

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2008

N° 111

THESE
pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
DES de pédiatrie**

par

Gaël MAZEIRAS

né le 7 mai 1978 à Saint Germain en Laye

Présentée et soutenue publiquement le 30 avril 2008

**FACTEURS INFLUENÇANT LA COLONISATION
BACTERIENNE DU TRACTUS DIGESTIF CHEZ LE
NOUVEAU-NE PREMATURE :
A propos d'un « effet centre »**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Christophe ROZE
Directeur de thèse : Madame le Docteur Christèle GRAS-LEGUEN

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
METHODE	6
Dessin de l'étude et patients	
Procédure	
Analyse statistique	
RESULTATS	8
« Effet centre »	
Colonisation à entérobactéries	
Colonisation à <i>Clostridium</i>	
DISCUSSION	14
CONCLUSION	17
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	18

ABREVIATIONS

AGCC = Acides gras à chaînes courtes

CHU = Centre hospitalier universitaire

CPAP = Continuous Positive Airway Pressure

g = grammes

IC = Intervalle de confiance

IPP = Institut de puériculture de Paris

SA = Semaine d'aménorrhée

INTRODUCTION

Issus des microbiotes environnementaux et alimentaires, les germes digestifs définissent un microbiote intestinal complexe vivant en symbiose avec l'hôte. Ils y exercent des fonctions bénéfiques essentielles : métaboliques, trophiques et protectrices (Figure 1). La fermentation et la putréfaction bactériennes de résidus alimentaires non absorbables et de mucus endogène concourent à la synthèse d'acides gras à chaînes courtes (AGCC), source importante d'énergie [1]. Le microbiote intestinal est également source de vitamines (vitamines K, B12, B2, acide folique, pyridoxine, biotine, pentothénate) [2]. Il participe par ailleurs au contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales [3] ainsi qu'au développement et à l'homéostasie du système immunitaire [1, 4 - 6]. Enfin, les germes commensaux du tube digestif protègent l'hôte de la prolifération de pathogènes par un « effet barrière », en régulant la colonisation microbienne (adhésion préférentielle à l'épithélium intestinal à l'instar des germes pathogènes [1], sécrétion de substances anti-microbiennes [7 - 11], ...) et en interagissant avec le système immunitaire [12, 13].

Le développement du microbiote intestinal suit un processus de colonisation complexe. *In utero*, le tractus digestif fœtal est stérile. Dès la rupture de la poche des eaux, celui-ci est colonisé par les germes environnementaux [14]. La lumière intestinale initialement caractérisée par un potentiel d'oxydo-réduction élevé sélectionne les germes aérobies [15, 16]. Ces derniers consomment l'oxygène et favorisent alors l'apparition des germes anaérobies [12, 14, 16] et donc le développement d'un microbiote plus diversifié. L'introduction de l'allaitement conduit secondairement à la prédominance des anaérobies, et notamment des bifidobactéries [15]. Enfin, la constitution d'un microbiote intestinal adulte est principalement sous l'influence de l'alimentation, avec comme période « clef » l'étape de la diversification [14].

