomènes sont actuellement au centre de la recherche sur les déterminants potentiels précoces de la DA :

D'une part, le rôle des microorganismes (essentiellement bactériens) colonisant les barrières épithéliales du nouveau-né paraît crucial. Le microbiote digestif est l'ensemble des bactéries commensales colonisant le tube digestif humain. Ce microbiote, constitué de  $10^{18}$  bactéries, est un écosystème complexe ayant interagi en symbiose avec les mammifères au cours de l'évolution. La maturation du système immunitaire inné et adaptatif est notamment régulée par des interactions

précoces entre l'hôte et le microbiote digestif. La période néonatale est en effet capitale pour l'acquisition des mécanismes de tolérance immunitaire, notamment via l'acquisition d'un microbiote digestif diversifié<sup>8</sup>.

D'autre part, des données nombreuses et solides plaident pour un rôle majeur, dans les mécanismes précoces de la maladie, d'un défaut constitutionnel de la barrière cutanée entraînant une hyperperméabilité de la peau vis-à-vis de l'environnement extérieur.<sup>9-11</sup>

**Notre intérêt s'est porté sur ces deux phénomènes chez le nouveau-né** : nous avons étudié d'une part le rôle d'un symbiotique (produit contenant un probiotique et un prébiotique) dans la prévention de la DA chez le nouveau-né à terme en cherchant à mieux comprendre les ses mécanismes d'action (étude I). D'autre part, nous avons cherché à analyser les déterminants de la DA dans une population de nouveau-nés prématurés (études II et III).

Cette thèse repose sur trois études.

### ETUDE I :

Si la prise en charge de la dermatite atopique a été améliorée ces dernières années notamment par l'utilisation de traitements topiques, il n'existe néanmoins à ce jour aucun traitement préventif validé chez les sujets à risque<sup>3</sup>. De nombreuses études ont cherché à évaluer l'efficacité des probiotiques dans la prévention de la DA mais peu ont évalué l'intérêt des symbiotiques dans cette indication. De même, il y a peu de donnée concernant les relations entre la colonisation bactérienne intestinale induite par les symbiotiques dans les premiers mois de vie, la maturation immunitaire muqueuse traduite par la concentration des selles en IgA et le risque de DA. Nous avons cherché à étudier ces paramètres dans un essai randomisé ayant pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un lait contenant un symbiotique sur la croissance et le risque de DA chez les nouveau-nés à terme.

Cette étude a fait l'objet de la publication suivante :

**Rozé JC, Barbarot S, Butel MJ, Kapel N, Waligora-Dupriet AJ, De Montgolfier I, Leblanc M, Godon N, Soulaines P, Darmaun D, Rivero M, Dupont C. An  $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic supplemented v. a standard infant formula: a multicentre, double-blind, randomised trial. *Br J Nutr.* 2011 ;14:1-7.**

Nous nous sommes intéressés aux déterminants de la DA dans une population spécifique : celle des nouveau-nés prématurés. Ces nouveau-nés ont un environnement périnatal très particulier, différent des nouveau-nés à terme. Notamment, leur microbiote digestif est peu varié par rapport aux enfants nés à terme et d'autre part, leur barrière cutanée et leur système immunitaire sont fonctionnellement immatures pendant plusieurs semaines après la naissance. Les données de la littérature concernant le risque de DA chez les prématurés sont contradictoires. Ainsi, l'étude des facteurs de risque de DA dans cette population nous a paru être un modèle intéressant et peu étudié, propice à une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie. Il nous a notamment semblé utile de mieux évaluer l'influence de l'âge gestationnel sur le risque de DA au sein de cette population car celui-ci influence la maturation de la fonction barrière cutanée et la maturation du système immunitaire. Nous avons ainsi évalué l'influence de l'âge gestationnel et de plusieurs facteurs périnataux sur le risque de DA dans une large cohorte nationale d'enfants prématurés (cohorte EPIPAGE, étude II). Par la suite, nous avons analysé les données d'une seconde cohorte régionale, indépendante, afin de valider nos résultats (cohorte LIFT, étude III)

Ces 2 études ont fait l'objet de la publication commune suivante:

**Barbarot S, Gras-Leguen C, Colas H, Garrot E, Darmaun D, Larroque B, Roze JC, Ancel PY. Lower risk of atopic dermatitis among infants born extremely preterm compared with higher gestational age. *Br J Dermatol* 2013 *in press***

**En perspective**, ces études sont associées à deux projets de recherche à venir :

**L'étude I** a pour perspective un projet d'étude ayant pour objectif d'analyser le lien entre la fonction barrière cutanée mesurée par la perte transépidermique en eau et l'âge gestationnel chez les nouveau-nés prématurés. Cette étude (BACUP : BArrière CUtané du nouveau-né Prématuré) est promue par le CHU de NANTES, sera réalisé au sein du CIC mère-enfant et est financée. Elle débutera en 2014 (cf. Annexe 3).

**Les études II et III** ont pour perspective un projet académique d'essai randomisé versus placebo bi centrique Nantes-Angers ayant pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un probiotique sur la survenue d'une DA à deux ans chez l'enfant à risque et de déterminer la période optimale d'utilisation en période périnatale (essai REAL 2, en recherche de financement) (cf. Annexe 2)

## ETUDE I : PREVENTION DE LA DERMATITE ATOPIQUE PAR UN SYMBIOTIQUE CHEZ LE NOUVEAU-NE A TERME.

Essai randomisé multicentrique en double aveugle évaluant l'efficacité d'un lait contenant un symbiotique et enrichi en alpha-lactalbumine versus lait standard sur la croissance des nouveau-nés à terme et sur le risque de dermatite atopique à 6 mois.

### INTRODUCTION

La physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques et des maladies allergiques fait intervenir des relations complexes entre des facteurs génétiques et environnementaux.

L'augmentation rapide de la prévalence de ces maladies dans les pays occidentaux depuis une trentaine d'année a souligné l'importance des facteurs environnementaux<sup>2</sup>. Parmi ces facteurs, le rôle des bactéries colonisant le tube digestif (microbiote digestif) après la naissance est majeur. En effet, la maturation du système immunitaire humain est stimulée et orientée dès la période néonatale par le contact des épithéliums digestifs et bronchique avec des micro-organismes commensaux<sup>12-14</sup><sup>15</sup>. Cette « programmation » précoce du système immunitaire des nouveau-nés par le microbiote intestinal est susceptible de modifier le risque de développer des maladies auto-immunes, inflammatoires et allergiques.

L'« hypothèse hygiéniste », proposée à la fin des années 80 à partir de données épidémiologiques, suggérait qu'une sur exposition à des infections variées au début de la vie, favorisée par la promiscuité (mode de garde collectif ou familles nombreuses), protégeait du risque de développer certaines maladies atopiques comme l'asthme <sup>16</sup>.

Ce modèle a été affiné ces dernières années grâce à un ensemble de nouvelles données épidémiologiques et fondamentales (provenant essentiellement d'études sur des modèles animaux)<sup>17</sup>.

De nombreuses études épidémiologiques ont tout d'abord confirmé que le mode de vie de type « occidental urbain » exposait à un risque accru de maladies atopiques (variables selon les études) par rapport au mode de vie de type « rural ». En particulier, des études ont montré que des populations génétiquement homogènes et géographiquement proches mais dont l'une avait un mode de vie « occidental urbain » et l'autre un mode de vie de type « rural » avaient des prévalences de phénotypes allergiques différents<sup>18 19</sup>. Le lien entre mode de vie et risque d'allergies a été renforcé par le fait que la prévalence des phénotypes allergiques dans les deux populations se rejoignait quand la population au mode vie rural accédait au mode de vie « occidental urbain ».

Pour expliquer ces constatations, des études ont cherché à évaluer la responsabilité de plusieurs facteurs environnementaux (alimentation, pratiques d'hygiène, nombre d'épisodes infectieux, utilisation d'antibiotiques, exposition aux microorganismes environnementaux, diversité du microbiote intestinal, pollution atmosphérique...) dans une éventuelle relation causale. CES études sont d'interprétation difficile car d'une part, les résultats sont différents en fonction des manifestations atopiques étudiées (asthmes, DA, sensibilisation IgE) et d'autre part les études sont souvent exposées au biais protopathique. Néanmoins, l'exposition aux endotoxines provenant de

microorganismes environnementaux a été régulièrement associée à une réduction du risque de maladies atopiques. Cette constatation a été particulièrement bien établie pour l'asthme et la sensibilisation IgE chez les enfants élevés dans une ferme avec des animaux domestiques divers.<sup>20</sup>

Concernant la DA, il n'y a pas d'arguments épidémiologiques convaincant pour une responsabilité directe des épisodes infectieux bactériens ou viraux, de l'alimentation au sein, des vaccinations ou de la pollution dans le risque de développer la maladie. En revanche, l'utilisation répétée d'antibiotiques à large spectre chez le nourrisson, les infections parasitaires, l'exposition intense et précoce aux endotoxines bactériennes dans la petite enfance et aux chiens sont associés au risque de développer la maladie<sup>21</sup>.

---

#### MICROBIOTE INTESTINAL ET MANIFESTATIONS ATOPIQUES

La relation entre diversité du microbiote intestinal et risque de manifestations atopiques a été récemment largement étudiée.

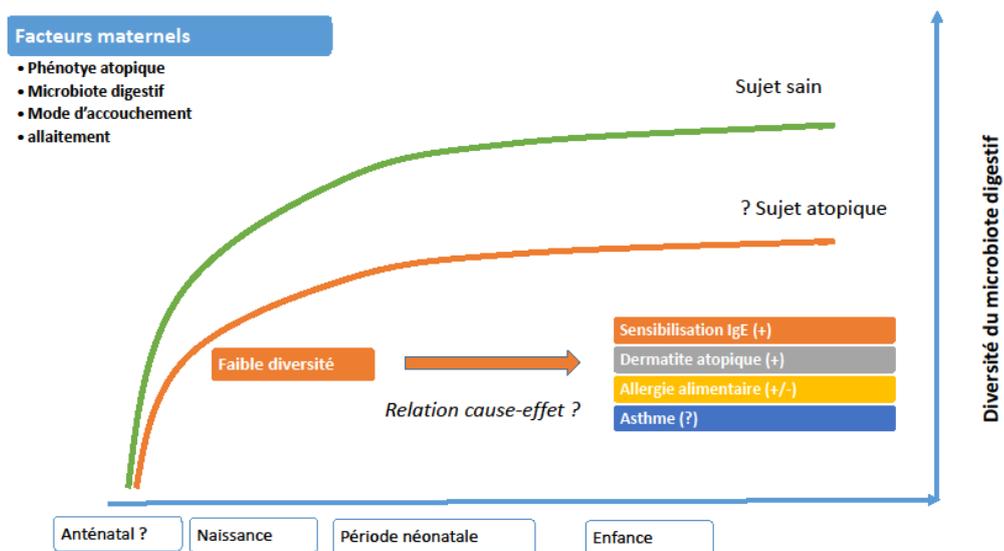
Chez l'homme, la majorité des études montre qu'il existe des différences entre le contenu du microbiote intestinal des nouveau-nés à risque atopique et celui des nouveau-nés non à risque<sup>8</sup>. Des études anciennes utilisant des méthodes d'identification par culture bactérienne ont montré que le microbiote des nouveau-nés qui développeront une DA est moins diversifié que celui des nouveau-nés qui ne développeront pas de DA<sup>22-24</sup>. Néanmoins, une étude européenne regroupant les données de trois cohortes n'a pas retrouvé ces résultats<sup>25</sup>. De plus, ces études ont montré que le microbiote digestif des nouveau-nés à risque de DA est souvent plus pauvre en bactérie de type *Lactobacillus* et bifidobactéries et plus souvent colonisé par des bactéries de type *Clostridia*, *E. Coli* et *Staphylocoque*

*aureus*. Des études plus récentes utilisant des méthodes d'identification moléculaires ont pour la plupart confirmé ces données<sup>26-31</sup>. Cette anomalie de diversification précoce du microbiote intestinal (*dysbiose* intestinale) chez les enfants à risque atopique semble persister pendant plusieurs mois voire un an. De même, chez les nouveau-nés à risque d'atopie, la diversité du microbiote intestinal en période néonatale est plus faible chez ceux qui développeront une DA à un an par rapport à ceux qui ne développeront pas une DA<sup>32</sup>. Même si la relation de causalité est encore incertaine, la dysbiose intestinale précède l'apparition des maladies atopiques dans plusieurs études longitudinales, ce qui suggère un rôle causal potentiel<sup>22 23 31 32</sup>.

Ainsi, la présence de certaines souches bactériennes dans le microbiote intestinal des enfants pendant la première année de vie pourraient influencer le risque de développer des manifestations atopiques. Néanmoins, aucune souche bactérienne n'a été spécifiquement associée à cet effet potentiel, ainsi, il semble que la diversité bactérienne du microbiote soit en elle-même le facteur prédominant.

A partir de la naissance, le tube digestif du nouveau-né est colonisé par des bactéries diverses provenant essentiellement du microbiome de la mère. La diversité du microbiote digestif se constitue ainsi progressivement durant les 3 premières années de vie mais la période néonatale est une étape cruciale. Cette diversité dépend de plusieurs facteurs périnataux dont certains sont liés à l'hôte (pH, enzymes pancréatiques, composition du mucus..) et d'autres non liés à l'hôte. Parmi ceux-ci, le mode d'accouchement semble jouer un rôle majeur. En effet, même si les résultats des études sont parfois contradictoires, l'accouchement par césarienne est associé à une plus faible diversité du microbiome intestinal du nouveau-né marqué en particulier par une prédominance de bactéries de type Clostridia et par une faible abondance de bactéries de type lactobacilles, bifidobactéries et *bacteroides*. Une étude récente a mis en évidence que le microbiote intestinal des enfants nés par

césarienne était proche du microbiome cutané de la mère alors que le microbiote intestinal des enfants nés par voie basse était proche du microbiome vaginal de la mère<sup>33</sup>. D'autres facteurs non liés à l'hôte sont connus : la taille de la fratrie (le microbiote intestinal est plus diversifié dans les fratries plus nombreuses), le mode d'alimentation du nouveau-né (l'allaitement maternel favorise une plus grande diversité du microbiote intestinal) et les antécédents maternels d'atopie<sup>8 30</sup>. L'implication de ce dernier facteur suggère que le « statut atopique » de la mère est susceptible d'influencer le contenu du microbiote digestif du nouveau-né. Des études très récentes utilisant des méthodes de détection bactérienne par pyrosequençage de l'ARN ribosomal 16S ont en effet montré qu'en réalité le méconium n'était pas stérile à la naissance<sup>34</sup>. Le microbiote du méconium semble ainsi débiter sa constitution pendant la vie intra-utérine via la circulation sanguine maternelle et est influencée par les antécédents de la mère ainsi que par son alimentation (**Figure 1**).



**Figure 1 : Influence des facteurs maternels sur la diversité du microbiote digestif des enfants non atopiques (en vert) et des enfants atopiques (en orange) et relation avec le risque de manifestations atopiques (d'après<sup>8</sup>).**

Un certain nombre des facteurs influençant le contenu du microbiote digestif du nouveau-né sont ainsi associés au « mode de vie ». De ce fait, à l'instar des résultats portant sur la prévalence de l'atopie<sup>18</sup>, il a été mis en évidence des variations nettes entre le contenu du microbiote digestif néonatal de populations géographiquement et génétiquement proche mais au mode de vie différent<sup>35</sup>.

Enfin, l'étude de modèles animaux a montré que la reconstitution du microbiote digestif de rats transgéniques *germ-free* par une souche de bactérie du type *Bifidobacterium infantis* permettait d'induire une tolérance orale aux allergènes<sup>36</sup>. L'acquisition de tolérance obtenue par l'administration de ce probiotique n'était pas seulement observée localement, au niveau du tube digestif, mais aussi au niveau de l'épithélium bronchique. De plus, pour être efficace, cette restauration du microbiote digestif devait être réalisée pendant la période néonatale et non à l'âge adulte.

---

#### MICROBIOME CUTANE ET MANIFESTATIONS ATOPIQUES

La relation entre la diversité du microbiome cutané de l'enfant et le risque de maladies atopiques a été moins étudiée. Le microbiome cutané du nouveau-né semble se constituer progressivement après la naissance à partir du microbiome de la mère mais probablement également à partir de sources exogènes (contacts humain lors de la manipulation de l'enfant). Initialement, le microbiome cutané d'un nouveau-né ne semble pas différent en termes de type de souches bactériennes du microbiote intestinal. L'hétérogénéité du contenu des deux microbiomes semble être acquise pendant les premières semaines de vie mais les données manquent pour évaluer ce

phénomène<sup>33</sup>. Des données récentes suggèrent que les bactéries commensales cutanées interagissent activement avec le système immunitaire inné chez la souris en activant des populations de cellules régulatrices, notamment via la production locale d'IL-1<sup>37</sup>. Comme pour le microbiote intestinal, il semble exister des différences entre le microbiome cutané des enfants atopiques et celui des enfants non atopiques. En effet, la diversité du microbiome cutané d'enfants atteints de DA en poussée est plus faible que celle d'enfants contrôles et que celle d'enfants atteints de DA en phase de rémission<sup>38</sup>. Enfin, dans une étude finlandaise récente réalisée chez des adolescents, une plus grande biodiversité environnementale végétale et animale (en milieu rural vs urbain) était très significativement associée à une plus grande diversité du microbiome cutané (notamment à la présence de bactéries gram-négatives de type *Acinetobacter*) et à une diminution du risque d'atopie<sup>39</sup>.

L'ensemble de ces données suggère une nouvelle « théorie de la biodiversité » qui associe biodiversité environnementale, diversité des différents microbiomes de l'homme et risque atopique. Ce modèle pourrait être l'évolution de l'ancienne « théorie de l'hygiène ».

---

#### PROBIOTIQUES, PREBIOTIQUES, SYMBIOTIQUES

L'organisation mondiale de la Santé définit les probiotiques comme « des microorganismes vivants qui administrés en quantité adaptée, sont susceptibles d'induire un effet bénéfique pour la santé de l'hôte ». Les deux souches de probiotiques les plus étudiées sont des bactéries appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Considérant l'association entre faible diversité du microbiote intestinal et risque de maladies atopique, l'administration de certains microorganismes tels que les probiotiques est un moyen possible de prévention primaire et secondaire de ces maladies.

Les prébiotiques sont des substances non digestibles qui agissent en stimulant la croissance et/ou l'activité d'un ou plusieurs type de bactéries commensales du colon, susceptibles de ce fait d'induire un effet bénéfique pour la santé de l'hôte<sup>40</sup>. Les prébiotiques sont constitués en particulier de sucres tels que des fructo-oligosaccharides (FOS) ou des galacto-oligosaccharides (GOS). Ces sucres induisent la croissance des bifidobactéries dans le colon.

Les symbiotiques sont un mélange de probiotiques et de symbiotiques en proportion variable. Théoriquement, les symbiotiques sont susceptibles d'être plus efficaces que les probiotiques ou les prébiotiques seuls. Ainsi, chez la souris allergique aux protéines du lait de vache, l'administration d'un symbiotique comprenant des bactéries de type *Bifidobacterium breve*, un mélange de GOS à chaîne courtes (90%) et de FOS à longue chaîne (10%) (Immunofortis®) réduit l'incidence des manifestations allergiques plus efficacement que le probiotique ou le prébiotique seul<sup>41</sup>.

Depuis la première publication rapportant un effet préventif des probiotiques sur la DA en 2001,<sup>42</sup> de nombreux essais randomisés ont été publiés portant sur l'administration de probiotiques, de prébiotiques ou de symbiotiques avec des résultats parfois discordant<sup>42-56</sup>.

Ainsi, actuellement, les sociétés savantes Européennes considèrent qu'il n'y a pas de preuves suffisantes pour recommander l'utilisation systématique de lait artificiel contenant des probiotiques, des prébiotiques ou des symbiotiques chez les nouveau-nés en population générale<sup>57</sup>.

En particulier, l'évaluation de l'efficacité des symbiotiques dans la prévention de la DA nécessite des études supplémentaires. En effet, une seule étude a évalué l'efficacité d'un symbiotique sur le risque de DA<sup>48</sup>. Cette étude a mis en évidence une diminution du risque de DA à deux ans dans le groupe expérimental (OR 0.66; IC 95%, 0,46-0,95; P = 0.025).

Sur le plan physiopathologique, l'administration de probiotiques semblent induire, entre autres phénomènes, une hyper production d'IgA sécrétoires fécales. Cette hyper sécrétion d'IgA fécales a été associée à une diminution du risque de DA chez les nouveau-nés à terme<sup>58 59</sup> et chez les prématurés<sup>60</sup>. Toutefois, ces résultats n'ont pas été constamment rapportés et méritent d'être confirmés<sup>61</sup>.

L'alimentation au lait maternel est recommandée pendant les six premiers mois de vie (*World Health Organization (2003). Global Strategy for Infant and Young Children Feeding. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 30pp. WHO 2003*).

Les laits artificiels sont des substituts au lait maternel utilisés pour alimenter les nouveau-nés de femmes ne souhaitant pas ou dans l'incapacité d'allaiter. Le contenu des laits artificiels tend à se rapprocher de celui du lait maternel. En particulier, la concentration en protéines du lait artificiel doit rester proche de celle du lait maternel. En effet, une concentration élevée en protéines du lait artificiel expose les nouveau-nés à une prise de poids trop rapide.

L' $\alpha$ -lactalbumine est la principale protéine du lait maternel, riche en acides aminés essentiels comme le tryptophane. Le taux d' $\alpha$ -lactalbumine du lait artificiel standard est faible. La technique d'adjonction d' $\alpha$ -lactalbumine dans le lait artificiel permet d'augmenter la concentration en acides aminés sans augmenter la concentration en protéines mais aussi d'en améliorer la tolérance gastro-intestinale.<sup>62 63</sup>

---

#### OBJECTIFS DE L'ETUDE

Nous avons réalisé un essai randomisé ayant pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un lait artificiel contenant un symbiotique et enrichi en  $\alpha$ -lactalbumine sur la croissance de l'enfant, la tolérance gastro-intestinale et la survenue d'une DA à 6 mois. De plus, nous avons étudié la relation entre le risque de DA, l'évolution du microbiote intestinal et la production d'IgA fécales à 1 mois et 6 mois.



---

POPULATION

Il s'agissait d'une étude multicentrique. Quatre centres ont participé à l'étude (Hôpital Mère-Enfant, CHU de Nantes, CHU d'Angers, Hôpital Saint Vincent de Paul et Hôpital de la Pitié Salpêtrière, APHP, Paris). L'étude a suivi les recommandations de la déclaration d'Helsinki et a été approuvé par le Comité de Protection des Personnes de Nantes.

Le consentement écrit des parents était recueilli avant chaque inclusion.

Les patients éligibles étaient des nouveau-nés à terme exclusivement nourris au lait artificiel depuis la naissance et âgés de moins de 3 jours à la date d'inclusion.

---

LAIT EXPERIMENTAL

Le lait expérimental était constitué d'un lait standard dans lequel un symbiotique était ajouté. Le symbiotique était constitué de deux souches de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* LCS- 742 and *Bifidobacterium longum subsp infantis* M63) et d'un prébiotique (GOS : 96 % et FOS à chaînes courtes : 4 %).

Ce lait était enrichi en  $\alpha$ -lactalbumine bovine. L'  $\alpha$ -lactalbumine était obtenue à partir d'un lait concentré en protéines élaboré par une technique d'ultrafiltration.

Après l'inclusion, les enfants étaient randomisés en deux groupes : le groupe lait contrôle et le groupe lait expérimental (**Tableau I**). La randomisation était automatiquement générée par un logiciel informatique qui assignait à chaque lot de lait un numéro. Ce numéro figurait dans le dossier source du patient. Une enveloppe scellée contenant le type de lait attribué à chaque patient était envoyée à l'investigateur et au coordinateur et pouvait être ouverte en cas de besoin (événement indésirable grave ou autre événement). Dans ce cas, la cause de la levée d'aveugle était consignée et l'enfant était sorti de l'étude.

Les parents recevaient des boîtes contenant les flacons de lait expérimental ou contrôle.

Il s'agissait d'une étude en double insu.

L'étude se terminait à 6 mois.

L'adhésion thérapeutique était évaluée par le nombre de flacons vides retourné à chaque visite et par un interrogatoire des parents portant sur un éventuel changement de lait entre les visites (**Figure 2**).

---

#### PARAMETRES CLINIQUES

Les mensurations des nouveau-nés (poids, taille, périmètre crânien, indice de masse corporelle) étaient recueillies à la naissance.

Deux visites étaient programmées : à un et six mois. Les données suivantes étaient recueillies à chaque visite : mensurations, examen cutané, qualité du sommeil et bien être général par des interviews standardisées<sup>64</sup>. Les données concernant la fréquence et la consistance des selles durant

les trois jours précédant la visite étaient recueillies par l'interrogatoire et par l'analyse du journal patient.

Les critères de l'UK Working Party étaient utilisés pour porter le diagnostic de DA<sup>65</sup> et la sévérité de la maladie était évaluée par le SCORAD<sup>66</sup>.

Les abaques des courbes staturo-pondérales de l'OMS étaient utilisés pour calculer le Z-score selon la méthode LMS<sup>67</sup>.

---

#### PARAMETRES BIOLOGIQUES

Des prélèvements de selles étaient recueillis par les parents à un et six mois dans les deux centres Parisiens. Les prélèvements étaient placés immédiatement en atmosphère stérile et anaérobie (GENbag anaer®- bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et envoyés au laboratoire pour analyse bactériologique. Les prélèvements étaient congelés dès réception à -80°C.

L'analyse quantitative et qualitative des souches bactériennes présentes dans les selles était réalisées par dilution progressive sur différents supports selon la méthodologie décrite dans une publication antérieure<sup>68</sup>.

Les souches de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* étaient mises en évidence par l'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques des colonies, par méthode PCR utilisant différents *primers* spécifiques de genre et d'espèce et par la méthode de séquençage de l'ARN ribosomique 16S (Genome express, Meylan, France), comme décrit précédemment<sup>69</sup>.

Le dosage des IgA fécales était réalisé par méthode ELISA (Maxisorp F96, Roskilde, Denmark) (voir Annexe1).

---

#### ANALYSES STATISTIQUES

Le critère de jugement principal était le poids de l'enfant à 6 mois. Il s'agissait d'une étude de non-infériorité: une différence de 300 grammes sur la mesure du critère de jugement principal entre les deux groupes était considérée comme acceptable.

Dans ces conditions, un effectif de 45 enfants dans chaque groupe permettait de mettre en évidence une différence entre les groupes avec une puissance de 80% et un risque alpha de 5%.

Les écarts types et les Z-scores des mensurations étaient calculés en utilisant les abaques des courbes staturo-pondérales de l'OMS. Les résultats étaient analysés en intention de traiter et une analyse per-protocole était réalisée en complément. L'analyse statistique était réalisée par le logiciel SPSS 15.0 (Chicago, USA).