La colonisation bactérienne du tractus gastro-intestinal chez le nouveau-né est tributaire des microbiotes environnementaux et alimentaires. Tout facteur modifiant ces microbiotes est susceptible de retentir sur l'invasion microbienne physiologique du tube digestif néonatal. Le mode de naissance définit les premiers germes pénétrant le tractus digestif. Les enfants nés par voie basse sont tout d'abord colonisés par les germes issus du tractus vagino-périnéal maternel tandis que la naissance par césarienne expose aux germes hospitaliers (unités d'hospitalisation et personnel soignant) [14, 17]. La césarienne retentit principalement sur la colonisation des germes anaérobies en limitant l'implantation des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* et en favorisant l'implantation du genre *Clostridium* [10, 14, 17 - 19]. L'alimentation est une autre source, essentielle, de germes. L'allaitement maternel favorise la prédominance des bifidobactéries [20, 21] et la croissance du genre *Staphylococcus* [12, 21 - 23]. Ceci se fait au détriment de germes pathogènes ou potentiellement pathogènes tels que *Escherichia coli* [19, 21], *Clostridium sp* et *Pseudomonas sp* [21, 24, 25]. Les laits artificiels actuels favorisent la croissance et la colonisation des lactobacilles [19] et du genre *Bacteroides* [19, 24]. Parmi les suppléments alimentaire, les probiotiques, bactéries vivantes ayant une action bénéfique sur l'hôte [26], ne semblent pas tant modifier la colonisation bactérienne que limiter l'effectif des germes pathogènes ou potentiellement pathogènes [27 - 30]. Les prébiotiques (oligosaccharides, inuline, oligofructose...) stimulent la croissance, l'activité de l'une ou plusieurs espèces bactériennes bénéfiques déjà présentes dans le colon [26]. Par ailleurs, ils inhibent l'adhésion des germes pathogènes au niveau de l'épithélium intestinal ainsi que l'action des entérotoxines [31, 32]. Le milieu hospitalier présente quant à lui un microbiote environnemental conditionné par les règles d'hygiène et les conditions de prise en charge du service. Elle peut ainsi être à l'origine de colonisations par des germes invasifs tels que *Clostridium sp* [19]. De même, le recours aux antibiotiques retentit significativement sur le microbiote intestinal même si les effectifs

bactériens semblent d'avantage atteints que leur taux de colonisation [19, 33]. La colonisation bactérienne intestinale est donc dépendante de facteurs variés dont l'impact est d'autant plus difficile à déterminer qu'ils sont souvent associés (Figure 2).