Les tests de Student ou de Mann-Whitney étaient utilisés pour comparer les variables continues. Les tests du Chi-deux ou de Fisher étaient utilisés pour comparer les variables catégorielles. Une courbe de ROC était utilisée pour analyser la relation entre la concentration d'IgA fécales à 1 et 6 mois et la DA à 6 mois. Une méthode de régression logistique était utilisée pour analyser la relation entre le type de lait utilisé et la DA après ajustement sur les antécédents familiaux d'atopie et le mode d'accouchement.

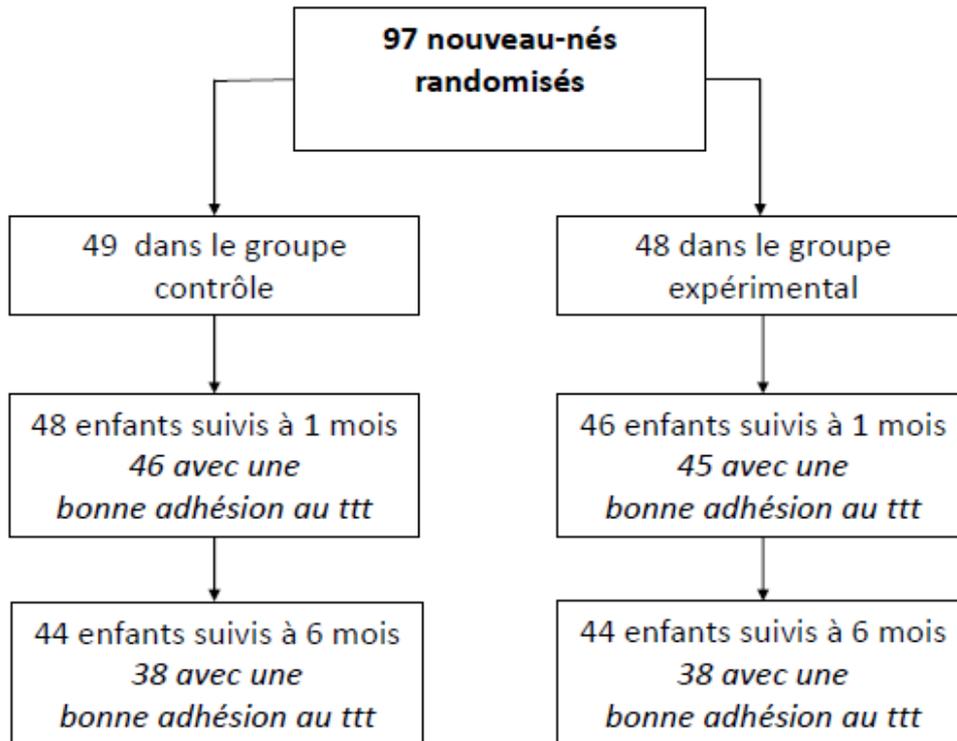


Figure 2 : Flow chart de l'étude

**Tableau I : Composition des laits contrôle et expérimental**

		<b>Lait contrôle</b>	<b>Lait expérimental</b>
		<b>pour 100mL</b>	<b>pour 100mL</b>
<b>Calories</b>	<b>kcal</b>	<b>72</b>	<b>68</b>
<b>Protéines</b>	<b>g</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>
Caséine	%	50	40
protéines	%	50	60
α-lactalbumine	g	-	0.3
<b>Glucides</b>	<b>g</b>	<b>8.9</b>	<b>7.6</b>
Lactose	g	6.3	5.3
Maltodextrine	g	2.6	2.3
<b>Lipides</b>	<b>g</b>	<b>3.4</b>	<b>3.5</b>
Acide Linoléique	mg	550	540
Acide α-linoléique	mg	51	53
Acide Arachidonique	mg	-	12.6
Acide Docosahexaenoique	mg	-	7
<b>Symbiotiques</b>		-	
FOS	g	-	0.02
GOS	g	-	0.40
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LCS-742	CFU	-	1.4x10 <sup>8</sup>
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp <i>infantis</i> M63	CFU		1.4x10 <sup>8</sup>

FOS: fructo-oligosaccharides. GOS :galacto-oligosaccharides. CFU: colony forming unit

ANALYSE EN INTENTION-DE-TRAITER

A la naissance, 97 enfants étaient randomisés en deux groupes. Le groupe contrôle comprenait 49 enfants et le groupe expérimental 48 enfants. Il n’y avait pas de différence entre les caractéristiques des deux groupes à l’inclusion (**Tableau II**)

**Tableau II : Caractéristiques des nouveau-nés à l’inclusion**

	<b>Groupe contrôle</b>		<b>Groupe expérimental</b>		<i>P</i>
	n=49		n=48		
<b>Caractéristiques périnatales</b>					
Sexe féminin	19	(38.8)	27	(66.3)	0.09
Antibiothérapie chez la mère, n (%)	8	(16.3)	5	(10.4)	0.40
Antécédents d’atopie, n (%)	25	(51.0)	18	(37.5)	0.18
Age gestationnel (semaines), Moyenne (SD)	39.3	(1.1)	39.4	(1.2)	0.85
<b>Mensurations</b>					
Poids (g), moyenne (SD)	3350	(440)	3300	(390)	0.66
Poids Z-score, moyenne (SD)	0.1	(0.9)	0.0	(0.8)	0.89
Taille (cm), moyenne (SD)	49.6	(1.8)	49.3	(1,9)	0.52
Taille Z-score, moyenne (SD)	0.0	(0.9)	-0.1	(1.0)	0.75
Périmètre crânien (cm), moyenne (SD)	34.7	(1.2)	34.4	(1,2)	0.26
Périmètre crânien Z-score, moyenne (SD)	0.3	(0.9)	0.2	(1.0)	0.49

### **A 1 mois (Tableau III),**

Quarante-six /48 enfants ont été évalués dans le groupe expérimental et 48 /49 enfants dans le groupe contrôle (cf. Fig. 1).

La croissance staturo-pondérale n'était pas significativement différente dans les deux groupes.

Les enfants exprimaient moins de pleurs et avaient moins de comportement d'agitation dans le groupe expérimental par rapport au groupe contrôle ( $p=0,03$ ).

Il n'y avait pas d'autres différences cliniques entre les deux groupes, en particulier le nombre d'enfants ayant une DA n'était pas significativement différent.

Les selles de 23 enfants dans le groupe contrôle et de 20 enfants dans le groupe expérimental ont été analysées. Les selles des enfants du groupe contrôle étaient plus souvent colonisées par des souches de staphylocoques ( $p=0,02$ ). Les selles des enfants du groupe expérimental étaient plus souvent colonisées par des souches de *lactobacillus* ( $p<0,001$ ).

### **A 6 mois (Tableau IV),**

Trente-neuf /48 enfants ont été évalués dans le groupe expérimental et 44 /49 enfants dans le groupe contrôle (fig1).

Le poids n'était pas significativement différent entre les deux groupes d'enfants, malgré une tendance vers un poids et un périmètre crânien supérieur pour l'âge dans le groupe expérimental (Z-score).

Le taux de DA était plus faible dans le groupe expérimental ( $p < 0,05$ ). Après ajustement sur les antécédents familiaux d'atopie et le mode d'accouchement, l'association tendait vers la significativité : OR : 0,12 (IC 95% 0,02-1,04 ;  $p = 0,05$ ). Toutefois la gravité de la maladie n'était pas significativement différente dans les deux groupes ( $p = 0,40$ ) (données non présentées).

Les selles des enfants du groupe contrôle étaient plus souvent colonisées par des souches de staphylocoques ( $p = 0,02$ ) et la concentration des selles en staphylocoques était plus élevée que dans le groupe expérimental ( $1.4 \pm 2.6$  versus  $3.9 \pm 2.9$  CFU/g de selles). La concentration des selles en *lactobacillus* et *bifidobacteria* tendait à être plus élevée dans le groupe expérimental par rapport au groupe contrôle (respectivement  $6.8 \pm 2.9$  versus  $5.0 \pm 2.4$  CFU/g de selles,  $p = 0.06$  et  $10.6 \pm 0.3$  versus  $9.0 \pm 3.3$  CFU/g de selles,  $p = 0.07$ ).

La concentration des selles en IgA évoluaient différemment dans les deux groupes :

Dans le groupe expérimental, la concentration en IgA fécales était aussi élevée à 1 mois qu'à 6 mois.

Dans le groupe contrôle, le taux d'IgA fécales diminuait entre 1 mois et 6 mois. Cette diminution était significativement associée à la DA à 6 mois (**Fig. 3**).

De plus, l'association entre le taux de colonisation par *bifidobacteria* et une diminution du risque de DA tendait vers la significativité (OR 0,60 par log CFU (IC95% ; 0,34-1,07))

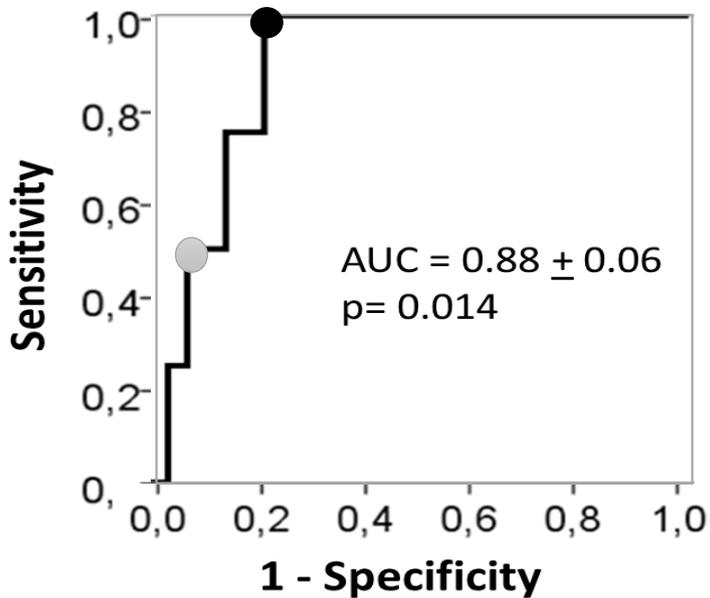
**Tableau III : Résultats à 1 mois (analyse en intention-de-traiter)**

	Groupe contrôle		Groupe expérimental		P
<b>Un mois</b>	n=45		n=43		
<b>Mensurations</b>					
Poids (g), moy. (SD)	4390.4	(624.7)	4307.7	(475.0)	0.515
Poids Z-score, moy. (SD)	-0.1599	(0.774)	-	(0.665)	0.991
			0.1577		
taille (cm), moy. (SD)	53.73	(2.06)	53.78	(2.02)	0.917
Poids Z-score, moy. (SD)	-0.4731	(0.863)	-	(0.853)	0.395
			0.3166		
Périmètre crânien (cm), moy. (SD)	37.70	(1.28)	37.32	(1,30)	0.170
Périmètre crânien Z-score, moy (SD)	0.4649	(0.8968)	0.2774	(0.8662)	0.322
<b>Tolérance Gastro-intestinale et dermatite atopique</b>					
Volume ingéré journalier (ml), moy. (SD)	597	(110)	580	(114)	0.59
Nombre de régurgitations par jour (n), moy. (SD)	0.9	(1.4)	1.0	(1.2)	0.80
Nombre de selles par jour (n), moy. (SD)	1.5	(1.0)	2	(1.1)	0.05
Durée des pleurs et périodes d'agitation (min), moy. (SD)	89.3	(33.2)	75.6	(22.3)	<b>0.03</b>
Durée de la période de suçage de pouce (min), moy. (SD)	190.0	(42.8)	214.6	(38.8)	<b>0.03</b>
Atopic dermatitis, n (%)	5	(11.1)	2	(4.7)	0.435
<b>Analyse de selles</b>					
	n=23		n=20		
IgA (µg/g), moy. (SD)	1620	(1137)	1892	(1635)	0.53
Colonisation par <i>Staphylococci</i> , n (%)	20	(87.0)	11	(55.0)	<b>0.02</b>
Colonisation par <i>Clostridium</i> , n (%)	16	(69.6)	14	(70.0)	0.97
Colonisation par <i>Bacteroides</i> , n (%)	13	(56.5)	8	(40.0)	0.82
Colonisation par lactobacilli, n (%)	23	(100.0)	19	(95.0)	0.93*
Colonisation par bifidobacteria, n (%)	17	(73.9)	19	(95.0)	0.14*

\*Test de Fisher

**Tableau IV : Résultats à 6 mois (analyse en intention-de-traiter)**

	Groupe contrôle		Groupe expérimental		P
<b>Six mois</b>	n=45		n=39		
<b>Mensurations</b>					
Poids (g), moy. (SD)	7769.8	(918.1)	8015.7	(834.7)	0.193
Poids Z-score, moy. (SD)	0.0981	(0.8706)	0.4715	(0.8704)	0.053
taille (cm), moy. (SD)	66.72	(3.31)	67,07	(2.67)	0.980
Poids Z-score, moy. (SD)	-0.0177	(1.124)	0.2647	(1.0423)	0.239
Périmètre crânien (cm), moy. (SD)	43.53	(1.35)	43.77	(1.50)	0.620
Périmètre crânien Z-score, moy (SD)	0.5614	(0.8580)	0.9374	(0.9430)	0.061
<b>Tolérance Gastro-intestinale et dermatite atopique</b>					
Volume ingéré journalier (ml), moy. (SD)	680	(155)	740	(119)	0.09
Nombre de régurgitations par jour (n), moy. (SD)	0.4	(0.9)	0.6	(1.1)	0.30
Nombre de selles par jour (n), moy. (SD)	1.2	(0.9)	1.5	(1.1)	0.28
Durée des pleurs et périodes d'agitation (min), moy. (SD)	48.8	(23.4)	42.5	(23.8)	0.25
Durée de la période de suçage de pouce (min), moy. (SD)	185	(32)	172	(41)	0.28
Dermatite atopique, n (%)	8	(17.8)	1	(2.6)	<b>0.03*</b>
<b>Analyse des selles</b>					
	n=18		n=16		
SIgA (µg/g), moy. (SD)	1322	(840)	1869	(1624)	0.21
Différence entre le taux d'IgA fécales entre 1et 6 mois (%), moy. (SD)	<b>-80</b>	<b>(145.0)</b>	<b>-2</b>	<b>(54.3)</b>	<b>0.05</b>
Colonisation par <i>Staphylococci</i> , n (%)	12	(66.6)	4	(25.0)	<b>0.02</b>
Colonisation par <i>Clostridium</i> , n (%)	16	(88.8)	12	(75.0)	0.29
Colonisation par <i>Bacteroides</i> , n (%)	17	(94.4)	13	(81.3)	0.23
Colonisation par lactobacilli, n (%)	16	(88.8)	15	(93.8)	0.99
Colonisation par bifidobacteria, n (%)	17	(94.4)	16	(100.0)	0.99



**Figure 3 :** Courbe ROC de prédiction de la DA en fonction du pourcentage de décroissance de la concentration d'IgA fécales entre 1 et 6 mois. Les résultats sont exprimés en ((concentration d'IgA à 1 mois – concentration d'IgA à 6 mois)/ concentration d'IgA à 6 mois) x 100. Comme indiqué par le point noir, une réduction de 60% prédit la DA à 6 mois avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 79%. Le point gris montre qu'une réduction de 150% prédit la DA à 6 mois avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 93%. Aire sous la courbe = 0,88 +/- 0,06 ; p=0,014.

Parmi les 97 nouveau-nés inclus, 73 ont été considérés comme adhérents au traitement. Ces enfants adhérents étaient également répartis entre les deux groupes ( $p=0,93$ ) (Fig. 1).

Les causes de non adhésion n'étaient pas significativement différentes entre les deux groupes : il s'agissait d'une faible tolérance digestive pour 4/13 enfants dans le groupe expérimental versus 7/11 dans le groupe contrôle ( $p=0,11$ ), et d'une faible adhésion parentale chez 4/13 enfants versus 1/11 ( $p=0,43$ ).

L'analyse per protocole montrait principalement les mêmes résultats que l'analyse en intention-de-traiter à 6 mois. Concernant la DA, nous n'avons observé aucun cas sur 35 enfants dans le groupe expérimental versus 5 cas sur 38 dans le groupe contrôle ( $p=0,06$ ).

Après ajustement sur les antécédents familiaux d'atopie et le mode d'accouchement, l'alimentation par le lait expérimental était significativement associée à une diminution du risque de DA à 6 mois : OR 0,11 (IC 95% 0,01-0,94 ;  $p<0,05$ )

Dans cette étude randomisée multicentrique en double aveugle, nous avons montré que l'efficacité d'un lait artificiel contenant un symbiotique et enrichi en  $\alpha$ -lactalbumine était non inférieure en termes de croissance staturo-pondérale à 6 mois par rapport à un lait artificiel standard. Ces résultats confirment les qualités nutritives du lait enrichi en  $\alpha$ -lactalbumine<sup>70</sup>.

De plus, dans cette population de nouveau-nés non sélectionnée sur leur risque d'atopie, nous avons montré que l'utilisation du lait expérimental était associée à une diminution du risque de DA à 6 mois et à une meilleure tolérance digestive que le lait standard.

La meilleure tolérance digestive du lait expérimental à 1 mois pourrait être due à l'enrichissement en  $\alpha$ -lactalbumine du lait expérimental. Ces résultats ont été rapportés dans des études précédentes<sup>62 63 71</sup>. Lien et al ont suggéré que ces résultats pourraient être dus à la teneur élevée en tryptophane de l'  $\alpha$ -lactalbumine.<sup>62</sup> Cet acide aminé est en effet un précurseur de la sérotonine qui intervient dans la régulation du cycle veille-sommeil du nouveau-né. Néanmoins, ces résultats pourraient être en partie dus à la présence du symbiotique dans le lait expérimental. En effet, des études précédentes ont rapporté une meilleure tolérance digestive d'un lait contenant un probiotique (*Lactobacillus reuteri*)<sup>72</sup> ou un prébiotique<sup>73</sup> chez des nouveau-nés atteints de coliques.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent une relation entre la concentration des selles des nouveau-nés en bifidobactéries et en IgA fécales et une diminution du risque de DA à 6 mois.

Les IgA fécales (IgA sécrétoires) jouent un rôle important dans l'immunité de la muqueuse du tube digestif, notamment dans la défense contre les infections bactériennes pathogènes et les

virus. De plus, les IgA sécrétoires interviennent dans les mécanismes de tolérance immunitaire aux antigènes. L'augmentation de la production d'IgA fécales induite par les probiotiques a été rapportée dans plusieurs autres études et semble indiquer que ces bactéries ont une capacité à stimuler la maturation du système immunitaire des muqueuses (digestives et bronchique) et par conséquent les mécanismes de tolérance<sup>60 61 74</sup>. Le lien mécanistique entre cette maturation immunitaire et la diminution du risque de DA n'est cependant pas élucidé.

Plusieurs études ont montré que le tube digestif des nouveau-nés et des nourrissons à risque atopique est moins colonisé par différentes bactéries commensales telles que les bifidobactéries que celui des sujets non à risque atopiques.<sup>8 75 76</sup> Les mécanismes à l'origine de cette anomalie de diversité du microbiote intestinal chez les enfants à risque (dysbiose) ne sont actuellement pas élucidés. Le poids respectif des facteurs environnementaux et des facteurs génétiquement déterminés dans cette association est notamment inconnu. Cependant la dysbiose intestinale semble précéder l'apparition des maladies atopiques dans les études longitudinales disponibles, ce qui suggère un rôle causal potentiel<sup>22 23 31 32</sup>. Nos résultats sont en accord avec ses données.

La diversité du microbiote digestif dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'accouchement, la taille de la fratrie et les antécédents d'allergie. Ainsi, afin d'étudier la relation entre l'utilisation de probiotiques et le risque de DA, il est donc nécessaire de prendre en compte ces facteurs confondants. Nos résultats montrent une association entre l'utilisation du lait expérimental et le risque de DA à 6 mois après ajustement sur ces facteurs.

Sur le plan physiopathologique, les probiotiques sont susceptibles d'induire une régulation du système immunitaire via plusieurs mécanismes.

La reconnaissance de certains antigènes bactériens par les récepteurs Toll-like (TLR), en particuliers les TLR2, semble être une voie importante, conduisant à l'activation de cellules dendritiques, à une polarisation de type Th-1 et à l'activation de populations de lymphocytes T régulateurs périphériques.

Ainsi, Abrahamsson *et al* ont récemment suggéré que certaines familles de bactéries commensales du tube digestif comme les *proteobacteria*, plus fréquentes chez les nouveau-nés non atopiques, pourraient avoir un rôle dans la polarisation Th-1 du système immunitaire via la sécrétion d'endotoxines en stimulant la production d'IL-12 par les monocytes circulants et les cellules dendritiques<sup>29</sup>. Le lien entre une forte exposition aux endotoxines bactériennes et un faible risque de DA a déjà été rapporté dans des études épidémiologiques précédentes<sup>77</sup>.

Martino *et al* a montré dans une étude *in vitro* qu'un probiotique (*Lactobacillus acidophilus*) réduisait la production de certaines cytokines impliquées dans les phénomènes allergiques comme l'IL-6, activait une population de lymphocytes T régulateurs périphériques et augmentait la production de cytokines régulatrices comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10<sup>61</sup>.

Ainsi, l'ensemble de ces données biologiques renforce la validité externe du lien observé dans notre étude entre colonisation intestinale par les probiotiques, hyper production d'IgA fécales et réduction du risque de DA.

Il est possible que le prébiotique utilisé dans notre étude aie potentialisé l'effet du probiotique seul mais notre travail ne permet pas de répondre à cette question.

**Les points forts** de notre étude sont :

D'une part son *design* randomisé en double insu qui confère aux résultats un niveau de preuve satisfaisant.

D'autre part, l'association d'une étude clinique à une étude biologique permet d'enrichir les hypothèses physiopathologiques susceptibles d'expliquer les résultats cliniques.

De plus, les techniques utilisées pour la mise en évidence et la quantification des bactéries intestinales dans notre étude sont actuellement les techniques de références dans le domaine.

Enfin, le choix d'une population non sélectionnée sur le risque d'atopie pour une étude de prévention peut être discutable en première analyse. En effet, il est probable qu'un traitement préventif s'adresserait dans la vraie vie à des enfants de femmes à risque d'atopie. Cependant, comme ceci a été montré dans d'autres études, il semble qu'à l'échelle d'une population l'effet préventif d'un immunomodulateur sur la DA est d'autant plus fort que les facteurs de risque génétiques sont faibles<sup>78</sup>.

### **Les résultats de notre étude doivent cependant être interprétés avec précaution.**

En effet, l'objectif principal de notre travail était d'évaluer l'efficacité d'un lait expérimental sur la croissance pondérale des nouveau-nés. Ainsi le calcul du nombre de sujets nécessaire a été réalisé en vue de cet objectif. Le faible effectif de nos deux groupes et le faible nombre de sujets atteints de DA dans notre étude ne permet pas d'affirmer un effet du lait expérimental sur le risque de DA à six mois.

De plus, le lait expérimental et le lait contrôle diffèrent par la présence du symbiotique mais également par l'enrichissement en  $\alpha$ -lactalbumine. Aussi, il est impossible de déterminer la

responsabilité éventuelle de cet enrichissement dans l'effet observé. Cependant, il n'existe aucun argument dans la littérature pour suggérer un éventuel rôle de ce facteur.

D'autre part, l'utilisation des critères diagnostique avant l'âge d'un an est sujette à caution du fait du manque d'étude de validation à cet âge et de la plus grande variabilité du phénotype de DA. Ce problème se pose spécialement pour les formes mineures de DA<sup>79</sup>.

Enfin, seuls huit nouveau-nés sur dix ont été considérés comme adhérents au protocole. Cependant, l'analyse en intention-de-traiter et per protocole a donné des résultats similaires dans notre étude.

**Dans la littérature, le rôle curatif ou préventif des probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques dans la DA** est difficile à analyser, en effet, les études chez l'homme sont hétérogènes en terme de méthodologie, de type de population étudiée (population générale ou à risque d'atopie), de souche bactérienne utilisée, de proportion des mélanges, de durée et de période d'utilisation (pendant la grossesse ou la période néonatale ou les deux), de mode d'administration des produits (en gélules ou introduits dans les laits artificiels au moment de leur fabrication).

#### *Effet curatif des probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques sur la DA*

L'effet curatif des probiotiques utilisés chez des enfants ou des adultes porteurs de DA est probablement faible ou nul<sup>80 8180 82-84</sup>.

L'effet curatif des prébiotiques ou des symbiotiques sur la DA a été très peu étudié. Seules deux études de faibles effectifs ont rapporté une efficacité des symbiotiques versus prébiotiques seuls dans le traitement de la DA<sup>85 86</sup>.

#### *Effet préventif des probiotiques, prébiotiques ou symbiotiques sur la DA*

L'effet préventif des probiotiques, des prébiotiques ou des symbiotiques sur la DA est considéré comme un champ de recherche clinique prometteur<sup>87 88</sup>.

#### *Effet préventif des probiotiques*

Chez la souris, l'administration de probiotiques en période néonatale permet de réduire le risque de DA et d'augmenter la production d'IgA fécales<sup>89</sup>.

Chez l'homme, un effet préventif des probiotiques sur la DA a été mis en évidence pour la première fois par Kalliomaki et al en 2001<sup>42</sup>. Dans cette étude, les probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus GG*) étaient administrés aux femmes enceintes à risque d'atopie à la fin de la grossesse et aux nouveau-nés pendant six mois. Les auteurs rapportaient une diminution du risque de DA de 50 % à deux ans par rapport au groupe contrôle, cet effet était maintenu à 7 ans<sup>45</sup>.

Depuis, de nombreux essais randomisés ont été publiés portant sur l'administration de probiotiques, de prébiotiques ou de symbiotiques en préventif avec des résultats parfois discordant<sup>42-</sup>

<sup>56</sup>.

Concernant les probiotiques seuls, certaines études sont en faveur d'un effet préventif sur la DA alors que d'autres ne retrouvent pas d'efficacité. Une méta-analyse récente portant sur 14 études a mis en évidence une réduction du risque de DA par les probiotiques d'environ 20 % (RR 0,79 IC 95% : 0,71– 0,88) <sup>90</sup>.

#### *Effet préventif des prébiotiques*

Concernant les prébiotiques seuls, certaines études sont en faveur d'un effet préventif sur la DA à deux ans <sup>49 91</sup> alors que d'autres ne retrouvent pas d'efficacité <sup>92 93</sup>. Une méta-analyse Cochrane portant sur quatre études a récemment mis en évidence une réduction du risque de DA par les prébiotiques d'environ 30% (RR 0,68 IC 95% : 0,48– 0,97) <sup>94</sup>

#### *Effet préventif des symbiotiques*

Concernant les symbiotiques, les données publiées sont encore peu nombreuses : trois études ont évalué l'intérêt des symbiotiques vs placebo ou vs prébiotiques seuls sur la croissance du nouveau-né, la fréquence et la consistance des selles et la fréquence des infections respiratoires mais elles ne comportaient pas de données sur la DA <sup>95-97</sup>.

**Finalemment**, une seule étude a évalué l'efficacité préventive d'un symbiotique sur la DA <sup>48</sup>. Dans cette étude, 925 mères d'enfant à risque d'atopie ont été randomisées pour recevoir à la fin de leur grossesse soit un probiotique constitué de 4 souches bactériennes soit un placebo. Puis leurs

nouveau-nés recevaient soit le même probiotique avec un prébiotique (symbiotique) soit un placebo. Les résultats mettaient en évidence une diminution du risque de DA à deux ans dans le groupe expérimental (OR 0.66; IC 95%, 0,46-0,95; P = 0.025). Ces résultats n'étaient cependant pas maintenus à 5 ans, sauf dans un sous-groupe d'enfants nés par césarienne <sup>47</sup>. Dans cette étude, l'analyse d'un échantillon d'enfant a mis en évidence une association entre un taux élevé d'IgA fécales à 6 mois et un risque réduit de DA à 2ans.

Les symbiotiques pourraient donc avoir un rôle dans la prévention de la DA comme le suggèrent les résultats de notre étude et les données de la littérature. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires.

## CONCLUSION

Les résultats de notre étude suggèrent que l'administration aux nouveau-nés à terme d'un lait contenant un symbiotique et enrichi  $\alpha$ -lactalbumine pendant les six premiers mois de vie est susceptible de réduire le risque de développer une DA à six mois. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une relation entre la concentration des selles des nouveau-nés en bifidobactéries et en IgA sécrétoires fécales et une diminution du risque de DA à six mois. Ainsi, nos résultats soulèvent l'hypothèse d'un rôle causal potentiel des symbiotiques dans la maturation du système immunitaire et la réduction du risque de certaines manifestations atopiques comme la DA. Si de nombreuses données observationnelles de la littérature sont en faveur de cette hypothèse, la relation causale reste à être formellement prouvée et ses mécanismes élucidés. De même des essais randomisés supplémentaires devront confirmer ces résultats.

## PERSPECTIVES

Si le rôle préventif des probiotiques dans la DA est probable, la ou les souches bactériennes les plus efficaces restent à identifier ainsi que la durée et la période optimale d'administration (faut-il administrer le probiotique à la mère avant l'accouchement ou seulement au nouveau-né après l'accouchement, ou au deux?). Ces questions nécessitent des études supplémentaires. Nous avons construit un projet d'essai randomisé bi centrique (Nantes-Angers) associant le Réseau régional Allergies Respiratoires et Alimentaires (REAL2) et le CIC mère-enfant du CHU de Nantes. Afin de répondre à la question de la période optimale d'administration, cet essai comportera trois bras. Nous

évaluerons l'effet d'un probiotique en période anténatale seule ou anténatale et postnatale, versus placebo, sur la survenue d'une DA à 2 ans. L'étude prévoit d'inclure 1002 femmes enceintes à la 34ème semaine d'aménorrhée, pour lesquelles l'enfant à naître présente un risque d'atopie de premier degré. De plus, une étude ancillaire prévoit d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la marche atopique à partir des échantillons biologiques recueillis au cours de cette étude (cf. Annexe 2).

## ETUDES II ET III : ETUDES DES DETERMINANTS DE LA DERMATITE ATOPIQUE CHEZ LE NOUVEAU NE PREMATURE

Etudes observationnelles à partir des données de deux cohortes indépendantes de nouveau-nés prématurés.

### INTRODUCTION

Les évènements survenant avant la naissance ou pendant la période néonatale sont susceptible d'affecter la santé d'un individu durant sa vie entière<sup>98</sup>. En effet, le risque d'apparition d'un certain nombre de maladies chroniques dont les maladies atopiques est en partie programmé par des évènements périnataux<sup>99</sup>.

La prématurité est définie par une naissance à un âge gestationnel (AG) inférieur à 37 semaines d'aménorrhée. Son incidence est en augmentation dans les pays industrialisés (elle était de 6,3 % en France en 2003). Dix mille naissances avant un AG de 32 semaines ont lieu en France chaque année (1,2% des naissances). Environ 40% des naissances prématurées sont induites (ou « provoquées ») et 60 % sont spontanées. Les facteurs de risque de prématurité sont nombreux, associant des facteurs génétiques et environnementaux. Les grossesses multiples sont une des causes de prématurité. L'AG est le facteur de risque principal de mortalité périnatale et de séquelle graves à

long terme (handicap moteur, déficience intellectuelle). La survie des nouveau-nés prématurés a bénéficié de l'amélioration de la qualité et de l'organisation des soins périnataux.

Les nouveau-nés prématurés sont en contact avec un environnement périnatal très différent de celui des nouveau-nés à terme. Le microbiome intestinal (et probablement cutané) de ces enfants est notamment très différent ainsi que leur alimentation, leur environnement direct (milieu hospitalier, maintien en atmosphère humide) et leur traitements (recours fréquents aux antibiotiques systémiques). De plus, comme l'ont suggéré les modèles animaux, le système immunitaire des nouveau-nés prématurés est fonctionnellement immature, ce qui a probablement un rôle dans les mécanismes d'acquisition de tolérance<sup>100</sup>.

D'autre part, alors que les enfants nés à terme ont une peau presque mature fonctionnellement, les nouveau-nés très grands prématurés (AG < 29 semaines) ont un défaut de maturation de la fonction barrière de l'épiderme qui se corrigera progressivement pendant les premières semaines de la vie post natale<sup>101-103</sup>.

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la dermatite atopique (DA) ne sont pas élucidés. Cependant, la période néonatale est cruciale pour l'acquisition des mécanismes de tolérance immunitaire, notamment via l'acquisition d'un microbiote digestif diversifié<sup>8</sup> (cf. introduction étude I;p11). De plus, des données nombreuses et solides plaident pour un rôle crucial d'un défaut fonctionnel constitutionnel de la barrière cutanée<sup>9-11</sup>. Ce défaut fonctionnel, quasiment constant chez les patients atteints de DA, persiste tout au long de la vie et est expliqué dans environ un tiers des cas par des mutations in activatrices hétérozygotes du gène de la filaggrine, une protéine de structure de l'épiderme<sup>104</sup>. Des preuves très solides ont établi que ces mutations augmentaient le risque de DA (OR 2 à 3). De plus, les patients atteints de DA et porteurs d'une mutation in activatrice sur le gène

de la filaggrine ont un risque accru de développer une DA plus précoce et plus sévère par rapport aux patients atteints de DA non mutés, mais aussi, dans une certaine mesure, ces patients ont un sur risque d'allergies alimentaires (notamment à l'arachide), d'infections cutanées herpétiques, d'eczéma de contact et d'asthme associé à une DA<sup>105-108</sup>. Cependant, si le rôle de ce défaut fonctionnel génétiquement déterminé et permanent est établi, le rôle éventuel d'un défaut transitoire de la fonction barrière en période néonatale, comme on l'observe chez le nouveau-né prématuré, est actuellement inconnu.

Ainsi, l'étude des facteurs de risque de DA chez les nouveau-nés prématurés permet d'analyser le rôle de plusieurs facteurs périnataux et notamment du défaut physiologique transitoire de la fonction barrière cutanée des nouveau-nés très grands prématurés dans les mécanismes potentiels de la maladie. Connaissant le rôle majeur de la fonction barrière cutanée dans la physiopathologie de la DA, on pourrait donc s'attendre à observer un sur risque de DA chez les nouveau-nés très grands prématurés.

Les risque de DA chez les enfants prématurés a fait l'objet de plusieurs études aux résultats contradictoires<sup>99-109-119</sup>. De plus l'influence de la très grande prématurité sur le risque de DA n'a pas été étudiée dans une grande cohorte.

**Le but de notre travail** était d'étudier le lien entre la prématurité et le risque de DA dans deux études portant sur deux cohortes de nouveau-nés prématurés indépendantes, en population générale.

Pour cela nous avons réalisé deux études épidémiologiques dont les résultats sont regroupés dans ce travail.

---

POPULATIONS ET DEFINITIONS

---

POPULATION SOURCE

Les données étaient obtenues à partir de deux cohortes d'enfants prématurés indépendantes: la cohorte EPIPAGE (Etude Epidémiologique des Petites Age Gestationnels) <sup>120</sup> et la cohorte LIFT (Loire Infant Follow-up Team = réseau grandir ensemble) <sup>121</sup>

COHORTE EPIPAGE

---

La cohorte EPIPAGE est une cohorte prospective en population générale dans laquelle étaient inclus les enfants grands prématurés nés à un âge gestationnel (AG) compris entre 22 et 32 semaines dans neuf régions françaises en 1997 ainsi que des enfants nés entre 33 et 34 semaines entre avril et octobre 1997 <sup>120 122</sup>. En raison du grand nombre d'enfants nés entre 33 et 34 semaines, le recrutement de ces enfants modérément prématurés était interrompu après une période de deux mois <sup>120</sup>. Finalement, 427 enfants modérément prématurés (33-34 semaines) ainsi que tous les enfants grands prématurés nés entre 22 et 32 semaines et vivants à la sortie de l'hôpital étaient recrutés pour cette étude (n=2,886) (**Fig. 1 ; p50**). Parmi les 2886 enfants recrutés, 224 infants n'étaient pas enrôlés dans l'étude (le suivi n'était pas proposé pour 77 enfants et le suivi était refusé par les parents pour

147 enfants), les familles de 434 enfants n'ont pas répondu au questionnaire, and 21 étaient décédés avant le suivi. Ainsi, 2,207 enfants prématurés étaient inclus dans l'étude de suivi à 2 ans.

De plus nous avons inclus un groupe d'enfants nés à terme à partir de la cohorte EPIPAGE. Cet échantillon était constitué d'un enfant sur quatre nés entre 39 et 40 semaines dans les 9 régions pendant une semaine en 1997. Il était constitué de 667 enfants. Le suivi proposé pour ces enfants à terme était le même que pour les enfants prématurés. Ce groupe de référence d'enfants nés à terme n'a été analysé qu'à titre de comparaison par rapport aux enfants prématurés dans EPIPAGE.

#### COHORTE LIFT

---

La cohorte LIFT est une cohorte prospective ouverte régionale en population générale situé dans les pays de la Loire. Nous avons sélectionné pour cette étude les enfants éligibles nés avant 35 semaines pendant une période de 2 ans (janvier 2003 à décembre 2005) hospitalisés au CHU de Nantes et vivants à la sortie de l'hôpital (n=974) (**Fig. 1 ;p50**). Parmi les 974 enfants recrutés, 132 enfants n'étaient pas enrôlés dans l'étude (le suivi n'était pas proposé ou refusé par les parents), les familles de 215 enfants n'ont pas répondu au questionnaire, and neuf étaient décédés avant le suivi à 5 ans. Ainsi, 618 enfants prématurés étaient inclus dans l'étude de suivi à 5 ans.

---

## CONSIDERATIONS ETHIQUES

Ces deux cohortes étaient enregistrées auprès des autorités compétentes (Commission Nationale de l'informatique et des Libertés (CNIL) et autorisées par les comités d'éthique locaux.

Pour la cohorte EPIPAGE les parents étaient informés à la maternité ou dans le service de néonatalogie et leur consentement verbal était recueilli au moment de l'enrôlement dans l'étude. Pour la cohorte LIFT, le consentement écrit des parents était recueilli au moment de l'enrôlement dans l'étude.

---

## DIAGNOSTIC DE LA DERMATITE ATOPIQUE

Dans la cohorte LIFT, les données étaient recueillies à l'âge de 5 ans par un questionnaire standardisé administré aux parents par téléphone pendant une période de 3 mois (de décembre 2010 à février 2011). L'enfant était déclaré comme porteur d'une DA si la réponse à la question « est-ce qu'un médecin vous a dit que votre enfant avait un eczéma » était positive. Le questionnaire comprenait en outre des questions relatives aux antécédents atopiques dans la famille (mère, père, fratrie).

Dans la cohorte EPIPAGE, un questionnaire standardisé était envoyé aux parents par voie postale à l'âge de deux ans. L'enfant était déclaré comme porteur d'une DA si la réponse à la question « est-ce qu'un médecin vous a dit que votre enfant avait un eczéma » était positive.

---

## DEFINITION DES REPONDEURS ET DES NON-REPONDEURS

Dans les deux cohortes, les répondeurs étaient définis comme les enfants pour lesquels la réponse à la question portant sur la DA était connue à deux ans pour la cohorte LIFT ou à 5 ans pour la cohorte EPIPAGE. Les non-répondeurs étaient définis comme les enfants non enrôlés dans l'étude et les enfants pour lesquels la réponse à la question portant sur la DA n'était pas connue à deux ans pour la cohorte LIFT ou à 5 ans pour la cohorte EPIPAGE.

---

## POPULATION ANALYSEE

Finalement, dans la cohorte EPIPAGE, les données à 2 ans sur la DA étaient disponibles chez 1836 enfants prématurés et 345 enfants nés à terme. Dans la cohorte LIFT, les données à 5 ans sur la DA étaient disponibles chez 493 enfants prématurés (Fig. 1).

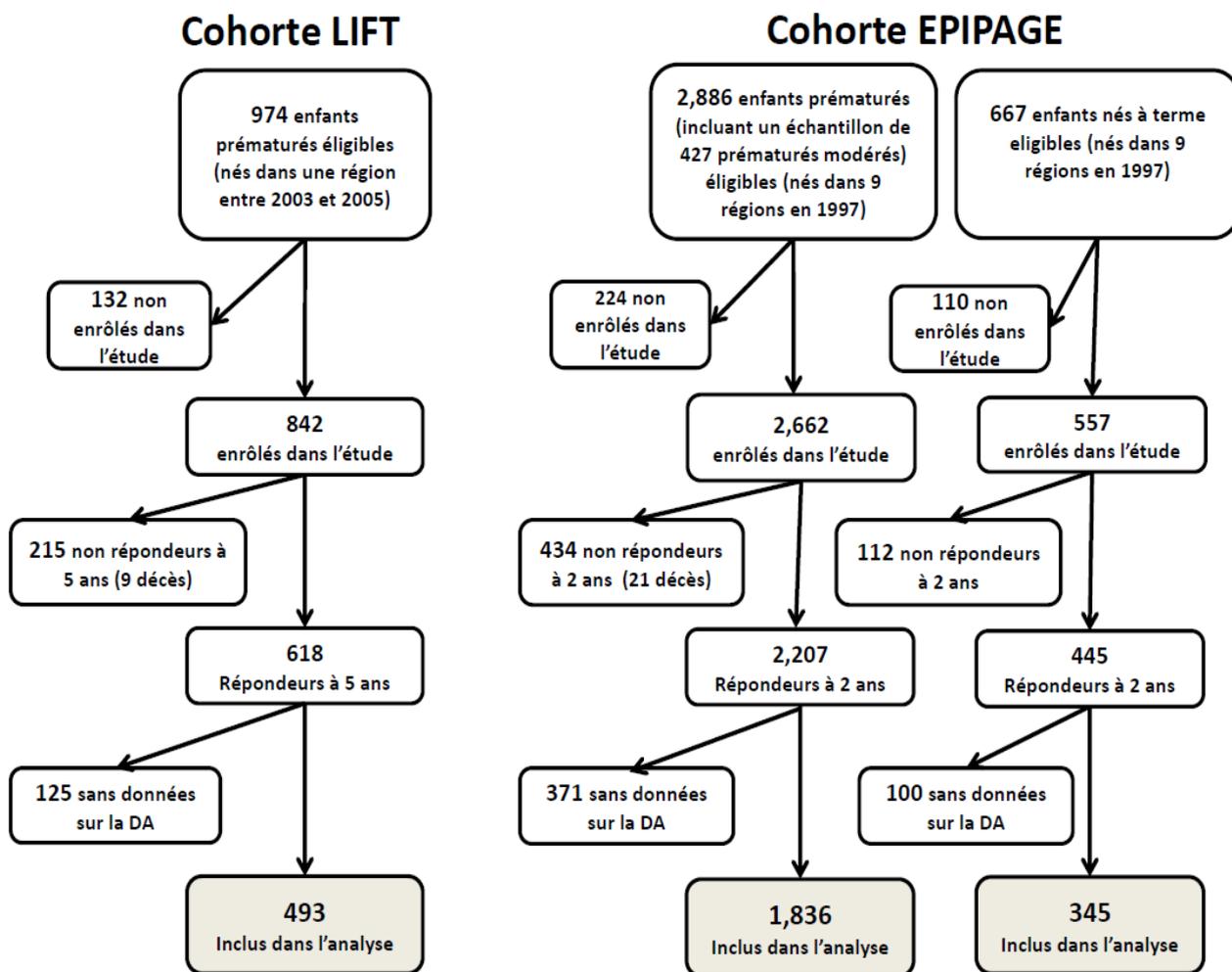


Figure 1. Caractéristiques de la population étudiée dans les deux cohortes

Les données périnatales étaient recueillies lors de l'hospitalisation initiale en maternité ou dans les services de néonatalogie.

Pour les mères, les caractéristiques recueillies étaient : le niveau de scolarité (cohorte EPIPAGE), un mode d'accouchement par césarienne, une grossesse multiple, une antibiothérapie systémique anténatale, une corticothérapie systémique anténatale.

Pour les enfants, les caractéristiques recueillies étaient : l'âge gestationnel, le sexe, le poids de naissance, une antibiothérapie systémique postnatale, un diagnostic de broncho dysplasie, une ventilation assistée pendant une durée de plus de 10 jours, un allaitement maternel à l'issue de l'hospitalisation initiale, des antécédents familiaux d'allergie (père, mère et/ou fratrie) et la notion d'une fratrie . Le poids de naissance était exprimé par le Z-score, calculé selon la méthode LMS (last mean square) <sup>67</sup>. Le Z-score exprime la différence entre le poids de naissance d'un enfant et le poids moyen d'un enfant né au même AG dans la population générale.

*Premièrement*, nous avons analysé le nombre d'enfants avec une DA et sans DA dans la cohorte EPIPAGE (à deux ans) et dans la cohorte LIFT (à cinq ans) en fonction de leur AG. L'AG des enfants prématurés était stratifiée en trois catégories :

- 24-28 semaines (très grands prématurés)
- 29-32 semaines (grands prématurés)
- 33-34 semaines (modérément prématurés)

Nous avons analysé ces données au sein de chaque cohorte, sans regrouper les données provenant des deux cohortes. Dans la cohorte EPIPAGE, nous avons analysé les données provenant d'un échantillon d'enfants nés à terme (39-40 semaines) afin de comparer ces données à celles des enfants prématurés.

*Deuxièmement*, nous avons étudié en analyse uni variée l'association entre la DA et les caractéristiques périnatales des enfants et les caractéristiques de la grossesse des mères.

*Troisièmement*, nous avons étudié l'association entre la DA et l'AG en analyse multi variée, en ajustant sur les facteurs de confusions potentiels : poids de naissance (Z-score), sexe, antécédents familiaux d'allergie, niveau de scolarité de la mère, mode d'accouchement, utilisation d'une antibiothérapie systémique.

Nous avons utilisé une méthode de régression logistique pour les analyses uni et multi variées.

Les Odds Ratio (OR) bruts et ajustés étaient déterminés avec leur intervalle de confiance (IC) à 95%. Des tests statistiques bilatéraux étaient utilisés dans tous les cas. Le seuil de significativité pour les tests était  $p < 0.05$ . Les données manquantes étaient exclues de l'analyse. Les analyses étaient réalisées sur le logiciel SPSS v.15.0.

---

### CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE

---

### CARACTERISTIQUES DES REPONDEURS ET NON REPONDEURS

En comparant les caractéristiques des répondeurs et des non-répondeurs dans les deux cohortes d'enfants prématurés (**Tableau I**), aucune différence significative n'était mise en évidence entre les groupes concernant le poids de naissance (Z-score) et la durée de ventilation artificielle. En revanche, les répondeurs avait un AG légèrement plus faible, était nés plus souvent par césarienne, et était plus souvent traités par une antibiothérapie intraveineuse pendant la période néonatale ( $p < 0,05$ ). Dans la cohorte EPIPAGE, les mères des nouveau-nés prématurés non-répondeurs avaient un niveau de scolarité supérieur aux mères des enfants répondeurs ( $p < 0,01$ ).

**Tableau I : Caractéristiques des réponders et des non réponders**

Caractéristiques, n (%)	cohorte LIFT				Cohorte EPIPAGE					
	Répondeurs		Non-répondeurs		Répondeurs		Non-répondeurs			
	N=493		N=481		N=1,836		N=1,050		<i>p-value</i>	
<b>Age gestationnel</b>					<i>p-value</i>					
24-28 sem.	88	(17.8)	73	(15.2)	<0.001	391	(21.3)	156	(14.9)	<0.001
29-32 sem.	237	(48.1)	185	(38.5)		1202	(65.5)	710	(67.6)	
33-34 sem.	168	(34.1)	223	(46.4)		243	(13.2)	184	(17.5)	
<b>Poids de naissance (Z-score)</b>										
<-2	20	(4.1)	18	(3.8)	0.9	53	(2.9)	30	(2.9)	0.56
[-2; -1[	104	(21.1)	89	(18.7)		309	(16.9)	200	(19.1)	
[-1; 0[	202	(41.0)	206	(43.4)		817	(44.7)	448	(42.9)	
[0; 2[	163	(33.1)	158	(33.3)		641	(35.1)	361	(34.5)	
>2	4	(0.8)	4	(0.8)		7	(0.4)	6	(0.6)	
<b>Niveau scolaire élevé de la mère</b>	NA		NA			686*	(37)	475**	(45)	<0.001
<b>Ventilation assistée &gt;10 jours</b>	58	(11.8)	50	(10.4)	0.54	200	10.9	117	11.1	0.91
<b>Césarienne</b>	335	(68.0)	265	(55.1)	<0.001	1021	(55.6)	535	(51.0)	0.02
<b>Antibiothérapie postnatale systémique</b>	403	(81.7)	362	(75.3)	0.01	1081	(58.9)	605	(57.6)	0.03

\* Information disponible pour 1559 enfants sur 1,836 dans EPIPAGE. \*\* Information disponible pour 761 enfants 1050 dans EPIPAGE . NA : donnée non disponible

Les caractéristiques démographiques et cliniques de tous les nouveau-nés prématurés et à terme figurent dans le tableau II.

*Dans la cohorte LIFT*, 493 nouveau-nés prématurés ont été inclus dans l'analyse : 88 étaient nés à un AG compris entre 24 et 28 semaines (très grands prématurés, 18 %), 237 à un AG compris entre 29 et 32 semaines (grands prématurés, 48 %) et 168 à un AG compris entre 33 et 34 semaines (modérément prématurés, 34 %).

*Dans la cohorte EPIPAGE*, 1 836 nouveau-nés prématurés ont été inclus dans l'analyse : 391 étaient nés à un AG compris entre 24 et 28 semaines (très grands prématurés, 21 %), 1 202 à un AG compris entre 29 et 32 semaines (grands prématurés, 65 %) et 243 à un AG compris entre 33 et 34 semaines (modérément prématurés, 13 %). Dans le groupe de référence de nouveau-nés à terme, 345 nouveau-nés étaient inclus.

**Tableau II : Caractéristiques cliniques et démographiques des enfants prématurés et à nés à terme.**

Caractéristiques, n (%)	cohorte LIFT		cohorte EPIPAGE			
	Prématurés N=493		Prématurés N=1836		A terme N=345	
<b>Nouveau-nés</b>						
Mâles	279	(56.6)	953	(51.9)	181	(52.3)
<b>Age gestationnel</b>						
24-28 sem.	88	(17.8)	391	(21.3)	-	-
29-32 sem.	237	(48.1)	1202	(65.5)	-	-
33-34 sem.	168	(34.1)	243	(13.2)	-	-
<b>Poids de naissance, Z-score *</b>						
<-2]	20	(4.1)	53	(2.9)	3	(1)
[-2; -1]	104	(21.1)	309	(16.9)	44	(12.7)
[-1; 0]	202	(41.0)	817	(44.7)	160	(46.2)
[0; 2]	163	(33.1)	641	(35.1)	137	(39.6)
>2]	4	(0.8)	7	(0.4)	2	(0.6)
<b>Grossesse et mère</b>						
Césarienne	335	(68.0)	1,021	(55.6)	27	(7.8)
Corticothérapie anténatale **	355	(72.0)	1,338	(74)	-	-
Antibiothérapie anténatale***	99	(20.1)	337	(20.1)	-	-
Grossesse multiple	208	(42.2)	598	(32.6)	4	(1.2)
<b>Hospitalisation</b>						
broncho dysplasie <sup>‡</sup>	243	(49.3)	704	(38.8)	-	-
Ventilation >10 jours	58	(11.8)	200	(10.9)	-	-
Antibiothérapie néonatale <sup>#</sup>	403	(81.7)	1,081	(58.9)	-	-
<b>Autres</b>						
Allaitement lait de mère <sup>§</sup>	151	(30.6)	413	(22.5)	172	(49.7)
Antécédents familiaux d'allergie	182	(36.9)	840	(45.8)	184	(53.2)
Fratricie > 0	237	(48.1)	702	(38.2)	199	(57.5)

\* Information disponible pour 1,827 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE \*\*Information disponible pour 1,809 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE \*\*\* Information disponible pour 1,676 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE<sup>‡</sup> Information disponible pour 1,815 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE<sup>§</sup> Information disponible pour 1,748 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE<sup>#</sup>Information disponible pour 1,609 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE<sup>†</sup> Information disponible pour 1,622 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE

Concernant la relation entre AG et DA, la proportion d'enfants atteints de DA dans le groupe de très grands prématuré (24-28 semaines) était plus faible par rapport à ceux nés à un AG plus élevé dans la cohorte EPIPAGE et tendait à être plus faible dans la cohorte LIFT (**tableau III et III bis**).

En utilisant la catégorie d'AG des modérément prématurés (33-34 semaines) comme référence, la très grande prématurité (24-28 semaines) était associée à une diminution du risque de DA dans la cohorte EPIPAGE (OR: 0,55 [IC à 95%: 0,36 - 0,84];  $p = .001$ ) et dans la cohorte LIFT (OR: 0,52 [IC à 95%: 0,24- 1,12],  $p = .09$ ) (**tableau IV**).

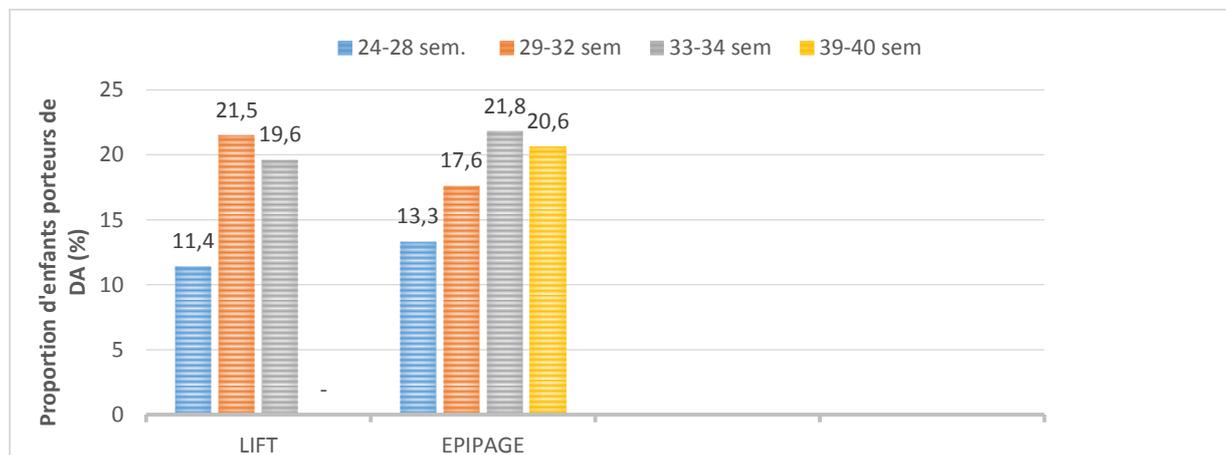
En revanche, il n'y avait pas de différences significatives observées concernant le taux de DA entre les catégories d'AG > 29 semaines (29-32, 33-34, 39-40 semaines) dans la cohorte EPIPAGE,  $p = 0,12$  et  $p = 0,72$ ); et dans la cohorte LIFT, ( $p = 0,21$ ).