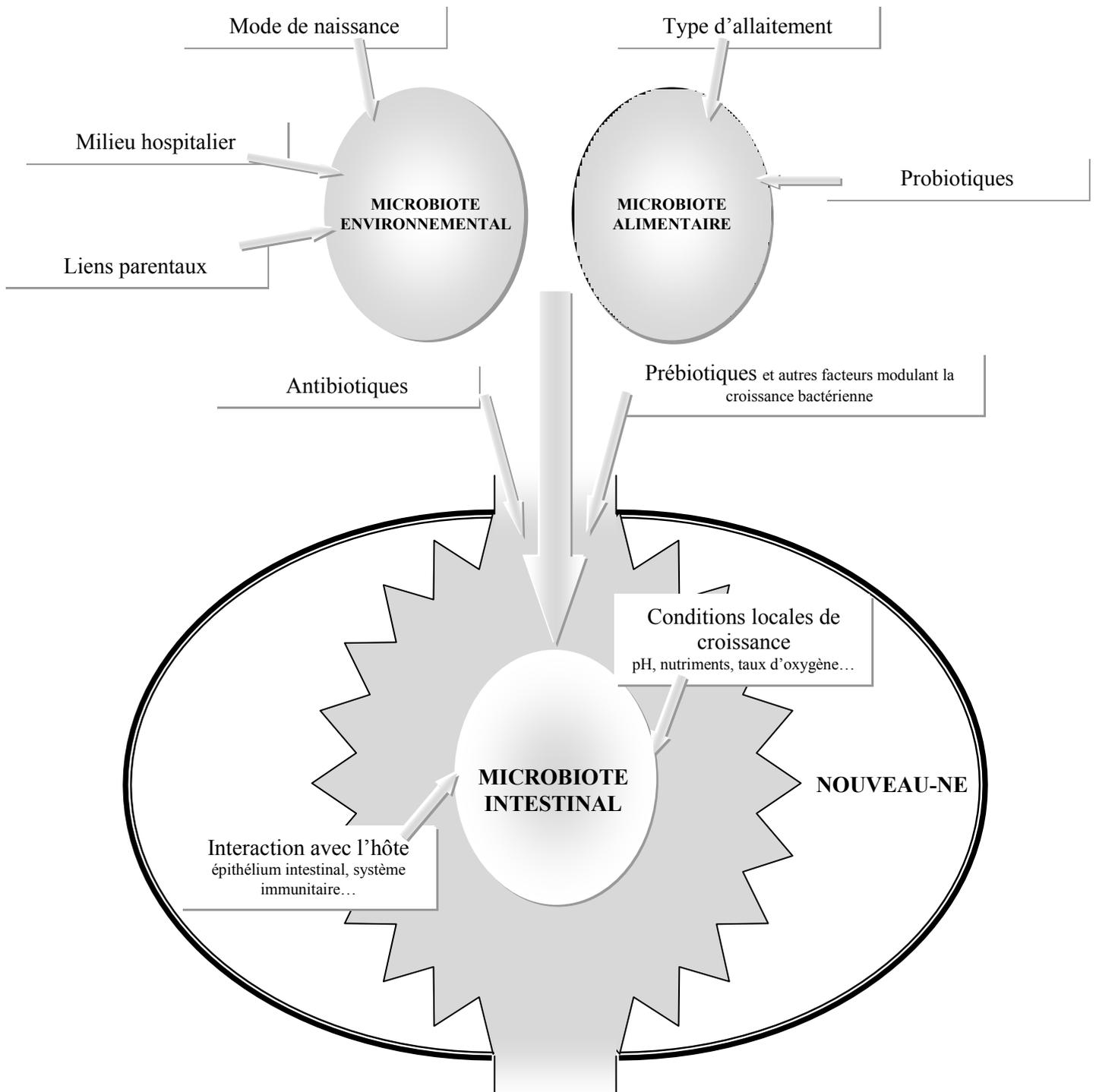


Figure 2 : Facteurs influençant la colonisation microbienne intestinale du nouveau-né

Le nouveau-né prématuré associe de nombreux facteurs (dont certains spécifiques de la prématurité) pouvant influencer sur la colonisation bactérienne du tractus digestif (Tableau I). Ces particularités liées à la prématurité concourent à retarder la colonisation bactérienne et à appauvrir le microbiote intestinal. Cependant la rareté des germes bénéfiques limite également l' « effet barrière » exercé sur les pathogènes. Le retard de colonisation des germes pathogènes ou potentiellement pathogènes apparaît ainsi moins marqué [12, 19, 34 - 36].

Tableau I : Caractéristiques des facteurs influençant la colonisation bactérienne chez le nouveau-né prématuré

Facteurs intrinsèques [37]	Facteurs extrinsèques
Immaturité digestive	Césariennes plus fréquentes
Troubles de la vascularisation mésentérique (canal artériel persistant, traitement par ibuprofène, cathéter artériel ombilical)	Exposition systématique et prolongée aux germes hospitaliers
Troubles de la motilité digestive	Exposition limitée au microbiote maternel
Immaturité immunitaire	Alimentation entérale limitée et retardée
pH gastrique moins acide [38]	Pasteurisation du lait maternel [39 - 41] Adaptation naturelle de la composition du lait maternel [41]
	Recours plus fréquent à l'antibiothérapie

D'avril 2005 à mars 2006, une étude prospective, randomisée, en double aveugle et contre placebo a étudié l'effet digestif et nutritionnel d'une supplémentation orale en *Bifidobacterium longum* et *Lactobacillus GG* chez le nouveau-né prématuré. Les analyses préliminaires ont permis de mettre en évidence une différence de colonisation au sein des deux centres d'étude (Centre Hospitalier Universitaire de Nantes et Institut de Puériculture à Paris) portant sur les entérobactéries et le genre *Clostridium*. L'objectif de ce travail était donc de déterminer les facteurs pouvant être rattachés à cet « effet centre ».