**Tableau III. Prévalence de la dermatite atopique en fonction de l'âge gestationnel dans les cohortes LIFT et EPIPAGE \***

	cohorte LIFT		<i>p-value</i> <sup>‡</sup>	cohorte EPIPAGE		<i>p-value</i> <sup>‡</sup>
	(N=493)			(N=2,181)**		
Age gestationnel	n/N	(%)		n/N	(%)	
24-28 sem.	10/88	(11.4)	0.11	52/391	(13.3)	0.02
29-32 sem.	51/237	(21.5)		212/1,202	(17.6)	
33-34 sem.	33/168	(19.6)		53/243	(21.8)	
39-40 sem.	-	-		71/345	(20.6)	

\* Diagnostic médical de dermatite atopique déclaré par les parents à l'âge de cinq ans (cohorte LIFT) ou deux ans (cohorte EPIPAGE)\*\* Incluant 1,836 nouveau-nés prématurés et 345 nouveau-nés à terme<sup>‡</sup> Test du Chi-deux de Pearson

**Tableau III bis : Prévalence de la dermatite atopique en fonction de l'âge gestationnel dans les cohortes LIFT et EPIPAGE (représentation graphique)**



**Tableau IV. Caractéristiques des nouveau-nés prématurés et risque de dermatite atopique <sup>1</sup>**

Caractéristiques	Cohorte LIFT			Cohorte EPIPAGE		
	N=493			N=1,836		
	OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value
<b>Nouveau-nés</b>						
Mâle	1.05	(0.66 - 1.64)	0.85	0.80	(0.63 - 1.02)	0.07
Age gestationnel						
24-28 sem.	0.52	(0.24 - 1.12)	0.09	<b>0.55</b>	<b>(0.36 - 0.84)</b>	<b>0.01</b>
29-32 sem.	1.12	(0.69 - 1.83)	0.65	0.77	(0.55 - 1.08)	0.13
33-34 sem.	1			1		
Poids de naissance, Z-score*						
<-2]	1.3	(0.39 - 1.53)	0.70	<b>0.29</b>	<b>(0.09 - 0.96)</b>	<b>0.04</b>
[-2; -1]	0.98	(0.51 - 1.91)	0.96	0.97	(0.67 - 1.39)	0.85
[-1; 0]	1.44	(0.85 - 2.45)	0.17	1.13	(0.86 - 1.47)	0.40
[0; 2]	1			1		
<b>Grossesse et mère</b>						
Césarienne	0.95	(0.59 - 1.53)	0.83	1.13	(0.88 - 1.44)	0.34
Corticothérapie anténatale **	1.34	(0.79 - 2.27)	0.27	0.95	(0.72 - 1.25)	0.72
Antibiothérapie anténatale ***	0.85	(0.48 - 1.52)	0.59	1.18	(0.87 - 1.60)	0.30
Grossesse multiple	1.49	(0.94 - 2.32)	0.09	0.96	(0.74 - 1.25)	0.77
Niveau scolaire supérieur	NA			<b>1.32</b>	<b>(1.04 - 1.69)</b>	<b>0.02</b>
<b>Hospitalisation</b>						
Ventilation assistée >10 jours	<b>0.37</b>	<b>(0.14 - 0.95)</b>	<b>0.04</b>	0.72	(0.47 - 1.11)	0.14
Antibiothérapie néonatale #	0.79	(0.59 - 1.05)	0.10	0.97	(0.86 - 1.10)	0.66
<b>AUTRES</b>						
Allaitement lait de mère §	1.04	(0.66 - 1.64)	0.85	1.46	(1.11 - 1.93)	0.08
Antécédents familiaux d'allergies	<b>3.09</b>	<b>(1.94 - 4.91)</b>	<b>0.01</b>	<b>1.91</b>	<b>(1.49 - 2.44)</b>	<b>0.001</b>
Fratrie >0¶	0.82	(0.52 - 1.28)	0.38	1.02	(0.98 - 1.06)	0.40

<sup>1</sup> Diagnostic médical de dermatite atopique déclaré par les parents à l'âge de cinq ans (cohorte LIFT) ou deux ans (cohorte EPIPAGE NA: donnée non disponible \* Information disponible pour 1,827 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE \*\*Information disponible pour 1,809 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE \*\*\* Information disponible pour 1,676 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE †Information disponible pour 1,815 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE § Information disponible pour 1,748 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE ¶Information disponible pour 1,609 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE †† Information disponible pour 1,622 sur 1,836 enfants dans la cohorte EPIPAGE

Nous avons étudié la relation entre l'AG et l'asthme dans la cohorte EPIPAGE (données non disponibles dans la cohorte LIFT). Parmi les 1836 nouveau-nés prématurés analysés dans notre étude, 94 (5,1%) étaient porteurs d'un asthme modéré à sévère à cinq ans (défini comme un asthme nécessitant un traitement). Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre l'AG et l'asthme à cinq ans dans notre étude ( $p=0,30$ ).

Parmi les prématurés, nous avons ensuite étudié l'influence de plusieurs facteurs périnataux sur le risque de DA (**Tableau IV**).

Nous avons constaté que des antécédents familiaux d'allergies étaient associés à un risque plus élevé de DA dans les deux cohortes. Par ailleurs, un niveau scolaire maternel élevé était associée à un risque accru de DA dans la cohorte EPIPAGE, mais ces données n'étaient pas disponibles pour la cohorte LIFT.

En outre, un très faible poids de naissance ( $Z$ -score  $<-2$ ) était associée à un risque plus faible de DA dans la cohorte EPIPAGE, mais pas dans la cohorte de LIFT.

Par ailleurs le risque de DA était lié à la durée de la ventilation assistée pendant la période néonatale dans la cohorte LIFT, alors que ce n'était pas le cas dans la cohorte EPIPAGE.

Nous avons également mis en évidence que l'allaitement maternel à la sortie, le mode d'accouchement, le caractère multiple de la grossesse et l'utilisation d'antibiotiques par voie intraveineuse pendant la période néonatale n'étaient pas associés à un risque accru de DA dans les deux cohortes.

En analyse multi variée, en utilisant la catégorie d'AG (33-34) semaines comme référence et après ajustement sur le poids de naissance (Z-score), les antécédents familiaux d'allergie de la famille et sur le niveau scolaire élevé maternel (données disponibles dans la cohorte EPIPAGE), la très grande prématurité (<29 semaines) était significativement associée à une diminution du risque de DA dans la cohorte LIFT (ORa: 0,41 [IC 95%: 0,18 - 0,90],  $p = 0.03$ ) et dans la cohorte EPIPAGE (ORa: 0,57 [IC 95%: 0,37-0,87],  $p = .009$ ) (**tableau V**).

De plus, l'ajustement sur les variables sexe, mode d'accouchement par césarienne, utilisation d'antibiotiques systémiques au cours de la période néonatale et âge ne modifiaient pas les résultats dans les deux cohortes (données non présentées).

**Tableau V. Association entre l'âge gestationnel et le risque de dermatite atopique<sup>1</sup> chez les enfants nés prématurés après ajustement sur le poids de naissance (Z-score), les antécédents familiaux d'allergie et le niveau scolaire élevé de la mère.**

	cohorte LIFT			cohorte EPIPAGE		
	N=493			N=1,836		
	OR	(IC 95%)	<i>p</i> -value	OR	(IC 95%)	<i>p</i> -value
<b>Ajusté sur le poids de naissance (Z-score)</b>						
24-28 sem.	0.53	(0.25 - 1.15)	0.11	<b>0.54</b>	<b>(0.35 - 0.82)</b>	<b>0.004</b>
29-32 sem.	1.16	(0.70 - 1.92)	0.57	0.76	(0.54 - 1.07)	0.10
33-34 sem.	1			1		
<b>Ajusté sur le poids de naissance (Z-score) et les antécédents familiaux d'allergie</b>						
24-28 sem.	<b>0.41</b>	<b>(0.18 - 0.90)</b>	<b>0.03</b>	<b>0.57</b>	<b>(0.37 - 0.87)</b>	<b>0.001</b>
29-32 sem.	1.08	(0.64 - 1.81)	0.79	0.78	(0.55 - 1.10)	0.16
33-34 sem.	1	-		1	-	
<b>Ajusté sur le poids de naissance (Z-score), les antécédents familiaux d'allergie et le niveau scolaire élevé de la mère</b>						
24-28 sem.	NA			<b>0.57</b>	<b>(0.37 - 0.87)</b>	<b>0.009</b>
29-32 sem.	NA			0.78	(0.55 - 1.10)	0.16
33-34 sem.	NA			1		

<sup>1</sup> Diagnostic médical de dermatite atopique déclaré par les parents à l'âge de cinq ans (cohorte LIFT) ou deux ans (cohorte EPIPAGE)

Dans ce travail regroupant deux études portant sur des cohortes indépendantes en population générale, nous avons montré que les enfants nés très grands prématurés (< 29 semaines) avaient un risque plus faible de développer une DA à deux ans (cohorte EPIPAGE) ou cinq ans (cohorte LIFT) comparés aux enfants prématurés nés à un AG plus élevé (29-34 semaines) et aux enfants nés à terme. Nos résultats obtenus dans la première étude portant sur la cohorte nationale d'enfants prématurés nés en 1997 (EPIPAGE) ont été confirmés par l'analyse des données provenant de la deuxième cohorte régionale plus récente (enfants prématurés nés en 2003-2005).

Dans ces deux cohortes, de manière attendue, des antécédents familiaux d'allergies et un niveau scolaire élevé de la mère (EPIPAGE) ont été identifiés comme des facteurs de risque de DA.

En revanche nous n'avons pas mis en évidence d'association entre le risque de DA et plusieurs facteurs périnataux souvent rapportés comme des déterminants potentiels de la maladie : accouchement par césarienne, antibiothérapie en période néonatale, allaitement maternel, absence de fratrie. Toutefois des études récentes de grande envergure n'ont pas confirmé le lien entre allaitement et diminution du risque de DA<sup>123</sup>.

La proportion d'enfants atteints de DA à deux ans dans notre population de référence née à terme est de 21%. Ces résultats sont comparables aux données de prévalence cumulée de plusieurs cohortes en population générale européennes : la cohorte Allemande MAS<sup>124</sup> (prévalence cumulée à

deux ans : 21,5 %), la cohorte Danoise DARC<sup>125</sup> (prévalence cumulée à six ans : 22,8%), la cohorte de l'île de Wight<sup>126</sup> (prévalence cumulée à 4 ans : 22 %). Ceci suggère une validité externe satisfaisante.

Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre l'AG et l'asthme dans la cohorte EPIPAGE à la différence d'études précédentes dans lesquelles la prématurité était associée à un risque accru d'asthme<sup>127 128</sup>.

Cependant, les critères diagnostiques d'asthme avant cinq ans manquent de spécificité et reposent essentiellement sur la constatation d'épisodes de sifflement respiratoires (*wheezing*) récurrents. Toutefois, les sifflements respiratoires sont des symptômes courants chez les nouveau-nés prématurés au cours des premières années de vie et sont souvent associées aux infections respiratoires virales précoces de la dysplasie broncho-pulmonaire, complication fréquemment observée dans cette population. Ainsi, les sifflements respiratoires ne sont pas spécifiques de l'asthme atopique chez ces enfants.

Dans nos études, deux tiers des enfants atteints d'asthme à cinq ans ont débuté leur maladie avant 2 ans (données non présentées). Il est donc probable qu'une majorité d'enfants porteurs d'un asthme dans notre population ne soit pas des asthmatiques atopiques mais plutôt des malades porteurs d'une bronchopathie chronique liée à la dysplasie broncho-pulmonaire. C'est pourquoi nous considérons que la relation entre l'AG et l'asthme doit être interprétée avec précaution dans nos études.

La rhinite allergique est très rare chez le très jeune enfant, nous n'avons pas de données sur cette manifestation atopique dans notre étude.

*Le point fort principal* de notre travail est l'analyse de données provenant de deux grandes cohortes prospectives en population générale indépendantes séparées de six années.

De plus, l'estimation de l'AG est très fiable dans nos études car il a été évalué par la date des dernières règles et le résultat de la première échographie obstétricale, ce qui est la méthode standard en France<sup>129</sup>. Ce mode d'estimation de l'AG est plus fiable que le poids de naissance qui est fortement lié à plusieurs facteurs anténataux.

Le suivi des patients dans les deux cohortes était standardisé et le recueil des données périnatales était détaillé : ceci limite les biais de mémoire lors du recueil du critère de jugement plusieurs années après la naissance de l'enfant.

*Les résultats de ce travail doivent cependant être interprétés avec précaution* en raison de certaines faiblesses.

Dans la cohorte LIFT, l'association entre la très grande prématurité et le risque de DA à cinq ans n'atteint pas la significativité bien que la proportion d'enfants porteurs de DA soit plus faible chez les très grands prématurés par rapport aux AG plus élevés. Ceci peut être dû à un manque de puissance du au relatif faible effectif d'enfants dans la catégorie des très grands prématurés dans cette étude (n=88). Toutefois, après ajustement sur les facteurs de confusion, la très grande prématurité était significativement associée à une diminution du risque de DA dans les deux études.

Dans la cohorte EPIPAGE, les mères des enfants non-répondeurs avaient un niveau scolaire plus élevé comparé aux mères des enfants répondeurs. Le niveau scolaire des mères étant un facteur de risque connu de dermatite atopique<sup>130</sup>, cette inégalité de répartition des caractéristiques initiales

entre les non-répondeurs et les répondeurs peut conduire à une sous-estimation de la prévalence de la DA chez les répondeurs par rapport aux non-répondeurs. Cependant, cette inégalité n'est pas susceptible de modifier l'association observée dans nos études entre l'AG et le risque de DA chez les répondeurs.

De plus, la proportion d'enfants perdus de vue était plus élevée chez les enfants nés à un AG plus élevé (données non présentées). Ceci peut être expliqué par une adhésion plus faible au suivi chez les parents de nouveau-nés d'AG plus élevé<sup>131 132</sup>.

Toutefois, il est improbable que les enfants porteurs de DA dans nos deux études soient susceptibles d'être d'avantage perdus de vue que les enfants non porteurs de DA. Ainsi, il est peu probable que la proportion plus élevée d'enfants perdus de vue chez les enfants nés à un AG plus élevé explique l'association observée entre l'AG et le risque de DA dans nos études.

L'interprétation et la comparaison des études épidémiologiques dépendent fortement de la définition et du choix des variables à expliquer. Ainsi, il existe une grande variabilité dans la définition de la DA dans les études. Certaines études, comme les nôtres, utilisent une définition dépendante de la déclaration des parents interrogés par questionnaire, (« est-ce qu'un médecin a dit que votre enfant avait un eczéma ? »)<sup>13 30</sup>, d'autres utilisent trois questions posées aux parents validées dans l'étude internationale ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood)<sup>133</sup>, d'autres utilisent les critères diagnostiques de l'UK party<sup>134</sup>.

De plus, les variations de prévalence observées entre les études peuvent être dues à des mesures différentes (prévalence cumulée depuis la naissance, prévalence annuelle, prévalence ponctuelle ou instantanée).

Dans nos études, nous avons choisi de définir les enfants comme porteurs d'une DA si la réponse de leur parents à la question « est-ce qu'un médecin vous a dit que votre enfant avait un eczéma » ou « est-ce qu'un médecin vous a dit que votre enfant avait un eczéma atopique » étaient positives. Plusieurs études ont montré que les performances diagnostiques de cette question était satisfaisante (Sensibilité : 63% ; Spécificité : 88%) par rapport au gold standard (examen clinique par un médecin)<sup>135 136</sup>

De plus, nous avons délibérément utilisé dans cette question la formulation « eczéma » et non « dermatite » parce qu'elle correspond à la nomenclature de la nouvelle classification de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) sur les maladies allergiques<sup>1</sup>

Le diagnostic de DA n'a pas été recueilli exactement de la même manière dans les deux cohortes. En effet, dans la cohorte EPIPAGE, un questionnaire était envoyé aux parents par voie postale alors que dans la cohorte LIFT un questionnaire téléphonique standardisé était utilisé.

De plus, le diagnostic de DA n'a pas été recueilli au même âge dans les deux cohortes: ceci pourrait expliquer les différences de prévalence observées dans nos deux cohortes. Cependant, nous avons utilisé la même question pour tous les enfants au sein de chaque cohorte, quel que soit son AG. Par conséquent le biais d'information engendré est non différentiel (il touche de la même manière les sujets quel que soit leur AG). Par définition un biais non différentiel ne peut conduire qu'à une sous-estimation de l'effet et non à une surestimation. Ce biais n'est donc pas susceptible d'expliquer nos résultats. De plus, nous n'avons pas regroupé les données des deux cohortes pour l'analyse mais nous avons analysé les données séparément.

Nous n'avons pas d'information concernant la prévalence des mutations du gène de la filaggrine dans nos études. Il nous a donc été impossible de réaliser une analyse stratifiée sur ce facteur. Actuellement, aucune donnée de la littérature ne permet d'associer mutation du gène de la filaggrine et prématurité. De plus, nous n'avons pas de résultat concernant le taux de sensibilisation allergique (prick-tests, dosage des IgE sériques) dans nos études. Ce dernier point nous a conduit à définir les patients comme porteur d'une DA indépendamment de leur statut « atopique » *stricto sensu*.

Enfin, nos deux études étant observationnelles, des facteurs de confusion résiduels sont susceptibles de persister et d'influer sur la relation observée.

**La DA est une maladie multifactorielle due à l'association de facteurs génétiques et environnementaux.** Les patients porteurs d'une DA ont une fonction barrière cutanée défectueuse en peau lésée et non lésée<sup>9-11</sup>. Des données récentes suggèrent qu'une perméabilité accrue de la barrière cutanée est facteur de risque de DA, d'asthme associé à une DA et de certaines allergies alimentaires<sup>105-108</sup>. Ainsi, certains auteurs proposent qu'une barrière cutanée défectueuse puisse constituer la première marche de « l'escalier atopique ».<sup>105 137</sup>

Depuis 2006, Des données solides ont ainsi établi que des mutations inactivatrices du gène codant pour la filaggrine, une protéine de structure de la barrière épidermique, étaient responsable

d'une anomalie fonctionnelle de la barrière épidermique et constituait un facteur de risque majeur de DA<sup>104</sup>.

Il est probable que les mécanismes par lesquels une anomalie fonctionnelle de la barrière cutanée entraîne un sur risque de DA se mettent en place très précocement, durant les 2 premiers mois de vie.<sup>137</sup> Dans cette perspective, une anomalie fonctionnelle de la barrière cutanée présente dès la naissance, même transitoire, pourrait constituer un facteur de risque des manifestations atopiques.

L'AG exerce une nette influence sur la fonction barrière cutanée. Ainsi, le *stratum corneum* est mature à la naissance chez l'enfant né à terme et la fonction barrière cutanée est par conséquent quasi normale<sup>101-103</sup>. Pendant la gestation du fœtus, la maturation du *stratum corneum* se complète in utero pendant une période comprise entre 29 et 37 semaines<sup>102</sup>. La fonction barrière cutanée à la naissance est donc considérée comme non fonctionnelle avant l'AG de 29 semaines et sa maturation se complète après la naissance pendant plusieurs semaines. Nos études, réalisées dans une large population de très grands prématurés (nés avant 29 semaines d'AG) constituaient donc une occasion unique d'évaluer le rôle potentiel de cette anomalie fonctionnelle « physiologique » et transitoire de la fonction barrière cutanée du très grand prématuré sur le risque de DA.

Nos études n'ont pas confirmé notre hypothèse de travail initiale qui suggérait que les très grands prématurés auraient un risque de DA plus élevé que les enfants nés à un AG plus élevé. En effet, nous avons montré que les enfants nés avant l'AG de 29 semaines avait un risque plus faible de développer une DA que les enfants prématurés nés à un AG plus élevé et que les enfants nés à terme.

**Les mécanismes physiopathologiques susceptibles d'expliquer nos résultats ne sont pas élucidés mais plusieurs hypothèses peuvent être suggérées.**

**Premièrement**, à l'instar des bactéries commensales digestives, le rôle de la flore bactérienne cutanée commensale semble crucial pour moduler l'immunité cutanée<sup>37</sup>. Ainsi, la stimulation post natale du système immunitaire du nouveau-né prématuré par le microbiote cutané et/ou les bactéries environnementales, à travers une barrière cutanée transitoirement immature et via l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T régulateurs, pourrait conduire à l'induction d'une tolérance immunitaire précoce<sup>138</sup>.

De même, une tolérance immunitaire pourrait être induite par le passage transcutané précoce d'antigènes environnementaux non bactériens. Le rôle potentiel de la diversité du microbiote cutané des nouveau-nés dans les mécanismes de prédisposition aux maladies atopiques et le rôle éventuel des différences de diversité du microbiote cutané entre les nouveau-nés prématurés à terme et est actuellement inconnu.

**Deuxièmement**, la diversité du microbiome digestif est réduite chez le nouveau-né prématuré et se diversifie progressivement après la naissance<sup>139</sup>. La colonisation intestinale par les bifidobactéries est notamment retardée chez le nouveau-né prématuré et dépend en partie de l'AG (cette colonisation ne semble pas se mettre en place avant un AG de 33 semaines)<sup>69</sup>.

Chez le nouveau-né à terme, plusieurs études ont montré que le tube digestif des nouveau-nés à risque atopique est moins diversifié et moins colonisé par certaines bactéries commensales que celui des nouveau-nés non atopiques (cf. étude I). En particulier, le tube digestif des nouveau-nés à risque d'atopie est moins souvent colonisé par des souches de bifidobactéries et plus souvent colonisé par des bactéries potentiellement pathogènes comme *E. Coli* ou *clostridium difficile*. Cette faible diversité du microbiote intestinal chez les nouveau-nés à risque d'atopie précède l'apparition des maladies atopiques ce qui suggère un rôle causal potentiel (cf. étude I).

A l'inverse de nos résultats, ces données seraient donc plutôt susceptibles d'expliquer un risque accru de maladies atopiques chez les prématurés du fait d'une diversité du microbiote intestinal plus faible que celle des nouveau-nés à terme. Ce phénomène n'est donc pas susceptible d'expliquer la diminution du risque de DA chez les nouveau-nés prématurés par rapport aux nouveau-nés à terme observée dans notre étude.

A notre connaissance, une seule étude a évalué la relation entre la diversité du microbiote intestinal du prématuré et le risque de DA. De manière comparable aux études réalisées chez les nouveau-nés à terme, cette étude, réalisée chez 72 nouveau-nés prématurés (AG<32 semaines et/ou poids de naissance <1500g) a montré que le microbiote digestif des nouveau-nés prématurés ayant développé une DA à un an était moins colonisé par des bactéries de type bifidobactéries que celui des nouveau-nés sans DA<sup>140</sup>. Cependant, cette étude n'a pas évalué l'influence de l'AG sur le microbiome digestif et le risque de DA.

Enfin, la perméabilité de la muqueuse intestinale est accrue chez le nouveau-né prématuré par rapport au nouveau-né à terme mais d'une part elle ne semble pas varier avec l'AG au sein des prématurés et d'autre part elle semble se normaliser très rapidement après la naissance (en 2 à 3 jours)<sup>141</sup>. L'effet potentiel de cette hyperperméabilité transitoire de la muqueuse intestinale du nouveau-né prématuré sur l'induction d'une tolérance immunitaire via le passage trans muqueux d'allergènes et sur le risque ultérieur de manifestations atopiques est inconnu.

**Troisièmement**, on sait que pendant la grossesse la balance entre les populations lymphocytaires T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) est en faveur des populations Th-2. L'atopie étant associée à balance Th 2 prédominante, une période plus courte d'exposition aux cytokines Th2 pendant la grossesse due à une naissance prématurée pourrait donc entraîner une modulation du système immunitaire du nouveau-né susceptible d'entraîner une diminution du risque de DA<sup>142</sup>. De plus, la balance Th2 prédominante étant un facteur important pour le maintien de la grossesse, il est possible que les mères atopiques, ayant une balance Th2 prédominante, soient susceptibles d'avoir des grossesses plus prolongées<sup>143</sup>. Enfin, un AG supérieur à 40 semaines (post maturité) et un poids de naissance élevé sont des facteurs associés à une fréquence accrue de manifestations atopiques. La post maturité est associé à un volume faible du thymus chez le nouveau-né. Ceci est susceptible de modifier l'équilibre entre les populations Th1 et Th2 en faveur des populations Th-2<sup>144</sup>. Nos résultats provenant de la cohorte EPIPAGE confirment que le risque de DA est diminué chez les enfants ayant un retard de croissance intra-utérin<sup>99 113</sup>. Au total, il est possible que les antécédents maternels d'atopie puissent influencer la physiologie de la grossesse en faveur d'une grossesse plus longue. Nos résultats provenant de la cohorte EPIPAGE sont en faveur de cette hypothèse car la proportion

de mères atopiques est plus élevée dans la population de référence née à terme que dans la population de prématurés ( $p=0,009$ ).

**Quatrièmement**, il est connu que des facteurs d'agression externe de la peau (comme l'utilisation de savon au pH élevé) sont susceptibles d'entraîner un sur risque de DA<sup>145</sup>. Cependant dans nos études il est peu probable que des pratiques de lavage différentes aient été réalisées en fonction de l'AG des enfants et soient ainsi susceptibles d'expliquer la différence de risque observé pour la DA. Récemment, une étude a montré que le risque d'atopie était plus faible chez des adultes nés prématurés dans les années 70 et 80 par rapport à des témoins nés à terme<sup>99</sup>. Les modifications de pratiques d'hygiène périnatales (mode de lavage, soins locaux, environnement protégé, durée du séjour en couveuse) opérées dans les maternités et dans les services de néonatalogie depuis cette date ne semblent donc pas avoir modifié l'association que nous avons confirmée dans nos deux études portant sur des enfants nés en 1997 et en 2003-2005. De plus, nos deux études portent également sur des cohortes datant de deux périodes différentes au cours desquelles les pratiques périnatales ont été modifiées. Ces arguments ne plaident pas en faveur d'un rôle significatif des pratiques d'hygiène périnatales dans l'association observée entre AG faible et risque de DA.

**Enfin**, une surmortalité des nouveau-nés à risque de DA chez les très grands prématurés pourrait expliquer une prévalence plus faible de la maladie à deux ou cinq ans par rapport aux enfants nés à un AG plus élevé. Nos résultats ne sont pas en faveur de cette explication car les nouveau-nés très grands prématurés inclus dans la cohorte LIFT avaient au contraire plus souvent des antécédents familiaux d'allergies que les nouveau-nés d'AG plus élevé (données non présentées).

**Dans la littérature**, les travaux ayant étudié la relation entre AG et risque de DA ou d'atopie ont produit des résultats discordants. En effet, certaines études ont mis en évidence une association entre prématurité et risque plus faible de DA<sup>110-112</sup> mais d'autres ont mis en évidence une association entre prématurité et sur risque de DA<sup>109</sup> ou d'atopie<sup>118</sup>. Enfin, certaines études n'ont pas mis en évidence de lien significatif entre prématurité et risque de DA<sup>15-17 20 22</sup>

Toutefois, la comparaison directe de ces différentes études est difficile pour plusieurs raisons.

Tout d'abord les méthodologies des études sont hétérogènes. Certaines sont des études cas-témoins et d'autres sont des études de cohorte en population générale ou à risque. En termes de qualité de preuve, l'analyse de données provenant de cohortes en population générale est supérieure aux études cas-témoins.

D'autre part, la définition du critère de jugement est différente selon les études. Certaines études utilisent un questionnaire validé ou non, d'autres un critère fondé sur l'examen clinique des patients. Outre les problèmes liés à l'utilisation d'un questionnaire non validé, ces choix conduisent à des chiffres de prévalence différents. En effet, l'examen clinique conduit à une prévalence ponctuelle, au moment de l'évaluation alors que les questionnaires ont tendance à évaluer une prévalence cumulée sur une période variable.

De plus certaines études ont étudié la prévalence de l'atopie définie selon les recommandations de l'OMS comme une sensibilisation à différents allergènes mis en évidence par une hyperproduction d'IgE spécifiques d'allergènes dans le sérum ou par une hyperréactivité cutanée médiée par les IgE mise en évidence par des tests cutanés aux allergènes (*prick-tests*)<sup>1</sup>. Il est important de différencier cette définition de l'atopie avec celle des *maladies atopiques cliniques* comme la DA ou l'asthme. En effet, une proportion (environ 10%) de patients atteints du phénotype

clinique « dermatite atopique » n'est pas atopique selon la définition de l'OMS<sup>146</sup>. Cette proportion est variable selon les études et les pays, notamment en fonction du mode de recrutement des patients (les patients atopiques sont plus fréquents dans les séries à recrutement hospitalier). Les auteurs ont ainsi proposé de différencier la nosologie de ces patients « non atopiques » de celle des patients « atopiques » en introduisant le concept de *DA intrinsèque*<sup>147</sup> ou de *dermatite atopiforme*<sup>148</sup>. Ainsi, dans certaines études dans lesquelles cette distinction est faite, une association entre prématurité et risque plus faible d'atopie a été mise en évidence sans association entre prématurité et DA.<sup>99</sup>

De plus, la plupart des études ont comparé les prématurés aux enfants nés à terme mais très peu ont comparé différentes catégories d'AG entre elles au sein d'un large groupe de nouveau-nés prématurés.

Enfin, la majorité des études ont un effectif relativement faible, exposant à un manque de puissance pour comparer les groupes entre eux. Ainsi, la majorité des études ont analysé un nombre d'enfant plus faible que celui provenant de nos deux études et nés à un AG plus élevée. A notre connaissance, aucune n'a analysé les données provenant du suivi d'un total de près de 500 nouveau-nés très grands prématurés.

## CONCLUSION

Le résultat principal de ces deux études de cohorte d'enfants prématurés en population générale est que les enfants nés très grands prématurés (AG<29 semaines) ont un risque de DA plus faible que les enfants prématurés nés à un AG plus élevé (29-34 semaines) et que les enfants nés à terme.

Notre hypothèse de travail était que les nouveau-nés très grands prématurés avaient un risque plus élevé de DA en raison d'une fonction barrière cutanée immature dans les premières semaines de vie. Cette hypothèse n'a pas été confirmée et nous avons observé l'association inverse.

La validité de nos résultats s'appuie sur la taille et le caractère indépendant de nos deux cohortes ainsi que sur des données convergentes de la littérature.

Cependant, si des hypothèses mécanistiques peuvent être évoquées pour expliquer cette association, un lien de causalité entre l'âge gestationnel et la risque de DA n'est pas établi et il est nécessaire de poursuivre la recherche dans ce domaine. En particulier, les rôles respectifs du microbiome cutané et digestif, de la maturité de la fonction barrière cutanée et du système immunitaire, de l'environnement allergénique et de l'alimentation néonatale devront être étudiés dans l'avenir.

L'enjeu, au-delà de mieux prédire le risque de manifestations atopiques chez le prématuré, est de mieux comprendre les mécanismes de la marche atopique dans la population générale.

Notre prochaine étape sera d'évaluer le lien entre la fonction barrière cutanée mesurée par la perte transépidermique en eau et l'AG chez les nouveau-nés prématurés. En effet les données disponibles à ce sujet dans la littérature sont anciennes et parcellaires. Cette étude (BACUP :

Barrière CUtané du nouveau-né Prématuré) est promue par le CHU de NANTES et est financée par la fondation Dermatite atopique Pierre Fabre. Elle débutera en 2014 (cf. Annexe 1).

Nous avons étudié les déterminants de la DA chez le nouveau-né à terme et prématuré dans trois études.

Chez le nouveau-né à terme, nous avons montré dans un essai randomisé ayant inclus 97 sujets que l'efficacité d'un lait expérimental contenant un symbiotique (constitué de probiotiques : *Lactobacillus rhamnosus* LCS- 742 et *Bifidobacterium longum subsp infantis* M63) et d'un prébiotique (GOS : 96 % et FOS à chaînes courtes : 4 %) et enrichi en  $\alpha$ -lactalbumine était non inférieure en terme de croissance staturo-pondérale à 6 mois par rapport à un lait standard (étude I). De plus, malgré des effectifs faibles, nous avons montré que l'utilisation de ce lait expérimental était associée à une diminution du risque de DA à 6 mois. D'autre part, notre étude a mis en évidence une relation entre la concentration des selles des nouveau-nés en bifidobactéries et en IgA sécrétoires fécales et une diminution du risque de DA à 6 mois, suggérant un rôle physiopathologique potentiel du symbiotique dans l'induction d'une tolérance immunitaire médiée par une maturation du système immunitaire associé aux muqueuses. Ces résultats méritent d'être confirmés et justifient la mise en place d'un essai randomisé de grande envergure évaluant l'efficacité des probiotiques dans la prévention de la DA, associé à une étude mécanistique comprenant notamment une analyse du microbiote digestif.

Chez le nouveau-né prématuré, nous avons étudié les déterminants de la DA dans deux études portant sur deux cohortes indépendantes en population générale. Nous avons évalué l'influence de l'âge gestationnel et de plusieurs facteurs périnataux sur le risque de DA au sein d'une cohorte nationale d'enfants prématurés nés en 1997 (étude II, cohorte EPIPAGE, n=1836) puis au sein d'une seconde cohorte indépendante régionale récente (étude III, cohorte LIFT, n=493). Après ajustement

sur les facteurs confondant, nous avons mis en évidence que les enfants nés très grands prématurés (AG<29 semaines) avaient un risque plus faible de développer une DA à deux ou cinq ans comparés aux enfants prématurés nés à un AG plus élevé et aux enfants nés à terme. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études de la littérature de plus faibles effectifs mais mettent évidence pour la première fois, au sein d'une population de nouveau-nés prématurés, un « seuil » d'AG (29 semaines) en deçà duquel les enfants semblent protégés du risque de développer une DA. Si les mécanismes impliqués dans la relation entre AG et risque de DA sont hypothétiques, l'immatunité de la fonction barrière cutanée avant l'AG de 29 semaines pourrait être en cause. Ceci justifie de réaliser une étude physiopathologique évaluant précisément la relation entre l'AG des prématurés et la fonction barrière cutanée au cours des premières semaines de vie.

## REFERENCES

1. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004;113(5):832-6.
2. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368(9537):733-43.
3. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358(14):1483-94.
4. Williams HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2005;352(22):2314-24.
5. Halken S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15 Suppl 16:4-5, 9-32.
6. Chamlin SL, Frieden IJ, Williams ML, Chren MM. Effects of atopic dermatitis on young American children and their families. *Pediatrics* 2004;114(3):607-11.
7. Ellis CN, Drake LA, Prendergast MM, Abramovits W, Boguniewicz M, Daniel CR, et al. Cost of atopic dermatitis and eczema in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2002;46(3):361-70.
8. Garn H, Neves JF, Blumberg RS, Renz H. Effect of barrier microbes on organ-based inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013;131(6):1465-78.
9. Hata M, Tokura Y, Takigawa M, Sato M, Shioya Y, Fujikura Y, et al. Assessment of epidermal barrier function by photoacoustic spectrometry in relation to its importance in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2002;82(11):1451-61.
10. Jakasa I, Verberk MM, Esposito M, Bos JD, Kezic S. Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *The Journal of investigative dermatology* 2007;127(1):129-34.
11. Jakasa I, de Jongh CM, Verberk MM, Bos JD, Kezic S. Percutaneous penetration of sodium lauryl sulphate is increased in uninvolved skin of patients with atopic dermatitis compared with control subjects. *The British journal of dermatology* 2006;155(1):104-9.
12. Kelly D, King T, Aminov R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutation research* 2007;622(1-2):58-69.
13. Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature reviews. Immunology* 2012;12(1):9-23.
14. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 2012;336(6080):489-93.
15. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336(6086):1268-73.

16. Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55 Suppl 1:S2-10.
17. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and experimental immunology* 2010;160(1):1-9.
18. Vartiainen E, Petays T, Haahtela T, Jousilahti P, Pekkanen J. Allergic diseases, skin prick test responses, and IgE levels in North Karelia, Finland, and the Republic of Karelia, Russia. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002;109(4):643-8.
19. Xu F, Yan S, Li F, Cai M, Chai W, Wu M, et al. Prevalence of childhood atopic dermatitis: an urban and rural community-based study in Shanghai, China. *PLoS One* 2012;7(5):e36174.
20. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine* 2011;364(8):701-9.
21. Flohr C, Yeo L. Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis revisited. *Current problems in dermatology* 2011;41:1-34.
22. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1999;29(3):342-6.
23. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;107(1):129-34.
24. Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y, et al. Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003;111(3):587-91.
25. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrne S, Orfei L, Aberg N, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;120(2):343-50.
26. Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, Wold AE, Strachan DP, et al. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008;121(1):129-34.
27. Forno E, Onderdonk AB, McCracken J, Litonjua AA, Laskey D, Delaney ML, et al. Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clinical and molecular allergy : CMA* 2008;6:11.
28. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BL, Skov T, Paludan-Muller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011;128(3):646-52 e1-5.
29. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Bjorksten B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012;129(2):434-40, 40 e1-2.
30. Penders J, Gerhold K, Stobberingh EE, Thijs C, Zimmermann K, Lau S, et al. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013;132(3):601-07 e8.

31. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 2007;56(5):661-7.
32. Ismail IH, Oppedisano F, Joseph SJ, Boyle RJ, Licciardi PV, Robins-Browne RM, et al. Reduced gut microbial diversity in early life is associated with later development of eczema but not atopy in high-risk infants. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2012;23(7):674-81.
33. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107(26):11971-5.
34. Gosalbes MJ, Llop S, Valles Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2013;43(2):198-211.
35. Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Bjorksten B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997;86(9):956-61.
36. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997;159(4):1739-45.
37. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy MJ, Salcedo R, Kastenmuller W, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* 2012;337(6098):1115-9.
38. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome research* 2012;22(5):850-9.
39. Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, Koskinen K, Torppa K, Laatikainen T, et al. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(21):8334-9.
40. Gibson GR. Prebiotics as gut microflora management tools. *J Clin Gastroenterol* 2008;42 Suppl 2:S75-9.
41. Schouten B, van Esch BC, Hofman GA, van Doorn SA, Knol J, Nauta AJ, et al. Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. *J Nutr* 2009;139(7):1398-403.
42. Kalliomaki 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(9262):1076-9.
43. Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bottcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Bjorksten B, et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(5):1174-80.
44. Kalliomaki 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(9372):1869-71.
45. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Isolauri E. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(4):1019-21.

46. Kopp MV, Hennemuth I, Heinzmann A, Urbanek R. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of Lactobacillus GG supplementation. *Pediatrics* 2008;121(4):e850-6.
47. Kuitunen M, Kukkonen K, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, et al. Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(2):335-41.
48. Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(1):192-8.
49. Moro G, Arslanoglu S, Stahl B, Jelinek J, Wahn U, Boehm G. A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of disease in childhood* 2006;91(10):814-9.
50. Niers L, Martin R, Rijkers G, Sengers F, Timmerman H, van Uden N, et al. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the PandA study). *Allergy* 2009;64(9):1349-58.
51. Soh SE, Aw M, Gerez I, Chong YS, Rauff M, Ng YP, et al. Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants--effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year. *Clin Exp Allergy* 2009;39(4):571-8.
52. Taylor AL, Dunstan JA, Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(1):184-91.
53. West CE, Hammarstrom ML, Hernell O. Probiotics during weaning reduce the incidence of eczema. *Pediatr Allergy Immunol* 2009;20(5):430-7.
54. Wickens K, Black PN, Stanley TV, Mitchell E, Fitzharris P, Tannock GW, et al. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(4):788-94.
55. Dotterud CK, Storro O, Johnsen R, Oien T. Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomized, double-blind trial. *Br J Dermatol* 2010.
56. Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, et al. Effect of probiotic mix (Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(2 Pt 2):e386-93.
57. Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2011;52(2):238-50.
58. Kukkonen K, Kuitunen M, Haahtela T, Korpela R, Poussa T, Savilahti E. High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol*;21(1 Pt 1):67-73.
59. Marschan E, Kuitunen M, Kukkonen K, Poussa T, Sarnesto A, Haahtela T, et al. Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation. *Clin Exp Allergy* 2008;38(4):611-8.
60. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Mueller M, Radke M, Blaut M. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatric research* 2008;64(4):418-22.

61. Martino DJ, Currie H, Taylor A, Conway P, Prescott SL. Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2008;38(1):69-78.
62. Lien EL, Davis AM, Euler AR. Growth and safety in term infants fed reduced-protein formula with added bovine alpha-lactalbumin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38(2):170-6.
63. Dupont C, Rivero M, Grillon C, Belaroussi N, Kalindjian A, Marin V. Alpha-lactalbumin-enriched and probiotic-supplemented infant formula in infants with colic: growth and gastrointestinal tolerance. *Eur J Clin Nutr* 2010;64(7):765-7.
64. Barr RG, Kramer MS, Boisjoly C, McVey-White L, Pless IB. Parental diary of infant cry and fuss behaviour. *Arch Dis Child* 1988;63(4):380-7.
65. Williams HC, Burney PG, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ, et al. The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 1994;131(3):383-96.
66. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993;186(1):23-31.
67. Fenton TR, Sauve RS. Using the LMS method to calculate z-scores for the Fenton preterm infant growth chart. *Eur J Clin Nutr* 2007;61(12):1380-5.
68. Rouge C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A, et al. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 2010;16(4):362-70.
69. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;44(5):577-82.
70. Sandstrom O, Lonnerdal B, Graverholt G, Hernell O. Effects of alpha-lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropeptide on infant nutrition. *The American journal of clinical nutrition* 2008;87(4):921-8.
71. Heine W, Radke M, Wutzke KD, Peters E, Kundt G. alpha-Lactalbumin-enriched low-protein infant formulas: a comparison to breast milk feeding. *Acta Paediatr* 1996;85(9):1024-8.
72. Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. Lactobacillus reuteri (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics* 2007;119(1):e124-30.
73. Savino F, Palumeri E, Castagno E, Cresi F, Dalmaso P, Cavallo F, et al. Reduction of crying episodes owing to infantile colic: A randomized controlled study on the efficacy of a new infant formula. *Eur J Clin Nutr* 2006;60(11):1304-10.
74. Campeotto F, Suau A, Kapel N, Magne F, Viallon V, Ferraris L, et al. A fermented formula in pre-term infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *The British journal of nutrition* 2011:1-10.
75. Hormansperger G, Clavel T, Haller D. Gut matters: microbe-host interactions in allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012;129(6):1452-9.
76. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy* 2007;62(11):1223-36.

77. Gehring U, Bolte G, Borte M, Bischof W, Fahlbusch B, Wichmann HE, et al. Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001;108(5):847-54.
78. Lau S, Gerhold K, Zimmermann K, Ockeloen CW, Rossberg S, Wagner P, et al. Oral application of bacterial lysate in infancy decreases the risk of atopic dermatitis in children with 1 atopic parent in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(4):1040-7.
79. Johnke H, Vach W, Norberg LA, Bindslev-Jensen C, Host A, Andersen KE. A comparison between criteria for diagnosing atopic eczema in infants. *The British journal of dermatology* 2005;153(2):352-8.
80. Gore C, Custovic A, Tannock GW, Munro K, Kerry G, Johnson K, et al. Treatment and secondary prevention effects of the probiotics *Lactobacillus paracasei* or *Bifidobacterium lactis* on early infant eczema: randomized controlled trial with follow-up until age 3 years. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2012;42(1):112-22.
81. van der Aa LB, Heymans HS, van Aalderen WM, Sprikkelman AB. Probiotics and prebiotics in atopic dermatitis: review of the theoretical background and clinical evidence. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2010;21(2 Pt 2):e355-67.
82. Gruber C, Wendt M, Sulser C, Lau S, Kulig M, Wahn U, et al. Randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus rhamnosus* GG as treatment of atopic dermatitis in infancy. *Allergy* 2007;62(11):1270-6.
83. Folster-Holst R, Muller F, Schnopp N, Abeck D, Kreiselmaier I, Lenz T, et al. Prospective, randomized controlled trial on *Lactobacillus rhamnosus* in infants with moderate to severe atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 2006;155(6):1256-61.
84. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2009;39(8):1117-27.
85. Passeron T, Lacour JP, Fontas E, Ortonne JP. Prebiotics and synbiotics: two promising approaches for the treatment of atopic dermatitis in children above 2 years. *Allergy* 2006;61(4):431-7.
86. Wu KG, Li TH, Peng HJ. *Lactobacillus salivarius* plus fructo-oligosaccharide is superior to fructo-oligosaccharide alone for treating children with moderate to severe atopic dermatitis: a double-blind, randomized, clinical trial of efficacy and safety. *The British journal of dermatology* 2012;166(1):129-36.
87. Boyle RJ, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall FJ, Tang ML. Probiotics for the treatment or prevention of eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009;123(1):266-7; author reply 67.
88. Lee J, Seto D, Bielory L. Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008;121(1):116-21 e11.
89. Inoue R, Nishio A, Fukushima Y, Ushida K. Oral treatment with probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) for a specific part of the weaning period prevents the development of atopic dermatitis induced after maturation in model mice, NC/Nga. *Br J Dermatol* 2007;156(3):499-509.
90. Pelucchi C, Chatenoud L, Turati F, Galeone C, Moja L, Bach JF, et al. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis. *Epidemiology* 2012;23(3):402-14.

91. Gruber C, van Stuijvenberg M, Mosca F, Moro G, Chirico G, Braegger CP, et al. Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010;126(4):791-7.
92. Westerbeek EA, van den Berg JP, Lafeber HN, Fetter WP, Boehm G, Twisk JW, et al. Neutral and acidic oligosaccharides in preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American journal of clinical nutrition* 2010;91(3):679-86.
93. Ziegler E, Vanderhoof JA, Petschow B, Mitmesser SH, Stolz SI, Harris CL, et al. Term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics grow normally and have soft stools similar to those reported for breast-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2007;44(3):359-64.
94. Osborn DA, Sinn JK. Prebiotics in infants for prevention of allergy. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013;3:CD006474.
95. Puccio G, Cajozzo C, Meli F, Rochat F, Grathwohl D, Steenhout P. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition* 2007;23(1):1-8.
96. Vlieger AM, Robroch A, van Buuren S, Kiers J, Rijkers G, Benninga MA, et al. Tolerance and safety of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in combination with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in a prebiotic-containing infant formula: a randomised controlled trial. *The British journal of nutrition* 2009;102(6):869-75.
97. Chouraqui JP, Grathwohl D, Labaune JM, Hascoet JM, de Montgolfier I, Leclaire M, et al. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition* 2008;87(5):1365-73.
98. Gillman MW. Developmental origins of health and disease. *N Engl J Med* 2005;353(17):1848-50.
99. Siltanen M, Wehkalampi K, Hovi P, Eriksson JG, Strang-Karlsson S, Jarvenpaa AL, et al. Preterm birth reduces the incidence of atopy in adulthood. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(4):935-42.
100. Miller A, Lider O, Abramsky O, Weiner HL. Orally administered myelin basic protein in neonates primes for immune responses and enhances experimental autoimmune encephalomyelitis in adult animals. *European journal of immunology* 1994;24(5):1026-32.
101. Fluhr JW, Darlenski R, Taieb A, Hachem JP, Baudouin C, Msika P, et al. Functional skin adaptation in infancy - almost complete but not fully competent. *Exp Dermatol* 2010;19(6):483-92.
102. Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol* 1998;111(2):320-6.
103. Fluhr JW, Darlenski R, Lachmann N, Baudouin C, Msika P, De Belilovsky C, et al. Infant epidermal skin physiology: adaptation after birth. *Br J Dermatol* 2012;166(3):483-90.
104. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics* 2006;38(4):441-6.
105. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011;365(14):1315-27.
106. van den Oord RA, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009;339:b2433.

107. Boralevi F, Hubiche T, Leaute-Labreze C, Saubusse E, Fayon M, Roul S, et al. Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants - determining the role of epidermal barrier impairment. *Allergy* 2008;63(2):205-10.
108. Brown SJ, Asai Y, Cordell HJ, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011;127(3):661-7.
109. Lucas A, Brooke OG, Cole TJ, Morley R, Bamford MF. Food and drug reactions, wheezing, and eczema in preterm infants. *Arch Dis Child* 1990;65(4):411-5.
110. Govaere E, Van Gysel D, Verhamme KM, Doli E, Oranje AP, De Baets F. The prevalence, characteristics of and risk factors for eczema in Belgian schoolchildren. *Pediatr Dermatol* 2009;26(2):129-38.
111. Buhner C, Grimmer I, Niggemann B, Obladen M. Low 1-year prevalence of atopic eczema in very low birthweight infants. *Lancet* 1999;353(9165):1674.
112. David TJ, Ewing CI. Atopic eczema and preterm birth. *Arch Dis Child* 1988;63(4):435-6.
113. Lundholm C, Ortqvist AK, Lichtenstein P, Cnattingius S, Almquist C. Impaired fetal growth decreases the risk of childhood atopic eczema: a Swedish twin study. *Clin Exp Allergy* 2010;40(7):1044-53.
114. Kvenshagen B, Jacobsen M, Halvorsen R. Atopic dermatitis in premature and term children. *Arch Dis Child* 2009;94(3):202-5.
115. Siltanen M, Kajosaari M, Pohjavuori M, Savilahti E. Prematurity at birth reduces the long-term risk of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(2):229-34.
116. Steffensen FH, Sorensen HT, Gillman MW, Rothman KJ, Sabroe S, Fischer P, et al. Low birth weight and preterm delivery as risk factors for asthma and atopic dermatitis in young adult males. *Epidemiology* 2000;11(2):185-8.
117. Olesen AB, Ellingsen AR, Olesen H, Juul S, Thestrup-Pedersen K. Atopic dermatitis and birth factors: historical follow up by record linkage. *BMJ* 1997;314(7086):1003-8.
118. Pekkanen J, Xu B, Jarvelin MR. Gestational age and occurrence of atopy at age 31--a prospective birth cohort study in Finland. *Clin Exp Allergy* 2001;31(1):95-102.
119. Mai XM, Gaddlin PO, Nilsson L, Finnstrom O, Bjorksten B, Jenmalm MC, et al. Asthma, lung function and allergy in 12-year-old children with very low birth weight: a prospective study. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2003;14(3):184-92.
120. Larroque B, Breart G, Kaminski M, Dehan M, Andre M, Burguet A, et al. Survival of very preterm infants: Epipage, a population based cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89(2):F139-44.
121. Roze JC, Bureau-Rouger V, Beucher A, Branger B, Boudierlique C, Flurin V, et al. [Follow-up network for newborns at risk for handicap in a French region]. *Arch Pediatr* 2007;14 Suppl 1:S65-70.
122. Marret S, Ancel PY, Marpeau L, Marchand L, Pierrat V, Larroque B, et al. Neonatal and 5-year outcomes after birth at 30-34 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 2007;110(1):72-80.
123. Flohr C, Nagel G, Weinmayr G, Kleiner A, Strachan DP, Williams HC. Lack of evidence for a protective effect of prolonged breastfeeding on childhood eczema: lessons from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Two. *Br J Dermatol* 2011;165(6):1280-9.

124. Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Gruber C, Niggemann B, et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004;113(5):925-31.
125. Eller E, Kjaer HF, Host A, Andersen KE, Bindslev-Jensen C. Development of atopic dermatitis in the DARC birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(2 Pt 1):307-14.
126. Tariq SM, Matthews SM, Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW. The prevalence of and risk factors for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1998;101(5):587-93.
127. Jaakkola JJ, Ahmed P, Ieromnimon A, Goepfert P, Laiou E, Quansah R, et al. Preterm delivery and asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(4):823-30.
128. Zachariassen G, Faerk J, Esberg BH, Fenger-Gron J, Mortensen S, Christesen HT, et al. Allergic diseases among very preterm infants according to nutrition after hospital discharge. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(5):515-20.
129. Blondel B, Norton J, du Mazaubrun C, Breart G. [Development of the main indicators of perinatal health in metropolitan France between 1995 and 1998. Results of the national perinatal survey]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2001;30(6):552-64.
130. Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health. *The Journal of investigative dermatology* 2011;131(1):67-73.
131. Ancel PY, Livinec F, Larroque B, Marret S, Arnaud C, Pierrat V, et al. Cerebral palsy among very preterm children in relation to gestational age and neonatal ultrasound abnormalities: the EPIPAGE cohort study. *Pediatrics* 2006;117(3):828-35.
132. Marret S, Marchand L, Kaminski M, Larroque B, Arnaud C, Truffert P, et al. Prenatal low-dose aspirin and neurobehavioral outcomes of children born very preterm. *Pediatrics* 2010;125(1):e29-34.
133. Hogewoning AA, Bouwes Bavinck JN, Amoah AS, Boakye DA, Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, et al. Point and period prevalences of eczema in rural and urban schoolchildren in Ghana, Gabon and Rwanda. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011.
134. Fleming S, Bodner C, Devereux G, Russell G, Campbell D, Godden D, et al. An application of the United Kingdom Working Party diagnostic criteria for atopic dermatitis in Scottish infants. *J Invest Dermatol* 2001;117(6):1526-30.
135. Laughter D, Istvan JA, Tofte SJ, Hanifin JM. The prevalence of atopic dermatitis in Oregon schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 2000;43(4):649-55.
136. Kramer U, Schafer T, Behrendt H, Ring J. The influence of cultural and educational factors on the validity of symptom and diagnosis questions for atopic eczema. *The British journal of dermatology* 1998;139(6):1040-6.
137. Flohr C, Perkin M, Logan K, Marrs T, Radulovic S, Campbell LE, et al. Atopic Dermatitis and Disease Severity are the Main Risk Factors for Food Sensitization in Exclusively Breastfed Infants. *The Journal of investigative dermatology* 2013.
138. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy* 2006;61(7):796-807.
139. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 2011;158(3):390-6.

140. Van Zwol A, Van Den Berg A, Knol J, Twisk JW, Fetter WP, Van Elburg RM. Intestinal microbiota in allergic and nonallergic 1-year-old very low birth weight infants after neonatal glutamine supplementation. *Acta Paediatr* 2010;99(12):1868-74.
141. van Elburg RM, Fetter WP, Bunkers CM, Heymans HS. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 2003;88(1):F52-5.
142. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14(7):353-6.
143. Nilsson L, Kjellman NI, Lofman O, Bjorksten B. Parity among atopic and non-atopic mothers. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 1997;8(3):134-6.
144. Godfrey KM, Barker DJ, Osmond C. Disproportionate fetal growth and raised IgE concentration in adult life. *Clin Exp Allergy* 1994;24(7):641-8.
145. Sherriff A, Golding J. Hygiene levels in a contemporary population cohort are associated with wheezing and atopic eczema in preschool infants. *Arch Dis Child* 2002;87(1):26-9.
146. Flohr C, Johansson SG, Wahlgren CF, Williams H. How atopic is atopic dermatitis? *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004;114(1):150-8.
147. Roguedas-Contios AM, Misery L. What is intrinsic atopic dermatitis? *Clinical reviews in allergy & immunology* 2011;41(3):233-6.
148. Brenninkmeijer EE, Spuls PI, Legierse CM, Lindeboom R, Smitt JH, Bos JD. Clinical differences between atopic and atopiform dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2008;58(3):407-14.

## REMERCIEMENTS

Je souhaite sincèrement remercier Juliette MAZEREEUW-HAUTIER, Jean-Philippe LACOUR, Franck BORALEVI, Jean-François STALDER, Dominique DARMAUN et Gérard LORETTE pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie particulièrement Jean-François STALDER pour sa confiance et pour m'avoir initié à la dermatologie pédiatrique.

Je remercie Pierre-Yves ANCEL pour ses précieux conseils et la co-direction de cette thèse.

Je remercie Franck BORALEVI pour son soutien, son amitié et sa participation aux comités de thèse.

Je remercie l'équipe d'EPIPAGE et particulièrement Béatrice Larroque.

Je remercie chaleureusement mes collègues pédiatres impliqués dans l'étude LIFT pour leur aide et particulièrement Hélène COLAS, Emilie GARROT et Christèle GRAS-LEGUEN

Je remercie les collègues impliqués dans l'étude PETUNIA: MJ Butel, N Kapel, AJ Waligora-Dupriet, I. De Montgolfier, M. Leblanc, N. Godon, P. Soulaines, D. Darmaun, M. Rivero, C. Dupont

Je remercie Mohamed HAMIDOU et Albert DAVID parcequ'ils sont pour moi des exemples et des guides.

Je remercie Jaafar BENNOUNA pour ses conseils

Je remercie mes collègues et amies du service de dermatologie du CHU de Nantes pour leur aide pendant mes absences et leur soutien souriant pendant ces années : Hélène AUBERT, Claire BERNIER et Muriel HELLO.

Enfin je souhaite remercier tout particulièrement Jean-Christophe ROZE, mon directeur de thèse, pour son soutien constant et attentif, son amitié et son aide considérable pendant ces trois années.

Je dédie cette thèse aux patients et à leurs parents,

A mon épouse Véronique

A mes filles Marie, Julie, Camille et Clara

A mes parents.

## AN A-LACTALBUMIN-ENRICHED AND SYMBIOTIC SUPPLEMENTED V. A STANDARD INFANT FORMULA: A MULTICENTRE, DOUBLE-BLIND, RANDOMISED TRIAL.

British Journal of Nutrition, page 1 of 7  
© The Authors 2011

doi:10.1017/S000711451100479X

### An $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented v. a standard infant formula: a multicentre, double-blind, randomised trial

Jean-Christophe Rozé<sup>1,2,3\*</sup>, Sébastien Barbarot<sup>4</sup>, Marie-José Butel<sup>5</sup>, Nathalie Kapel<sup>5</sup>, Anne-Judith Waligora-Dupriet<sup>5</sup>, Inès De Montgolfier<sup>6</sup>, Magali Leblanc<sup>7</sup>, Nathalie Godon<sup>1</sup>, Pascale Soulaïnes<sup>8</sup>, Dominique Darmaun<sup>3</sup>, Montserrat Rivero<sup>9</sup> and Christophe Dupont<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Department of Neonatal Medicine, Nantes University Hospital, Boulevard Jean Monet, 44000 Nantes, France

<sup>2</sup>INSERM, CIC004, Nantes University Hospital, Nantes, France

<sup>3</sup>INRA UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, INRA and University of Nantes, Human Nutrition Research Centre (CRNH), Nantes, France

<sup>4</sup>Department of Dermatology, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France

<sup>5</sup>EA 4065, Ecosystème Intestinal, Probiotiques, Antibiotiques, Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>6</sup>Department of Neonatal Medicine, Trousseau Hospital, Paris, France

<sup>7</sup>Department of Neonatal Medicine, Angers University Hospital, Angers, France

<sup>8</sup>Department of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, Necker-Enfants Malades Hospital, Paris, France

<sup>9</sup>Research and Development Department, Ordessa Group, Barcelona, Spain

(Received 1 April 2011 – Revised 27 July 2011 – Accepted 27 July 2011)

#### Abstract

The aim of the present study was to evaluate the safety, tolerance and preventive effect on atopic dermatitis of an experimental  $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented infant formula. A total of ninety-seven non-breastfed term neonates were enrolled into a double-blind, multicentre, randomised controlled trial in which they received experimental (*n* 48) or standard formula (*n* 49) for 6 months. The primary outcome was weight at 6 months of age. Secondary outcomes were gastrointestinal tolerance and manifestation of atopic dermatitis. Faecal secretory IgA (SIgA) concentration and microbiota composition of forty-three infants were analysed at 1 and 6 months. Growth was similar in both groups. At 1 month, compared to those in the control group, infants in the experimental group exhibited less crying or agitation, and more quiet behaviour ( $P=0.05$ ). At 6 months, atopic dermatitis was less frequently observed in the experimental group ( $P<0.05$ ). Decrease of faecal SIgA concentration between 1 and 6 months was mainly observed in the control group. This decrease was significantly associated with atopic dermatitis ( $P<0.014$ ) and negatively correlated to the level of colonisation by bifidobacteria ( $P<0.005$ ). In conclusion, compared to the control formula, the experimental formula guaranteed a similar growth, was better tolerated at 1 month and had a protective effect against the development of atopic dermatitis.

**Key words:** Growth; Symbiotics;  $\alpha$ -Lactalbumin; Faecal IgA; Microbiota; Neonates

Several modifications have been proposed to improve the quality of infant formulas. Enrichment in  $\alpha$ -lactalbumin, the dominant whey protein in human milk, improves the amino-acid profile<sup>(1)</sup> while reducing the total protein content<sup>(2,3)</sup>, and may have a positive effect on infant well-being and behaviour by reducing gastrointestinal side-effects<sup>(1,3,4)</sup>.  $\alpha$ -Lactalbumin is a known immunomodulator present in human milk. This effect comes from its ability to form complexes with other glycoproteins of the milk<sup>(5)</sup>. For example,  $\alpha$ -lactalbumin alters the degradation of soluble CD14 in the gastrointestinal tract. This glycoprotein is an important immunomodulator that shows several beneficial effects, one of them being

the reduction of the inflammatory response to pathogenic bacteria<sup>(6)</sup>. Supplementation with prebiotics, probiotics or symbiotics (mixtures of probiotics and prebiotics) has been proposed, based on clinical and laboratory observations of reduced atopic dermatitis, increased faecal IgA and modified composition of the microbiota<sup>(6)</sup> in adults and infants<sup>(7–9)</sup>.

To determine the safety, tolerance and preventive effect on atopic dermatitis of an experimental  $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented infant formula, we assessed in priority the growth of the infants by measuring their weight; then we observed the gastrointestinal tolerance of the formula, the occurrence of atopic dermatitis manifestations,

**Abbreviations:** CFU, colony-forming unit; SIgA, secretory IgA.

\* **Corresponding author:** Professor J.-C. Rozé, fax +33 240 083 556, email jcroze@chu-nantes.fr

faecal secretory IgA (SIgA) concentration and microbiota composition in a double-blind, multicentre, randomised, controlled trial enrolling infants whom their mothers declined to breastfeed.

## Materials and methods

### Study population

Four centres participated in the present trial (Mother-and-Child Hospital, Nantes, France; Children's Hospital, Angers, France; Hospital Saint-Vincent de Paul and Hospital Salpêtrière, APHP, Paris, France). This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Medical Ethics Committee of Nantes (CCPRB). Written informed parental consent was obtained for each infant before inclusion. To be eligible for enrolment in the present study, infants had to meet the following inclusion criteria: a gestational age >37 weeks, a postnatal age less than 3 d, fed from birth with probiotic- and prebiotic-free infant formula, and without human milk before inclusion. This trial was registered under number NCT00920166.

### Formulas

The experimental formula was characterised by the presence of two strains of probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* LCS-742 and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* M63) and by the addition of prebiotics: 96% galacto-oligosaccharides and 4% short-chain fructo-oligosaccharides.

This formula was also enriched with bovine  $\alpha$ -lactalbumin, using a native whey protein concentrate with high  $\alpha$ -lactalbumin concentration (34% of soluble proteins) obtained using careful fractionation techniques (ultrafiltration). Whey protein concentrate was blended with all other macro- and micronutrients in the formula liquid phase and was finally spray-dried. Amounts of native or complexed  $\alpha$ -lactalbumin in the final infant formula were not determined.

### Randomisation, formula and compliance

After inclusion, infants were randomly assigned to the experimental or control formula (Table 1). Both patients and treating physicians were blinded to treatment group assignment. Each product was identified by a number randomly allocated using a software. This number was written on a double label: one remained on the can for identification and the other in the follow-up book. For each can, a sealed envelope with the corresponding formula was sent to the investigator and the coordinator. Envelopes could be opened if required for the baby's health. In this case, the reason, person and date had to be reported on the envelope itself and the baby was automatically removed from the trial. Parents received boxes of infant formula containing blinded experimental or control formula. The intervention ended at 6 months of age. Compliance was measured by counting the number of empty returned boxes at each clinic visit. Compliance was defined

as good if the expected number of empty cans was returned and no change of formula was declared (see details in Fig. 1).

### Clinical assessment

Anthropometric measurements, such as weight, length, BMI, cranial perimeter, were performed at birth. Two clinical visits were scheduled at 1 and 6 months of age. The following data were collected during these visits: anthropometric measurements, dermatological examination and scoring atopic dermatitis (SCORAD) index calculation, sleeping time and general well-being using structured interviews<sup>(10)</sup>. Data pertaining to formula intake for each meal, bowel habits and stool consistency over the 3 d before each visit were also collected from a home diary kept by the parents. For atopic dermatitis, we used the UK Working Party's diagnostic criteria and the SCORAD index was calculated to assess severity<sup>(11)</sup>. We used the WHO growth curves<sup>(12)</sup> to calculate Z-score according to the least mean squares method.

### Biological assessment

In two centres located in Paris, stool samples were collected by parents at 1 and 6 months in sterile containers, immediately placed in an anaerobic atmosphere (GENbag anaer<sup>®</sup>-bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and transferred to the laboratory for bacterial analyses. Samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  immediately after collection during the clinical visit. Qualitative and quantitative analysis of the faecal microbiota allowing the isolation and quantification of the main genera were performed by spreading dilutions of the stools on various media, as described previously<sup>(13)</sup>. Bacterial counts were expressed as  $\log_{10}$  colony-forming units (CFU)/g of faeces, and the count threshold was  $3 \log_{10}$  CFU/g of faeces. Identification of lactobacilli and bifidobacteria was performed

Table 1. Control and experimental formula compositions

	Control formula per 100 ml	Experimental formula per 100 ml
Energy		
kJ	17.2	16.2
kcal	72	68
Protein (g)	1.5	1.4
Casein (%)	50	40
Whey proteins (%)	50	60
$\alpha$ -Lactalbumin (g)	–	0.3
Carbohydrates (g)	8.9	7.6
Lactose (g)	6.3	5.3
Maltodextrin (g)	2.6	2.3
Fats (g)	3.4	3.5
Linoleic acid (mg)	550	540
$\alpha$ -Linolenic acid (mg)	51	53
AA (mg)	–	12.6
DHA (mg)	–	7
Symbiotics	–	–
FOS (g)	–	0.02
GOS (g)	–	0.40
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LCS-742 (CFU)	–	$1.4 \times 10^8$
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> M63 (CFU)	–	$1.4 \times 10^8$

AA, arachidonic acid; FOS, fructo-oligosaccharides; GOS, galacto-oligosaccharides.

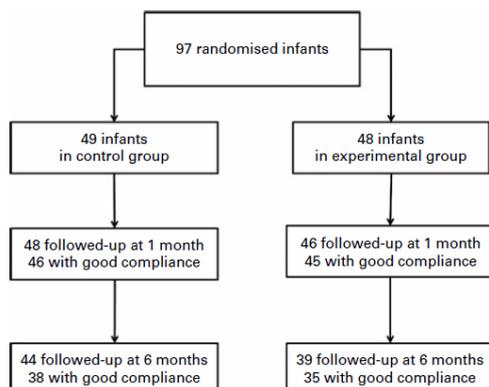


Fig. 1. Flow diagram of the progress of patients through the study.

using macroscopic aspects of colonies, microscopic characteristics and PCR using primers specific for genus and species, and 16S rDNA sequencing (Genome express, Meylan, France), as described previously<sup>(14)</sup>.

Faecal SIgA were determined by ELISA using NUNC Immuno plates (Maxisorp F96, Roskilde, Denmark). Plates were coated for 1 h at 37°C and incubated overnight at 4°C with 1 mg/l antibody to human secretory component (Dako-Glostrup, Glostrup, Denmark) in veronal buffer (25 mmol/l; pH 8.6). Non-specific binding sites were blocked using PBS pH 7.2 containing 1% bovine serum albumin. Serial two-fold dilutions of tested samples and purified human SIgA (Cappel, ICN, Aurora, CO, USA) were added to the wells. The plates were incubated for 1 h at 37°C under agitation,

then washed, and incubated for 1 h under agitation with 0.25 µg/l horseradish peroxidase-conjugated rabbit antibody to human IgA (Dako-Glostrup). Addition of *O*-phenyl diamine triggered the reaction. Absorbance was read at 492 nm and quantitative results were determined by reference to the standard curves.

#### Statistical analysis

The primary outcome was weight at 6 months of age. The trial was a non-inferiority trial that compared the experimental formula to a control formula: a 300 g difference at 6 months between groups was deemed acceptable. The trial was designed to compare the experimental formula to a control formula. A sample size of forty-five infants in each group provided 80% power to detect this non-inferiority difference of 300 g, at a 5% one-sided significance level. Standard deviations of anthropometric Z-scores were calculated using the 2006 WHO growth standards. Data were analysed based on the intention-to-treat strategy. A per-protocol analysis was performed to confirm the intention-to-treat analysis. The final statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software (Chicago, IL, USA). Student's *t* test, or the Mann-Whitney *U* test when appropriate, was used for the comparison of continuous variables, and a  $\chi^2$  test, or Fisher's exact test when appropriate, was used for comparison of categorical variables. A receiver operating characteristic curve was constructed to analyse the predictive relationship between the 1- to 6-month variation in SIgA concentrations and dermatological lesions at month 6. Logistic regression was performed to analyse the relationship between atopic dermatitis and formula after adjustment for family history of atopy and caesarean section.

Table 2. Characteristics at inclusion  
(Number, percentage, mean values and standard deviations)

	Control group (n 49)		Experimental group (n 48)		P
	Mean	SD	Mean	SD	
Perinatal characteristics					
Female					0.09
<i>n</i>	19		27		
%	38.8		56.3		
Maternal antibiotherapy					0.40
<i>n</i>	8		5		
%	16.3		10.4		
History of allergic disease					0.18
<i>n</i>	25		18		
%	51.0		37.5		
Gestational age (weeks)	39.3	1.1	39.4	1.2	0.85
Mode of birth: Caesarean					0.32
<i>n</i>	4		7		
%	8.2		14.6		
Anthropometric measurements					
Weight (g)	3350	440	3300	390	0.66
Weight-for-age Z-scores	0.1	0.9	0.0	0.8	0.89
Height (cm)	49.6	1.8	49.3	1.9	0.52
Height-for-age Z-score	0.0	0.9	-0.1	1.0	0.75
Head circumference (cm)	34.7	1.2	34.4	1.2	0.26
Head circumference for age Z-score	0.3	0.9	0.2	1.0	0.49

## Results

### Intention-to-treat analysis

At birth, ninety-seven infants were enrolled, forty-eight in the experimental and forty-nine in the control group. No statistically significant differences for perinatal characteristics were observed (Table 2).

At 1 month (Table 3), forty-six out of forty-eight experimental and forty-eight out of forty-nine control infants were examined. Growth was not significantly different between the two groups. During the 3 d preceding the 1-month clinical visit, infants exhibited less crying or agitation, and more quiet behaviour in the experimental group than in the control group ( $P=0.03$ ). No other clinical differences were found. During the first month, one infant in the experimental group and two infants in the control group received antibiotherapy. Stools of twenty infants in the experimental group and twenty-three in the control group showed significantly lower incidence ( $P=0.02$ ) and level of colonisation ( $P=0.009$ ) by staphylococci in the experimental group. The level of colonisation by lactobacilli was higher in the experimental than

in the control group (respectively, 8.0 (SD 1.0) *v.* 6.0 (SD 1.1) CFU/g of faeces,  $P<0.001$ ).

At 6 months (Table 4), thirty-nine out of forty-eight of experimental and forty-four out of forty-nine of control infants were seen. Weight was not statistically different between the groups, but a trend towards higher weight-for-age ( $P=0.053$ ) and head circumference-for-age ( $P=0.061$ ) Z-scores was observed in the experimental group (see Table 4). Atopic dermatitis was less frequently observed in the experimental group ( $P<0.05$ ). The association tended to be significant after adjustment for family history of allergic disease and caesarean section: OR 0.12 (95% CI 0.02, 1.04,  $P=0.05$ ). However, the SCORAD measured during the 6-month clinical visit was not significantly different between the groups ( $P=0.40$ ). No other clinical differences were observed except a trend to receive less frequently antibiotics in the experimental group: six out of thirty-nine (15.4%) *v.* fourteen out of forty-four (31.8%) in the control group,  $P=0.08$ . The level of colonisation by staphylococci was significantly lower with the experimental formula (respectively, 1.4 (SD 2.6) *v.* 3.9 (SD 2.9) CFU/g of faeces,  $P=0.02$ ), while that of lactobacilli

**Table 3.** Outcome measurements at 1 month (intention-to-treat) (Number, percentage, mean values and standard deviations)

	Control group		Experimental group		P
	Mean	SD	Mean	SD	
1 month (n)	45		43		
Anthropometric measurements					
Weight (g)	4390.4	624.7	4307.7	475.0	0.515
Weight-for-age Z-score	-0.1599	0.774	-0.1577	0.665	0.991
Height (cm)	53.73	2.06	53.78	2.02	0.917
Height-for-age Z-score	-0.4731	0.863	-0.3166	0.853	0.395
Head circumference (cm)	37.70	1.28	37.32	1.30	0.170
Head circumference for age Z-score	0.4649	0.8968	0.2774	0.8662	0.322
Gastrointestinal tolerance and atopic dermatitis					
Daily mean ingested volume (ml)	597	110	580	114	0.59
Number of regurgitations per d (n)	0.9	1.4	1.0	1.2	0.80
Number of stools a day (n)	1.5	1.0	2	1.1	0.05
Daily duration of crying or agitation (min)	89.3	33.2	75.6	22.3	0.03
Daily duration of sucking thumb (min)	190.0	42.8	214.6	38.8	0.03
Atopic dermatitis					
n	5		2		
%	11.1		4.7		
Stool analysis (n)					
SigA ( $\mu$ g/g)	1620	1137	1892	1635	0.53
Colonisation with <i>Staphylococci</i>					
n	20		11		
%	87.0		55.0		0.02
Colonisation with <i>Clostridium</i>					
n	16		14		
%	69.6		70.0		0.97
Colonisation with <i>Bacteroides</i>					
n	13		8		
%	56.5		40.0		0.82
Colonisation with <i>Lactobacilli</i>					
n	23		19		
%	100.0		95.0		0.93*
Colonisation with <i>Bifidobacteria</i>					
n	17		19		
%	73.9		95.0		0.14*

SigA, secretory IgA.  
\* Fisher's exact test.

and bifidobacteria tended to be higher (respectively, 6.8 (SD 2.9) *v.* 5.0 (SD 2.4) CFU/g of faeces,  $P=0.06$ , and 10.6 (SD 0.3) *v.* 9.0 (SD 3.3) CFU/g of faeces,  $P=0.07$ ). The variation of SIgA between 1 and 6 months was significantly different between the groups. At 6 months, SIgA were at similar high levels to that found at 1 month in the experimental group, whereas they decreased in the control group. The SIgA decrease between 1 and 6 months was significantly associated with atopic dermatitis (Fig. 2) and negatively correlated to the level of colonisation by bifidobacteria ( $R^2$  0.27,  $P<0.005$ ). There was a trend towards an association between the level of colonisation by bifidobacteria and a lower risk of atopic dermatitis (OR 0.60 per log CFU (95% CI 0.34, 1.07)).

#### Per-protocol analysis

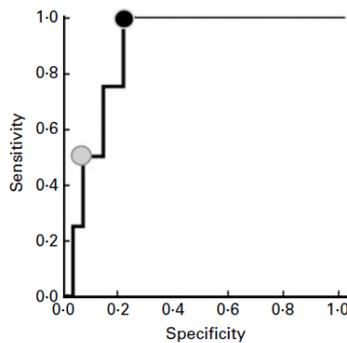
Among the ninety-seven infants enrolled, seventy-three had good compliance and these were equally distributed between the two groups: thirty-five in the experimental group and thirty-eight in the control group ( $P=0.91$ ). The reasons for non-compliance were not significantly different between groups: poor digestive tolerance in four out of thirteen in

the experimental group *v.* seven out of eleven of the control group ( $P=0.11$ ), poor parental compliance in four out of thirteen *v.* one out of eleven ( $P=0.43$ ). Per-protocol analysis showed the same main results as that found in the intention-to-treat analysis. At 1 month, infants exhibited less crying or agitation during the 3 d preceding the 1-month visit in the experimental group than in the control group ( $P<0.02$ ). At 6 months, we did not observe any significant difference between the experimental and the control groups in weight (respectively, 8100 (SD 840) *v.* 7940 (SD 770) g,  $P=0.40$ ), weight Z-score (0.46 (SD 0.89) *v.* 0.23 (SD 0.82),  $P=0.26$ ), height (67.5 (SD 2.7) *v.* 67.2 (SD 2.5) cm,  $P=0.64$ ), height Z-score (0.30 (SD 1.08) *v.* 0.10 (SD 1.08),  $P=0.41$ ) or head circumference (44.0 (SD 1.5) *v.* 43.6 (SD 1.1) cm,  $P=0.19$ ). The only difference observed was a trend towards a higher head circumference Z-score in the experimental group (0.96 (SD 0.92) *v.* 0.56 (SD 0.84),  $P=0.05$ ). The daily mean ingested volume tended to be higher in the experimental group: 750 (SD 108) *v.* 690 (SD 120) ml/d,  $P=0.08$ . We observed 0/35 in the experimental group ( $P=0.06$ ) *v.* five out of thirty-eight atopic dermatitis in the control group. After adjustment for family history of allergic disease and caesarean section,

**Table 4.** Outcome measurements at 6 months (intention-to-treat) (Number, percentage, mean values and standard deviations)

	Control group		Experimental group		P
	Mean	SD	Mean	SD	
6 months (n)	45		39		
Anthropometric measurements					
Weight (g)	7769.8	918.1	8015.7	834.7	0.193
Weight-for-age Z-score	0.0981	0.8706	0.4715	0.8704	0.053
Height (cm)	66.72	3.31	67.07	2.67	0.980
Height-for-age Z-score	-0.0177	1.124	0.2647	1.0423	0.239
Head circumference (cm)	43.53	1.35	43.77	1.50	0.620
Head circumference for age Z-score	0.5614	0.8580	0.9374	0.9430	0.061
Gastrointestinal tolerance and atopic dermatitis					
Daily mean ingested volume (ml)	680	155	740	119	0.09
Number of regurgitations a day (n)	0.4	0.9	0.6	1.1	0.30
Number of stools a day (n)	1.2	0.9	1.5	1.1	0.28
Daily duration of crying or agitation (min)	48.8	23.4	42.5	23.8	0.25
Daily duration of sucking thumb (min)	185	32	172	41	0.28
Atopic dermatitis					0.03*
n		8		1	
%		17.8		2.6	
Stool analysis (n)		18		16	
SIgA ( $\mu$ g/g)	1322	840	1869	1624	0.21
Difference in SIgA between 1 and 6 months (%)	-80	145.0	-2	54.3	0.05
Colonisation with <i>Staphylococci</i>					
n		12		4	
%		66.6		25.0	
Colonisation with <i>Clostridium</i>					
n		16		12	
%		88.8		75.0	0.29
Colonisation with <i>Bacteroides</i>					
n		17		13	
%		94.4		81.3	0.23
Colonisation with <i>Lactobacilli</i>					
n		16		15	
%		88.8		93.8	0.99
Colonisation with <i>Bifidobacteria</i>					
n		17		16	
%		94.4		100.0	0.99

SIgA, secretory IgA.  
\* Fisher's exact test.



**Fig. 2.** Receiver operating characteristic curves of prediction of atopic dermatitis by decrease of faecal secretory IgA (SIgA) between 1 and 6 months. Results are expressed as  $((\text{SIgA at 1 month} - \text{SIgA at 6 months})/\text{SIgA at 6 months}) \times 100$ . As indicated by the black circle, a decrease of 60% predicts atopic dermatitis with a sensitivity of 100% and a specificity of 79%. The grey circle shows that a decrease of 150% predicts atopic dermatitis with a sensitivity of 75% and a specificity of 93%. Area under the curve =  $0.88 \pm 0.06$ ;  $P=0.014$ .

feeding the experimental formula was associated with a reduction in the risk for atopic dermatitis: OR 0.11 (95% CI 0.01, 0.94,  $P<0.05$ ).

### Discussion

In the double-blind, multicentre, randomised trial reported here, the experimental  $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented infant formula ensured the same growth as a standard formula in terms of weight and height gain. This finding confirms the nutritional adequacy of the protein profile of the experimental formula<sup>(15)</sup>. In addition, in this unselected population, the  $\alpha$ -lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented formula was better tolerated at 1 month of age, and had a protective effect against the occurrence of mild atopic dermatitis at 6 months of age.

The better gastrointestinal tolerance at 1 month of age could result from the  $\alpha$ -lactalbumin enrichment of the formula. Such an effect has been reported in three earlier studies<sup>(2,3,4)</sup>. Lien *et al.*<sup>(3)</sup> speculated that this effect may result from the higher tryptophan content of  $\alpha$ -lactalbumin, since tryptophan is a precursor of serotonin, a neurotransmitter that may regulate the sleep-wake rhythm. Nevertheless, in a previous study, Sandström *et al.*<sup>(15)</sup> failed to observe any difference in sleep pattern between infants receiving either standard formula,  $\alpha$ -lactalbumin-enriched formula or breast-feeding. A possible role of prebiotics and probiotics should be considered as well. Indeed, improved gastrointestinal tolerance to feeding was observed in infants with colic when they received *Lactobacillus reuteri*<sup>(16)</sup> or prebiotics<sup>(17)</sup>.

Prebiotics, and possibly probiotics, could protect against atopic dermatitis. This protection resulting from supplementation with fructo-oligosaccharides-galacto-oligosaccharides has already been observed in the recent MIPS1 study. This effect might be due to a mechanism involving bifidobacteria.

Our data suggest a significant relationship between the level of colonisation by bifidobacteria and the variation in faecal SIgA, and a correlation of the latter parameter with the incidence of atopic dermatitis. The positive effect on atopic dermatitis may also come from the supplementation with probiotics, as their stimulatory role on the secretion of IgA has already been observed in other clinical studies<sup>(18,19)</sup>. Several clinical trials<sup>(7,20-22)</sup>, aimed at the primary prevention of atopic dermatitis by probiotics, or prebiotics, have subsequently been published with conflicting results. Our results suggest an inverse association between atopic diseases and colonisation of the gut by probiotics, as already observed<sup>(22)</sup>, with an effect on SIgA, significantly associated with a reduction of risk for atopic dermatitis. The mechanisms involved in the observed effects clearly warrant further investigation to confirm our interpretation.

This study has some limitations: only 80% of enrolled infants had good compliance. Yet, similar conclusions were reached, whether results were analysed on an intention-to-treat or per-protocol basis. Moreover, the effects of the experimental formula on clinical symptoms were consistent with results from laboratory analysis regarding SIgA and microbiota, and corroborated by the observed relationship between these biological parameters and clinical symptoms.

In conclusion,  $\alpha$ -lactalbumin enrichment and symbiotic supplementation may represent a significant advance in neonatal nutrition when the baby cannot be breastfed, as feeding such enriched formula ensured the same growth pattern as a standard formula with an improved tolerance and a protective effect against the development of atopic dermatitis.

### Acknowledgements

The authors wish to declare the following potential conflicts of interest. The study was supported by grants from Sodilac, France. The Ordesa Group provided scientific support. J.-C. R. and C. D. received consulting fees from Sodilac, France. The authors' contributions were as follows: J.-C. R. and C. D. were responsible for the study concept and design. Acquisition of clinical data was done by I. D. M., M. L., N. G. and P. S. Acquisition of biological data was done by M.-J. B., N. K. and A.-J. W.-D. Analysis and interpretation of data were done by J.-C. R., C. D., M.-J. B. and D. D. Drafting of the manuscript was done by J.-C. R., S. B., C. D., M.-J. B. and D. D. Statistical analysis was done by J.-C. R. Administrative, technical or material support was provided by J.-C. R., C. D. and D. D. Study supervision was done by J.-C. R., J.-C. R. and C. D. had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and accuracy of data analysis.

### References

1. Davis AM, Harris BJ, Lien EL, *et al.* (2008) Alpha-lactalbumin-rich infant formula fed to healthy term infants in a multicenter study: plasma essential amino acids and gastrointestinal tolerance. *Eur J Clin Nutr* **62**, 1294-1301.



could influence the evolution of these disorders. In fact, the immune system of preterm infants is not fully developed, affecting the formation of tolerance and sensitization. In addition, extremely preterm infants (< 29 weeks) have a functionally immature skin barrier at birth, which can take more than 4 weeks to develop postnatally.<sup>7</sup> Moreover, environmental conditions including allergenic exposure, diet and skin/gut microflora vary substantially between premature and full-term infants.

So far, the propensity of preterm infants to develop AD has been a matter of debate. Few reports have been published, and they have yielded conflicting results.<sup>8–18</sup> In addition, the influence of very low gestational age (GA) on the risk of AD has not been assessed in a large cohort of patients. Therefore, the aim of this study was to examine how GA influenced the risk of AD in two independent cohorts of preterm infants.

## Patients and methods

### Study population and data sources

Data were obtained from two independent sources, the Epipage<sup>19</sup> and Loire Infant Follow-up Team (LIFT) cohorts studies.<sup>20</sup> Epipage was a prospective, population-based cohort

study including infants born at 22–32 completed weeks of gestation in nine French regions in 1997, as well as infants born at 33–34 weeks between April and October 1997.<sup>19,21</sup> Due to the high number of births at 33–34 weeks, recruitment of these moderately premature infants was stopped after only 2 months.<sup>19</sup> Ultimately, 427 of these moderately preterm infants (33–34 weeks of GA), along with all eligible infants who were born at 22–32 weeks of GA and were alive at discharge, were recruited from the Epipage cohort for this study (n = 2886) (Fig. 1). Of the 2886 infants recruited, 224 were not enrolled in the study (follow-up was not proposed for 77, and refused by parents for 147), 434 did not respond to the questionnaire, and 21 had died before the follow-up. Therefore, a total of 2207 preterm infants were included in the follow-up study at 2 years. Furthermore, a full-term reference group from the Epipage cohort was included at birth in the same regions (one in every four births at 39–40 weeks over 1 week in 1997 – the date varied according to region – 667 children) and with the same follow-up (Fig. 1). This full-term reference group was used only for comparison with preterm infants from the Epipage cohort.

LIFT was an open, regional, prospective, population-based study conducted in Western France. From the LIFT cohort, our study included all eligible infants born before 35

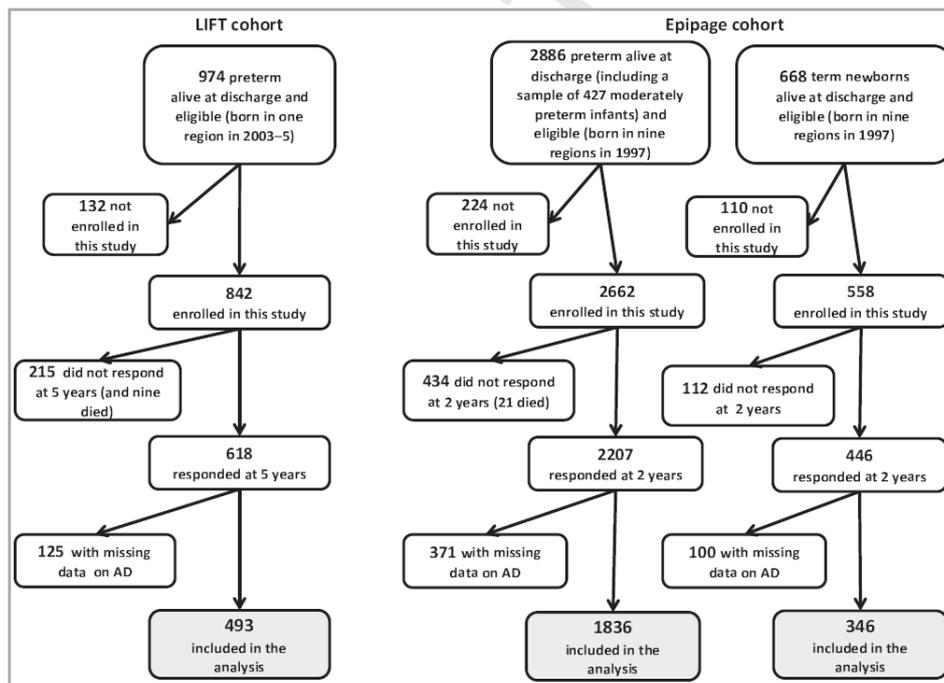


Fig 1. Flow chart of the infants analysed from the LIFT and Epipage cohorts.

completed weeks of GA between January 2003 and December 2005, hospitalized at Nantes University Hospital, and alive at discharge ( $n = 974$ ) (Fig. 1). Of the 974 recruited, 132 were not enrolled in the study (follow-up was not proposed or was refused by parents), 215 did not respond at 5 years, and nine died before 5 years. Finally, 618 infants were included in the follow-up study at 5 years.

Each cohort was registered with the French clinical research data protection authority, the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés, and approved by the local ethics committees. For the Epipage cohort, parents were informed of the study in the maternity or neonatal unit, and verbal consent was provided at the time of study enrolment. For the LIFT cohort, written consent was obtained from parents at the time of study enrolment.

### Atopic dermatitis assessment

LIFT cohort data were collected at 5 years through standardized telephone interviews administered to parents between December 2010 and February 2011. Presence of AD was defined as a positive answer to the question, 'Has a doctor ever told you that your child had atopic eczema?' The interview also included questions on family allergy history (mother, father and/or siblings). For the Epipage cohort, a questionnaire was mailed to parents after 2 years, and AD was assessed by the same question via parental disclosure of physician-diagnosed eczema. In both cohorts, responders were defined as infants enrolled in the follow-up study with known AD status at 5 years (LIFT) or 2 years of age (Epipage). Nonresponders were defined as infants not enrolled in the follow-up study and infants without data on AD diagnosis. Ultimately, AD data were available for 1836 preterm and 346 full-term infants at 2 years of age (Epipage cohort) and 493 preterm infants at 5 years of age (LIFT cohort) (Fig. 1).

### Perinatal factors

For both cohorts, basic data were collected in maternity and neonatal wards. These included the level of maternal education (in the Epipage cohort), GA, the infant's sex and birthweight, plurality, use of systemic antibiotics, antenatal administration of corticosteroids, breastfeeding at discharge and family history of allergies (mother, father and/or siblings). The birthweight  $z$ -score was calculated using the least mean square method.<sup>22</sup> This score expresses the difference between an individual child's weight and the average weight of comparable children, born at the same GA in the reference population.

### Statistical analysis

We first analysed the number of infants with and without AD at 2 years of age in the Epipage cohort and at 5 years of age in the LIFT cohort, according to GA at birth. We analysed the data from these cohorts independently, without pooling data between the two cohorts. In the Epipage cohort, we

used a sample of full-term infants for comparison with the preterm group. Secondly, the crude association between AD and pregnancy and characteristics of preterm infants was analysed. Finally, the association between GA and AD was studied after adjusting for potential confounders, including birthweight  $z$ -score, sex, Caesarean section, age, use of systemic antibiotics during the neonatal period, family allergy history and level of maternal education. Logistic regressions were performed for univariate and multivariate analyses. Crude and adjusted odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were determined, and two-sided tests were used in all cases. Missing data were excluded from the analysis. All analyses were performed with SPSS v.15.0 (IBM, Armonk, NY, U.S.A.).

## Results

### Characteristics of the study population

Comparing the characteristics of responders and nonresponders from the two preterm cohorts, we found no significant differences in the duration of assisted ventilation and birthweight  $z$ -scores. However, responders were slightly more likely than nonresponders to have a lower GA, be delivered by Caesarean section, and be treated with intravenous antibiotics during the neonatal period ( $P < 0.05$ , data not shown). In the Epipage cohort, nonresponding mothers of preterm infants had a higher maternal education level than responders (45% vs. 37%,  $P < 0.01$ ; data not shown).

The demographic and clinical characteristics of all included preterm and term infants are shown in Table 1. In the LIFT cohort, 493 preterm infants were included in the analysis: 88 were born at 24–28 weeks (18%), 237 at 29–32 weeks (48%) and 168 at 33–34 weeks (34%). In the Epipage cohort, 1836 preterm infants were included in the analysis: 391 were born at 24–28 weeks (21%), 1202 at 29–32 weeks (65%) and 243 at 33–34 weeks (13%). In the full-term reference group, 346 infants were included.

### Gestational age and prevalence of atopic dermatitis in infants

With regard to the relationship between GA and later development of AD, the percentage of children with AD in the extremely preterm group ( $< 29$  weeks) was significantly lower than in those born at a greater GA in the Epipage cohort, and tended to be lower in the LIFT cohort (Table 2). Using the 33–34 week category as a reference, we found that lower GA ( $< 29$  weeks) was associated with decreased risk of AD in the Epipage (OR 0.55, 95% CI 0.36–0.84;  $P = 0.01$ ) and LIFT cohorts (OR 0.52, 95% CI 0.24–1.12;  $P = 0.09$ ) (Table 3). Moreover, there were no significant differences observed with regard to AD between the  $> 29$  week GA subgroups: 29–32, 33–34 and 39–40 weeks (term) in the Epipage cohort,  $P = 0.12$  and  $P = 0.72$ ; and 29–32 and 33–34 weeks in the LIFT cohort,  $P = 0.21$ .

**Table 1** Demographic and clinical characteristics of preterm and term infants from the LIFT and Epipage cohorts

Characteristics	LIFT cohort		Epipage cohort	
	Preterm, N = 493	Term, N = 1836	Preterm, N = 1836	Term, N = 346
Infant characteristics, n (%)				
Male	279 (56.6)	953 (51.9)	181 (52.3)	
Gestational age at birth				
24–28 weeks	88 (17.8)	391 (21.3)	–	
29–32 weeks	237 (48.1)	1202 (65.5)	–	
33–34 weeks	168 (34.1)	243 (13.2)	–	
Birthweight, z-score <sup>a</sup>				
< -2	20 (4.1)	53 (2.9)	3 (0.9)	
-2 to -1	104 (21.1)	309 (16.9)	44 (12.7)	
-1 to 0	202 (41.0)	817 (44.7)	160 (46.2)	
0 to 2	163 (33.1)	641 (35.1)	137 (39.6)	
> 2	4 (0.8)	7 (0.4)	2 (0.6)	
Pregnancy characteristics				
Caesarean section	335 (68.0)	1021 (55.6)	27 (7.8)	
Prenatal treatment with corticosteroids <sup>b</sup>	355 (72.0)	1338 (74.0)	–	
Prenatal treatment with antibiotics <sup>c</sup>	99 (20.1)	337 (20.1)	–	
Multiple pregnancy	208 (42.2)	598 (32.6)	4 (1.2)	
Neonatal hospitalization characteristics				
Respiratory distress syndrome <sup>d</sup>	243 (49.3)	704 (38.8)	–	
Assisted ventilation > 10 days	58 (11.8)	200 (10.9)	–	
Antibiotic treatment during the neonatal period <sup>e</sup>	403 (81.7)	1081 (67.2)	–	
Other characteristics				
Breastfeeding <sup>f</sup>	151 (30.6)	413 (23.6)	172 (49.7)	
Family history of allergies	182 (36.9)	840 (45.8)	184 (53.2)	
Number of siblings > 0 <sup>g</sup>	237 (48.1)	702 (43.3)	199 (57.5)	

Information available for <sup>a</sup>1827, <sup>b</sup>1809, <sup>c</sup>1676, <sup>d</sup>1815, <sup>e</sup>1609, <sup>f</sup>1748 and <sup>g</sup>1622 of the 1836 preterm infants in the Epipage cohort.

#### Risk of atopic dermatitis in relation to gestational age and infant characteristics

Among preterm infants, we next considered other characteristics with regard to the relationship between AD and GA (Table 3). We observed that a family history of allergies was associated with a higher risk of AD in both cohorts. Moreover, a high level of maternal education was associated with an increased risk of AD in the Epipage cohort; however, this information was not available for the LIFT cohort. In addition, very low birthweight (z-score < -2) was associated with a lower risk of AD in the Epipage cohort, but not in the LIFT cohort. The risk of AD was also linked to the duration of assisted ventilation during the neonatal period in the LIFT cohort, while it was not associated with AD in the Epipage

**Table 2** Prevalence of atopic dermatitis according to gestational age in the LIFT and Epipage cohorts<sup>a</sup>

Gestational age	LIFT cohort, N = 493		P-value <sup>b</sup>	Epipage cohort, N = 2182 <sup>c</sup>		P-value <sup>b</sup>
	n/N	%		n/N	%	
24–28 weeks	10/88	11	0.11	52/391	13.3	0.02
29–32 weeks	51/237	21.5		212/1202	17.6	
33–34 weeks	33/168	19.6		53/243	21.8	
39–40 weeks	–	–		71/346	20.5	

<sup>a</sup>Based on a parental report of physician-diagnosed atopic dermatitis within the first 5 years (LIFT cohort) or 2 years of life (Epipage cohort). <sup>b</sup>Pearson  $\chi^2$ -test. <sup>c</sup>Includes 1836 infants born preterm and 346 infants born at full term.

cohort. We also determined that breastfeeding at discharge and use of intravenous antibiotics during the neonatal period were not associated with a significant risk of AD in either cohort. Furthermore, using the 33–34 week category as a reference, we found that by adjusting for birthweight z-score and/or family allergy history (in addition to high level of maternal education in the Epipage cohort), lower GA (< 29 weeks) was significantly associated with decreased risk of AD in the LIFT [adjusted OR (aOR) 0.41, 95% CI 0.18–0.90; P = 0.03] and Epipage cohorts (aOR 0.57, 95% CI 0.37–0.87; P = 0.009) (Table 4). However, adjustments for sex, Caesarean section, use of systemic antibiotics during the neonatal period and age did not yield effects on the results for either cohort (data not shown).

#### Discussion

In the present study, we found that very low GA (< 29 weeks) was associated with a reduced risk of AD compared with later preterm (29–34 weeks) and term GA by analysing two independent cohorts of premature infants. Conversely, a family history of allergies and/or a high level of maternal education were identified as predictors of increased risk of AD. Interestingly, no associations were observed between AD risk and smaller family size or perinatal factors (Caesarean section, breastfeeding, or neonatal treatment with intravenous antibiotics). Moreover, our observed 5-year cumulative incidence of AD for infants born at full term was 21%, which is in accordance with recent European epidemiological data.<sup>23</sup>

In addition, we did not find an association between asthma outcome at 2 years and GA in the Epipage cohort (data not shown; data not available for the LIFT cohort). Although preterm infants are generally considered to be at risk for asthma,<sup>24,25</sup> data regarding this condition should be interpreted with caution in very preterm cohorts. Indeed,

Table 3 Characteristics of preterm infants and odds ratios (ORs) for atopic dermatitis<sup>a</sup>

Characteristics	LIFT cohort, N = 493			EpiPAGE cohort, N = 1836		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
<b>Infant characteristics</b>						
Male	1.05	0.66–1.64	0.85	0.80	0.63–1.02	0.07
<b>Gestational age at birth</b>						
24–28 weeks	0.52	0.24–1.12	0.09	0.55	0.36–0.84	0.01
29–32 weeks	1.12	0.69–1.83	0.65	0.77	0.55–1.08	0.13
33–34 weeks	1			1		
<b>Birthweight, z-score<sup>b</sup></b>						
< -2	1.3	0.39–1.53	0.70	0.29	0.09–0.96	0.04
-2 to -1	0.98	0.51–1.91	0.96	0.97	0.67–1.39	0.85
-1 to 0	1.44	0.85–2.45	0.17	1.13	0.86–1.47	0.40
0 to 2	1			1		
<b>Pregnancy characteristics</b>						
Caesarean section	0.95	0.59–1.53	0.83	1.13	0.88–1.44	0.34
Prenatal treatment with corticosteroids <sup>c</sup>	1.34	0.79–2.27	0.27	0.95	0.72–1.25	0.72
Prenatal treatment with antibiotics <sup>d</sup>	0.85	0.48–1.52	0.59	1.18	0.87–1.60	0.30
Multiple pregnancy	1.49	0.94–2.32	0.09	0.96	0.74–1.25	0.77
High level of maternal education	NA			1.32	1.04–1.69	0.02
<b>Neonatal hospitalization characteristics</b>						
Assisted ventilation > 10 days	0.37	0.14–0.95	0.04	0.72	0.47–1.11	0.14
Treatment with antibiotics during the neonatal period <sup>e</sup>	0.79	0.59–1.05	0.10	0.97	0.86–1.10	0.66
<b>Other characteristics</b>						
Breastfeeding <sup>f</sup>	1.04	0.66–1.64	0.85	1.46	1.11–1.93	0.08
Family history of allergies	3.09	1.94–4.91	0.01	1.91	1.49–2.44	0.001
Number of siblings > 0 <sup>g</sup>	0.82	0.52–1.28	0.38	1.02	0.98–1.06	0.40

CI, confidence interval; NA, not available. <sup>a</sup>Based on a parental report of physician-diagnosed atopic dermatitis within the first 5 years (LIFT cohort) or 2 years of life (EpiPAGE cohort). Information available for <sup>b</sup>1827, <sup>c</sup>1809, <sup>d</sup>1676, <sup>e</sup>1609, <sup>f</sup>1748 and <sup>g</sup>1622 of the 1836 preterm infants in the EpiPAGE cohort.

Table 4 Association between gestational age at birth and risk of atopic dermatitis<sup>a</sup> in preterm infants after adjusting for birthweight (z-score), family allergy history and high level of maternal education

	LIFT cohort, N = 493			EpiPAGE cohort, N = 1836		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
<b>Adjusted for birthweight z-score</b>						
24–28 weeks	0.53	0.25–1.15	0.11	0.54	0.35–0.82	0.004
29–32 weeks	1.16	0.70–1.92	0.57	0.76	0.54–1.07	0.10
33–34 weeks	1			1		
<b>Adjusted for birthweight z-score and family history of allergies</b>						
24–28 weeks	0.41	0.18–0.90	0.03	0.57	0.37–0.87	0.001
29–32 weeks	1.08	0.64–1.81	0.79	0.78	0.55–1.10	0.16
33–34 weeks	1			1		
<b>Adjusted for birthweight z-score, family history of allergies and high level of maternal education</b>						
24–28 weeks	NA			0.57	0.37–0.87	0.009
29–32 weeks	NA			0.78	0.55–1.10	0.16
33–34 weeks	NA			1		

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NA, not available. <sup>a</sup>Based on a parental report of diagnosis of atopic dermatitis provided by a physician within the first 5 years (LIFT cohort) or 2 years of life (EpiPAGE cohort).

bronchopulmonary dysplasia (BPD) is highly prevalent in preterm infants. Thus, recurrent respiratory symptoms, such as wheezing and lower respiratory infections, are frequent BPD

manifestations in the first 2 years for this population. Therefore, these symptoms should probably not be interpreted as atopic disease.

1 A major strength of our study is that it involved two inde-  
 2 pendent cohorts (LIFT and Epipage), and that it fits within the  
 3 prospective, population-based design of these cohort studies.  
 4 Additionally, GA in our study was estimated based on the  
 5 date of the last menstrual period and early ultrasound results,  
 6 which is the standard method for the majority of pregnant  
 7 women in France. Therefore, the data collected should be  
 8 highly reliable and of high quality.<sup>26</sup>

9 This study also had some limitations that should be consid-  
 10 ered when interpreting the results. In the LIFT cohort, lower  
 11 GA (< 29 weeks) was not significantly associated with  
 12 decreased risk of AD compared with a greater GA. This result  
 13 may be due to a lack of power affecting the LIFT cohort, as  
 14 the number of subjects in the very low GA group was low  
 15 (n = 88). However, after adjusting for confounding variables,  
 16 a lower GA (< 29 weeks) was significantly associated with  
 17 decreased risk of AD in both cohorts.

18 In the Epipage cohort, nonresponding mothers of preterm  
 19 infants had a higher maternal education level compared with  
 20 responders. As the maternal education level is a known risk  
 21 factor for AD,<sup>27</sup> this discrepancy could have resulted in an  
 22 underestimation of the prevalence of AD in responders com-  
 23 pared with nonresponders; however, this difference was unli-  
 24 kely to modify our observed relationship between GA and AD  
 25 risk among responders. Furthermore, the rate of infants lost to  
 26 follow-up was higher in the groups that showed increased GA  
 27 (data not shown). However, there is no reason to suspect that  
 28 patients with AD within these groups would be more likely to  
 29 be lost to follow-up. Thus, it is not probable that this discrep-  
 30 ancy explains the observed association between GA and AD.

31 A primary concern in the interpretation and comparison of  
 32 epidemiological studies arises from the use of different defini-  
 33 tions for describing patient disease states. With regard to AD,  
 34 some studies define it as 'reported eczema',<sup>12,27</sup> while others  
 35 use the U.K. diagnostic criteria<sup>28</sup> or the International Study of  
 36 Asthma and Allergies in Childhood questionnaire.<sup>29</sup> Also, vari-  
 37 ations in the definition of AD can result in differences in  
 38 reports regarding estimations of lifetime, last year or point  
 39 prevalence. Moreover, as the use of parental reporting can  
 40 result in misclassification of AD cases, we used a parental  
 41 report of physician-diagnosed atopic eczema as the outcome  
 42 variable. Also, in questionnaires, we deliberately used 'atopic  
 43 eczema' (LIFT cohort) or 'eczema' (Epipage cohort) and not  
 44 'atopic dermatitis', because this wording of the question had  
 45 sufficient sensitivity and specificity to provide relevant data on  
 46 the cumulative incidence of AD, as previously reported.<sup>30,31</sup>  
 47 Furthermore, AD was not assessed in exactly the same manner  
 48 for our two distinct cohorts, as a questionnaire was mailed to  
 49 parents of the Epipage cohort and a standardized telephone  
 50 questionnaire was used for the LIFT cohort. Additionally, AD  
 51 outcome was not assessed at the same age for these cohorts.  
 52 Although this could explain the difference observed in AD  
 53 prevalence between the two groups, the same questions were  
 54 used in each cohort for all infants, regardless of GA. Thus, a  
 55 nondifferential misclassification of AD could have led to an  
 56 underestimation of its association with GA. However, we did

not pool the data from the two cohorts in this study, and we  
 examined the association between GA and AD independently  
 for each cohort. Finally, as our study was observational, the  
 possibility of residual confounding cannot be excluded.

AD is a multifactorial disease caused by genetic and envi-  
 ronmental factors. Patients with AD have a functionally defec-  
 tive skin barrier, even in nonlesional skin. Recent reports have  
 suggested that the skin barrier plays a key role in maintaining  
 effective protection against AD and other allergic disor-  
 ders.<sup>32,33</sup> The well-established association between AD and  
 loss-of-function mutations within the *flaggrin* gene supports  
 the hypothesis that an intrinsically impaired skin barrier could  
 be a first step in the development of AD.<sup>32,34</sup> From this per-  
 spective, neonatal defects in skin barriers could constitute a  
 pivotal starting point for allergic disorders.

GA also exerts a strong influence on skin barrier function;  
 in infants born at full term, the stratum corneum is developed  
 and ensures efficient protection. Stratum corneum maturation  
 occurs at around 29–37 weeks of GA,<sup>7</sup> and skin barrier func-  
 tion is regarded as impaired in infants born before 29 weeks.  
 Surprisingly, we found that infants born at a lower GA  
 (< 29 weeks) had a reduced risk of AD compared with infants  
 born preterm at a later GA (29–34 weeks) or at full term.

It is unclear why lower GA would be associated with a  
 decreased risk of AD, but several hypotheses can be proposed.  
 Firstly, continuous stimulation of the immune system by envi-  
 ronmental saprophytes via the skin appears to be necessary to  
 induce immune tolerance by activating the regulatory net-  
 work, including regulatory T cells and dendritic cells.<sup>35</sup> There-  
 fore, a functionally impaired skin barrier in very preterm  
 infants could result in early transcutaneous exposure to anti-  
 gens, leading to the development of tolerance. Secondly, the  
 diversity of intestinal microflora is reduced in very preterm  
 infants and increases progressively,<sup>36</sup> and it is unknown  
 whether limited microflora in very preterm infants could  
 influence the acquisition of immune tolerance and lead to  
 reduced risk of AD. Thirdly, increased birthweight and post-  
 maturity have been associated with higher total serum IgE lev-  
 els, and postmaturity may be associated with a reduced  
 thymus weight, which can alter the balance of T-helper (Th) 1  
 and Th2 cell populations in the thymus in favour of Th2  
 cells.<sup>37</sup> A shorter period of exposure to Th2 cytokines during  
 pregnancy could also bias the fetal immune system towards  
 atopy.<sup>38</sup> Interestingly, the results from the Epipage cohort  
 confirm that the risk of AD is diminished in preterm infants  
 with very low birthweights.<sup>12,17</sup> Fourthly, frequent use of  
 aggressive washing products such as soap could augment the  
 risk of AD in children.<sup>39</sup> However, it is unlikely that there  
 were differences in washing and bathing practices during hos-  
 pitalization or at home in our population. Furthermore, it is  
 unlikely that current methods of routine care during hospital-  
 ization led to our observed result, as a recent study found that  
 young adults born prematurely in the 1970s and 1980s with  
 very low birthweight had a lower incidence of atopy.<sup>17</sup>  
 Finally, one explanation for the low rate of AD observed  
 in children born at lower GA could be the higher rate of

1 mortality noted in preterm infants with AD. However, our  
2 results do not support this hypothesis, and infants born before  
3 29 weeks were actually more likely to have a family history of  
4 allergies in the LIFT cohort (data not shown).

5 Previous studies investigating the association between GA  
6 and AD have produced conflicting results. Indeed, some stud-  
7 ies found that a low GA was associated with reduced risk of  
8 AD<sup>9-11</sup> or atopy,<sup>17</sup> while others reported low GA to be linked  
9 to a higher risk of AD<sup>8</sup> or atopy.<sup>18</sup> Moreover, additional inves-  
10 tigations found no significant association between GA and AD  
11 at all.<sup>12-14,17</sup> Direct comparisons between these studies are  
12 difficult, due to variation in study designs, AD definitions and  
13 study populations. In most of these studies, the number of  
14 preterm infants was lower and the mean GA of preterm  
15 infants was higher than in our study. To our knowledge, no  
16 study has been published on the risk of AD in a large cohort  
17 of preterm infants that includes a large number of infants  
18 born before 29 weeks of GA.

19 In conclusion, this large, population-based cohort study  
20 revealed that, among preterm infants, there is an association  
21 between very low GA (< 29 weeks) and a decreased risk of  
22 AD, compared with higher GA (29-34 weeks) and full-term  
23 birth. Further studies are needed to confirm these results, and  
24 to understand how these findings are influenced by factors  
25 such as the environment, nutrition, immune system develop-  
26 ment and skin barrier function in very preterm infants.

## 27 References

- 28 1 Williams HC. Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2005; **352**:2314-24.
- 29 2 Chamlin SL, Frieden IJ, Williams ML, Chren MM. Effects of atopic dermatitis on young American children and their families. *Pediatrics* 2004; **114**:607-11.
- 30 3 Ellis CN, Drake LA, Prendergast MM *et al.* Cost of atopic dermatitis and eczema in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2002; **46**:361-70.
- 31 4 Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; **358**:1483-94.
- 32 5 Halken S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; **15** (Suppl. 16):4-5, 9-32.
- 33 6 Gillman MW. Developmental origins of health and disease. *N Engl J Med* 2005; **353**:1848-50.
- 34 7 Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol* 1998; **111**:320-6.
- 35 8 Lucas A, Brooke OG, Cole TJ *et al.* Food and drug reactions, wheezing, and eczema in preterm infants. *Arch Dis Child* 1990; **65**:411-5.
- 36 9 Govaere E, Van Gysel D, Verhamme KM *et al.* The prevalence, characteristics of and risk factors for eczema in Belgian schoolchildren. *Pediatr Dermatol* 2009; **26**:129-38.
- 37 10 Bührer C, Grimmer I, Niggemann B, Obladen M. Low 1-year prevalence of atopic eczema in very low birthweight infants. *Lancet* 1999; **353**:1674.
- 38 11 David TJ, Ewing CI. Atopic eczema and preterm birth. *Arch Dis Child* 1988; **63**:435-6.
- 39 12 Lundholm C, Örtqvist AK, Lichtenstein P *et al.* Impaired fetal growth decreases the risk of childhood atopic eczema: a Swedish twin study. *Clin Exp Allergy* 2010; **40**:1044-53.
- 40 13 Kvenshagen B, Jacobsen M, Halvorsen R. Atopic dermatitis in pre-  
41 mature and term children. *Arch Dis Child* 2009; **94**:202-5.
- 42 14 Siltanen M, Kajosaari M, Pohjavuori M, Savilahti E. Prematurity at  
43 birth reduces the long-term risk of atopy. *J Allergy Clin Immunol*  
44 2001; **107**:229-34.
- 45 15 Steffensen FH, Sorensen HT, Gillman MW *et al.* Low birth weight  
46 and preterm delivery as risk factors for asthma and atopic dermati-  
47 tis in young adult males. *Epidemiology* 2000; **11**:185-8.
- 48 16 Olesen AB, Ellingsen AR, Olesen H *et al.* Atopic dermatitis and  
49 birth factors: historical follow up by record linkage. *BMJ* 1997;  
50 **314**:1003-8.
- 51 17 Siltanen M, Wehkalampi K, Hovi P *et al.* Preterm birth reduces the  
52 incidence of atopy in adulthood. *J Allergy Clin Immunol* 2011;  
53 **127**:935-42.
- 54 18 Pekkanen J, Xu B, Jarvelin MR. Gestational age and occurrence of  
55 atopy at age 31 - a prospective birth cohort study in Finland. *Clin  
56 Exp Allergy* 2001; **31**:95-102.
- 19 Larroque B, Bréart G, Kaminski M *et al.* Survival of very preterm  
infants: Epipage, a population based cohort study. *Arch Dis Child  
Fetal Neonatal Ed* 2004; **89**:F139-44.
- 20 Rozé JC, Bureau-Rouger V, Beucher A *et al.* Follow-up network for  
newborns at risk for handicap in a French region. *Arch Pediatr*  
2007; **14**(Suppl. 1):S65-70.
- 21 Marret S, Ancel PY, Marpeau L *et al.* Neonatal and 5-year outcomes  
after birth at 30-34 weeks of gestation. *Obstet Gynecol* 2007;  
**110**:72-80.
- 22 Fenton TR, Saue RS. Using the LMS method to calculate z-scores  
for the Fenton preterm infant growth chart. *Eur J Clin Nutr* 2007;  
**61**:1380-5.
- 23 Eller E, Kjaer HF, Host A *et al.* Development of atopic dermatitis in  
the DARC birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol* 2010; **21**:307-14.
- 24 Jaakkola JJ, Ahmed P, Jeromnimon A *et al.* Preterm delivery and  
asthma: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*  
2006; **118**:823-30.
- 25 Zachariassen G, Faerk J, Esberg BH *et al.* Allergic diseases among  
very preterm infants according to nutrition after hospital dis-  
charge. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; **22**:515-20.
- 26 Blondel B, Norton J, du Mazaubrun C, Bréart G. Development of  
the main indicators of perinatal health in metropolitan France  
between 1995 and 1998 Results of the national perinatal survey.  
*J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2001; **30**:552-64.
- 27 Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. Eczema preva-  
lence in the United States: data from the 2003 National Survey of  
Children's Health. *J Invest Dermatol* 2011; **131**:67-73.
- 28 Fleming S, Bodner C, Devereux G *et al.* An application of the Uni-  
ted Kingdom Working Party diagnostic criteria for atopic dermati-  
tis in Scottish infants. *J Invest Dermatol* 2001; **117**:1526-30.
- 29 Hogewoning AA, Bouwes Bavinck JN, Amoah AS *et al.* Point and  
period prevalences of eczema in rural and urban schoolchildren in  
Ghana, Gabon and Rwanda. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2012;  
**26**:488-94.
- 30 Laughter D, Istvan JA, Tofte SJ, Hanifin JM. The prevalence of atopic  
dermatitis in Oregon schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 2000;  
**43**:649-55.
- 31 Kramer U, Schafer T, Behrendt H, Ring J. The influence of cultural  
and educational factors on the validity of symptom and diagnosis  
questions for atopic eczema. *Br J Dermatol* 1998; **139**:1040-6.
- 32 Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associ-  
ated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011; **365**:  
1315-27.
- 33 van den Oord RA, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of  
developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic  
review and meta-analysis. *BMJ* 2009; **339**:b2433.

## ANNEXE 2 : SYNOPSIS ETUDE REAL2

<b>Titre de l'étude</b>	Etude multicentrique, en double insu, randomisée versus placebo, visant à évaluer l'effet de l'administration de probiotiques en période anténatale seule ou anténatale et postnatale sur la survenue d'une dermatite atopique à 2 ans chez l'enfant à risque d'atopie
<b>Mots clés</b>	Dermatite atopique, atopie, probiotiques, asthme, allergies alimentaires
<b>Promoteur de l'étude</b>	<b>CHU DE NANTES</b>
<b>Investigateur coordonnateur (si étude multicentrique)</b>	Dr Sébastien Barbarot CHU de Nantes
<b>Investigateur principal (si étude monocentrique)</b>	
<b>Nombre de centres prévus</b>	2 centres participants : Nantes et Angers
<b>Type d'étude</b>	Hors produit de santé, alicament
<b>Planning de l'étude</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Durée totale : 7 ans</li> <li>❖ Période de recrutement : 2 ans</li> <li>❖ Durée de traitement/ exposition à la méthode par patients : 6 mois</li> <li>❖ Durée de suivi par patient : 5 ans</li> </ul>
<b>Design de l'étude</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Multicentrique</li> <li>❖ Etude</li> <li>❖ Contrôlée</li> <li>❖ Randomisée</li> <li>❖ En double insu</li> <li>❖ Prospective</li> </ul>
<b>Objectifs de l'étude</b>	<p>Objectif principal : Evaluer l'effet des probiotiques et identifier la meilleure période d'administration en peri-natal sur la survenue d'une dermatite atopique à l'âge de 2 ans chez des enfants à risque allergique</p> <p>Objectif(s) secondaire(s) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Prévalence de la dermatite atopique à 1an, 18 mois, 5 ans</li> <li>- Sévérité de la dermatite atopique chez les enfants jusqu'à 5 ans</li> <li>- Prévalence de la sensibilisation aux trophallergènes et pneumallergènes chez les enfants à l'âge de 2 et 5 ans</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prévalence de l'allergie alimentaire chez l'enfant à l'âge de 2 et 5 ans</li> <li>- Prévalence de l'asthme allergique chez les enfants à l'âge de 5 ans</li> <li>- Sévérité de l'asthme à l'âge de 5 ans</li> <li>- Qualité de vie de l'enfant et de son entourage familial jusqu'à 5 ans</li> </ul>
<b>Nombre de cas prévisionnel</b>	1 002 patients répartis en trois bras, 334 patients/bras
<b>Calendrier des différentes visites et des différents examens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- V1 : visite d'inclusion à 33-34SA</li> <li>- V2 : naissance de l'enfant, visite en maternité</li> <li>- V3 : visite téléphonique à l'âge de 1 mois + recueil de selles</li> <li>- V4 : visite téléphonique à l'âge de 3 mois</li> <li>- V5 : visite de l'enfant à l'âge de 6 mois (interrogatoire, examen clinique)</li> <li>- V6 : visite de l'enfant à l'âge de 12 mois (interrogatoire, examen clinique)</li> <li>- V7 : visite de l'enfant à l'âge de 18 mois (interrogatoire, examen clinique)</li> <li>- V8 : visite de l'enfant à l'âge de 24 mois (interrogatoire, examen clinique, prick-tests, prélèvement sanguin)</li> <li>- V9 : visite de l'enfant à l'âge de 3 ans (interrogatoire, examen clinique)</li> <li>- V10 : visite téléphonique à l'âge de 4 ans</li> <li>- V11 : visite de l'enfant à l'âge de 5 ans, visite de fin de protocole (interrogatoire, examen clinique, prick-tests, prélèvement sanguin)</li> </ul>
<b>Critères principaux de sélection, d'inclusion, de non-inclusion et d'exclusion</b>	<p>Critères d'inclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- femmes enceintes suivie dans la maternité du CHU de Nantes ou d'Angers,</li> <li>- femmes âgées de plus de 18 ans</li> <li>- femmes affiliées à un régime de sécurité sociale</li> <li>- femmes à antécédent personnel d'atopie ou dont l'enfant à naître a un antécédent familial du premier degré d'atopie (père atopique ou premier enfant atopique)</li> <li>- femmes ayant donné leur consentement écrit</li> </ul>

	<p>Critères d'exclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mineures</li> <li>- majeures sous tutelle</li> <li>- grossesses multiples</li> <li>- enfants nés prématurés (terme&lt;37SA)</li> <li>- enfants porteurs d'une malformation congénitale</li> <li>- patientes incapables de suivre le protocole ou de donner leur consentement</li> </ul>
<b>Indication cible</b>	Enfant à naître à risque de dermatite atopique du fait d'un antécédent familial de premier degré de maladie allergique
<b>Stratégie/acte/procédure à l'étude</b>	<p>Impact de l'utilisation d'un probiotique Lactobacillus fermentum CECT5716 en période peri-natal sur la survenue d'une dermatite atopique au cours des 2 premières années de l'enfant et détermination de la période optimale d'administration.</p> <p>3 bras de randomisation avec 334 patientes dans chaque bras :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mère recevant le produit en anténatal + nourrisson recevant le produit en post-natal</li> <li>- mère recevant le produit en anténatal + nourrisson recevant le placebo en post-natal</li> <li>- mère recevant le placebo en anténatal + nourrisson recevant le placebo en post-natal</li> </ul>
<b>Stratégie/acte de référence (si applicable)</b>	Non applicable
<b>Critère de jugement principal</b>	Prévalence de la dermatite atopique à l'âge de 2 ans
<b>Critère(s) de jugement secondaire(s)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sévérité de la dermatite atopique déterminée par le score SCORAD</li> <li>- Prévalence de la sensibilisation allergénique déterminée selon positivité d'un/des prick-tests et/ou un/des taux d'IgE spécifiques positif(s)</li> <li>- Diagnostic positif d'allergie alimentaire défini par l'association symptômes cliniques et sensibilisation à un/des trophallergène(s)</li> <li>- Diagnostic positif d'asthme posé sur des critères cliniques recueillis à l'aide de la</li> </ul>

	<p>version française du questionnaire de l'étude ISAAC (une réponse positive à une des 8 questions rend très probable le diagnostic, une réponse positive à la question 2 ou à la question 6 le rend certain) et/ou des critères fonctionnels aux EFR, définis chez l'enfant par un rapport VEMS/CVL&lt;80% et/ou un VEMS&lt;80% et/ou un DEM25-75&lt;50% et/ou une réversibilité après test aux bêta2-mimétiques d'au moins 12% ou 200ml du VEMS.</p> <p>- Sévérité de l'asthme déterminée selon les critères cliniques et fonctionnels du GINA</p> <p>- L'impact de la dermatite atopique sur la qualité de vie de l'enfant et de son entourage, évalué par l'utilisation d'échelles de qualité de vie adaptées à l'âge, l'IDQOL (enfants Dermatitis Quality of Life Index), et le FDLQI (Family Dermatitis Quality of Life Index).</p>
<p><i>En cas d'étude ancillaire :</i></p> <p><input type="checkbox"/> Pharmacogénétique</p> <p><input type="checkbox"/> Pharmacocinétique</p> <p><input type="checkbox"/> Pharmacodynamique</p> <p><input type="checkbox"/> Pharmaco-économique</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Autres analyses</p>	
<p><b>Autres évaluations</b></p>	
<p><b>Analyse statistiques</b></p>	<p>L'ensemble des patients randomisés, respectant les critères d'inclusion et de non inclusion, ayant au moins une évaluation d'un critère d'efficacité et ayant reçu au moins une dose de traitement seront pris en compte dans l'analyse principale (« Full Analysis Set »). Une analyse de sensibilité sur la population « Per protocol » sera réalisée (exclusion des patients avec déviation majeure au protocole).</p> <p>Le taux de survenue de dermatite atopique sera comparé entre les 3 groupes à partir d'un test de Khi2.</p> <p>La sévérité de la dermatite atopique sera évaluée à partir du score total de l'échelle du Scorad. La comparaison entre les 3 groupes sera réalisée à partir d'un modèle ANOVA. Le pourcentage de patient ayant une allergie alimentaire et celui de patient ayant un asthme allergique seront respectivement comparés entre les 3 groupes à l'aide d'un test du Khi2.</p>

<b>Titre de l'étude</b>	<b>Etude pilote monocentrique BArrière CUtanée du nouveau-né Prématuré (BACUP)</b>
<b>Mots clés</b>	Dermatite Atopique, prématuré, Barrière cutanée
<b>Promoteur de l'étude</b>	<b>CHU DE NANTES</b>
<b>Investigateur principal (si étude monocentrique)</b>	Docteur Sébastien Barbarot
<b>Nombre de centres prévus</b>	Nantes
<b>Type d'étude</b>	Physiologie
<b>Planning de l'étude</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Durée totale : 2 ans et 6 mois</li> <li>❖ Période de recrutement : 6 mois</li> <li>❖ Durée de traitement/ exposition à la méthode par patient : 28 jours</li> <li>❖ Durée de suivi par patient : 2 ans</li> </ul>
<b>Design de l'étude</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Monocentrique</li> <li>❖ Non Contrôlée</li> <li>❖ Non Randomisée</li> <li>❖ Ouverte</li> <li>❖ Prospective</li> </ul>
<b>Objectifs de l'étude</b>	<p>Objectif principal : Evaluer l'influence de l'âge gestationnel sur la fonction barrière de l'épiderme mesuré par la perte transépidermique en eau (TEWL) chez le NN prématuré à <u>J7</u> de vie : comparaison des NN &lt; 29 SA par rapport aux NN ≥ 29 SA.</p> <p>Objectifs secondaires :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluer les variations de la TEWL en fonction de l'Age Post-Natal (APN) chez le NN prématuré, à partir du jour de l'inclusion (J7 &lt;29 SA / J2 si ≥29 SA ) et jusqu'à J28.</li> <li>• Comparer les mesures de la TEWL effectuée sur le front aux mesures</li> </ul>

	<p>prises sur l'avant bras à J7.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pour les NN <math>\geq</math> 29 SA : comparaisons des mesures de la TEWL entre J2 et J7.</li> <li>• Comparer les mesures de la TEWL en conditions standards par rapport aux mesures en conditions « normales » de J7 jusqu'à J28.</li> <li>• Evaluer l'influence des facteurs suivants sur la TEWL : site anatomique de la mesure, conditions de température et d'humidité ambiante, modalités de soins locaux cutanés.</li> <li>• Etudier la relation entre TEWL et incidence de la DA jusqu'à 2 ans</li> </ul>
<b>Nombre de cas prévisionnel</b>	<p>24 patients.</p> <p>Considérant 20% de patients en partie inexploitable (décès, retrait de consentement, mesure impossible, pathologie intercurrente incompatible avec le design BACUP...), <b>30 patients</b> seront inclus pour préserver l'analyse du critère de jugement principal.</p>
<b>Calendrier des différentes visites et des différents examens</b>	<p>J1/J6 : information famille</p> <p>J2/J7 : consentement / examen clinique</p> <p>J7 / J14 / J21 / J28 : mesures de la TEWL</p> <p>6 mois / 2 ans : contact téléphonique pour la survenue de DA</p>
<b>Critères principaux de sélection, d'inclusion, de non-inclusion et d'exclusion</b>	<p>Critères d'inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nouveau-né ayant un AG <math>\leq</math> 35 SA</li> <li>• Nés au CHU de Nantes</li> <li>• Consentement écrit des 2 parents</li> <li>• Affiliation à la sécurité sociale</li> <li>• Aucune pathologies congénitales sévères et/ou incompatibilité avec le design de la recherche (transfert précoce, risque de perdu de vue etc....).</li> </ul> <p>Critères de non-inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Absence de consentement parental.</li> <li>• Nouveau-né &gt;35 SA</li> <li>• Pathologies congénitales sévères et/ou incompatibilité avec le design</li> </ul>

	BACUP.
<b>Indication cible</b>	Nouveau-nés prématurés nés au CHU de Nantes entre 26 et 35 SA sans pathologie congénitale sévère et/ou incompatible avec la recherche BACUP, et pour lesquels une hospitalisation au sein du service est envisagé au moins jusqu'à J28.
<b>Stratégie/acte/procédure à l'étude</b>	Mesure de la perte insensible en eau (TEWL) via un téwamètre.
<b>Stratégie/acte de référence (si applicable)</b>	NA
<b>Critère de jugement principal</b>	Mesure de la TEWL en g/m <sup>2</sup> /h (3 mesures consécutives moyennées en conditions standard) à J7 de vie sur le front.
<b>Critère(s) de jugement secondaire(s)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesures de la TEWL en g/m<sup>2</sup>/h (3 mesures consécutives moyennées respectant le protocole BACUP) à J14, J21, J28 de vie, sur le front.</li> <li>• Mesures de la TEWL en g/m<sup>2</sup>/h (3 mesures consécutives moyennées respectant le protocole BACUP) sur l'avant bras G à J7.</li> <li>• Mesures de la TEWL en g/m<sup>2</sup>/h (3 mesures consécutives moyennées respectant le protocole BACUP) à J2 pour le groupe des NN ≥29 SA , sur le front.</li> <li>• Mesures de la TEWL en g/m<sup>2</sup>/h (3 mesures consécutives moyennées) avant standardisation des conditions de mesure dans l'incubateur (cf. protocole annexe) sur le front à J7, J14, J21 et J28.</li> <li>• Taux de DA à 6 mois et 2 ans.</li> </ul>
<b>Autres évaluations</b>	NA
<b>Analyse statistiques</b>	<p>Les nouveaux-nés seront répartis en deux groupes selon l'âge gestationnel : &lt; 29 SA versus ≥ 29 SA</p> <p>Analyse du critère principal :</p> <p>Comparaison des mesures de la TEWL à J2/J7 en condition standardisées entre les deux groupes un test non paramétrique de Wilcoxon (pour chaque patient : moyenne des trois mesures successives à une minute d'intervalle).</p>

TITRE EN FRANÇAIS :

**ETUDE DES DETERMINANTS DE LA DERMATITE ATOPIQUE CHEZ LE NOUVEAU-NE  
PREMATURE ET A TERME**

Les évènements survenant pendant la période périnatale sont susceptibles de modifier le risque de développer une maladie atopique. Nous avons étudié les déterminants précoces de la dermatite atopique (DA) chez le nouveau-né à terme et prématuré dans trois études.

La première étude (étude I) est un essai randomisé (n=97) ayant pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un lait contenant un symbiotique versus un lait standard sur la croissance et le taux de DA à 6 mois. La croissance était similaire dans les deux groupes mais la proportion d'enfants atteints de DA était plus faible dans le groupe expérimental ( $p < 0,05$ ). De plus, nous avons observé une diminution de la concentration d'IgA sécrétoires fécales entre 1 et 6 mois dans le groupe contrôle et non dans le groupe expérimental. Cette diminution était corrélée au risque de DA et à la colonisation bactérienne intestinale par les bifidobactéries ( $p < 0,014$ ).

Dans les études II et III, nous avons évalué l'influence de l'âge gestationnel (AG) et de plusieurs facteurs périnataux sur le risque de DA au sein d'une cohorte nationale d'enfants prématurés nés en 1997 (étude II, cohorte EPIPAGE, n=1836) puis au sein d'une seconde cohorte indépendante régionale récente (étude III, cohorte LIFT, n=493). Après ajustement sur les facteurs confondant, nous avons mis en évidence que les enfants nés très grands prématurés (AG < 29 semaines) avaient un risque plus faible de développer une DA à deux ans (cohorte EPIPAGE : ORa 0,57 [IC 95%: 0,37-0,87],  $p = 0,009$ ) ou cinq ans (cohorte LIFT: ORa 0,41 [IC 95%: 0,18 - 0,90],  $p = 0,03$ ) comparés aux enfants prématurés nés à un AG plus élevé et aux enfants nés à terme. **MOTS CLES : dermatite atopique, prématurité, symbiotiques, probiotiques**

TITRE EN ANGLAIS: **DETERMINANTS OF ATOPIC DERMATITIS IN PRETERM AND TERM NEONATES**

Events occurring in the earliest stages of development can predispose a child to atopic diseases. We investigated the risk for developing atopic dermatitis (AD) in term and premature neonates in three studies.

First we evaluated the safety, tolerance and preventive effect on AD at 6 month of an experimental symbiotic-supplemented infant formula versus standard formula in a randomised controlled trial (study I; n=97). Faecal secretary IgA (SIgA) concentration and microbiota composition of forty-three infants were analysed at 1 and 6 months. Growth was similar in both groups. At 6 months, AD was less frequently observed in the experimental group ( $P < 0.05$ ). Decrease of faecal SIgA concentration between 1 and 6 months was mainly observed in the control group. This decrease was significantly associated with AD ( $P < 0.014$ ) and negatively correlated to the level of colonisation by bifidobacteria ( $P < 0.005$ ).

Then we investigated the relationship between gestational age (GA) and AD using data from two independent population-based cohorts (study II and III), including a total of 2,329 preterm infants, of whom 479 were born extremely preterm (< 29 weeks). After adjusting for confounding variables, a lower GA (< 29 weeks) was significantly associated with decreased risk of AD in the EPIPAGE cohort (aOR: 0.57 [95% confidence interval (CI): 0.37-0.87];  $P = .009$ ) and the LIFT cohort (aOR: 0.41 [95% CI: 0.18-0.90];  $P = .03$ ). So, very low GA (<29 weeks) was associated with a lower risk of AD compared with higher GA (29-34 weeks) and full term birth. **KEY WORDS : Atopic dermatitis, prematurity, probiotics, symbiotics**

BARBAROT Sébastien , NANTES

Visa du Directeur de thèse