METHODE

Dessin de l'étude et patients

L'étude incluait 127 nouveau-nés. Ils devaient être âgés de moins de 15 jours de vie et avoir un poids de naissance inférieur à 1500 grammes. L'âge gestationnel était inférieur à 32 semaines d'aménorrhée. Ils étaient hospitalisés au sein des services de néonatalogie du CHU de Nantes et de l'Institut de Puériculture de Paris (IPP) et ne devaient pas avoir de pathologie en dehors de la prématurité et de ses complications. L'alimentation entérale devait être débutée depuis moins de 48 heures. Enfin l'absence de consentement des parents était un motif de non-inclusion.

Procédure

Des prélèvements de selles étaient réalisés dans la mesure du possible deux fois par semaines chez un sous-groupe de 48 enfants correspondant aux 48 premiers enfants inclus (N = 24 au CHU de Nantes et N = 24 à l'IPP). Cette surveillance bactériologique était poursuivie jusqu'à l'arrêt de la supplémentation (en probiotique ou placebo), c'est-à-dire à 12 semaines de suivi, ou jusqu'à 1800 grammes, poids de sortie du service de néonatalogie. Les prélèvements étaient conditionnés dans un milieu stérile, enrichis en BHI glycérol (fixateur). Le transport s'effectuait sous glace. La culture était réalisée au laboratoire de microbiologie du Professeur Butel (Faculté des sciences Pharmaceutiques et Biologiques – Paris 5). 5 genres bactériens (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) ainsi que la famille des entérobactéries (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*...) étaient étudiés. La recherche des germes probiotiques (*Bifidobacterium BB536* et *Lactobacillus GG*) était également effectuée. La mise en culture des prélèvements de selles permettait de déterminer, pour chaque genre, l'effectif bactérien et, par déduction, les taux de colonisation à

chaque semaine de vie. Un enfant était considéré colonisé dès lors que le germe était retrouvé, et ce quelque soit son effectif. L'ensemble des caractéristiques de la population étaient recueillies afin de déterminer leur association avec les différents centres puis avec les germes étudiés.

Analyse statistique

Durant l'ensemble de l'étude, 187 prélèvements étaient recueillis. L'analyse des 142 premiers échantillons, correspondant aux 4 premières semaines de vie, permettait de bénéficier d'une représentativité complète et équilibrée de l'ensemble des enfants. L'« effet centre » était défini par la différence de colonisation dont l'origine était recherchée par analyses uni- puis multivariées. Ces dernières se limitaient aux facteurs anté- et per-nataux. L'analyse des variables quantitatives était réalisée par un test U de Mann-Whitney. Les données qualitatives étaient évaluées par Chi deux de Pearson ou, si nécessaire, par un test de Fisher exact. Le seuil de significativité était fixé à 0,05.

RESULTATS

Les caractéristiques des enfants étudiés sont rapportées pour chacun des deux centres (Tableau II). Sur les 48 nouveau-nés inclus, seuls 46 purent être analysés (1 décès et 1 enfant sans prélèvement). 22 étaient inclus au CHU de Nantes et 24 à l'Institut de Puériculture de Paris (IPP). Leurs caractéristiques différaient significativement entre les centres avec un nombre de grossesses multiples et d'antibiothérapies maternelles au cours des deux derniers mois de grossesse (hors accouchement) plus importants pour l'IPP. Le nombre de cures de corticothérapie anténatale était moindre à l'IPP. Enfin, les nouveau-nés inclus à l'IPP présentaient un âge gestationnel à la naissance significativement plus bas avec, par la suite, une durée de ventilation assistée et une durée d'hospitalisation plus longues.

« Effet centre »

La différence de colonisation observée entre les deux centres concernait les entérobactéries et le genre *Clostridium* (Tableau III). A l'exception d'un prélèvement, aucune entérobactérie n'était isolée au cours du premier mois de vie au CHU de Nantes. Parallèlement, les entérobactéries étaient présentes à l'IPP dès la première semaine avec un taux de colonisation qui dépassait rapidement 80%. De même, *Clostridium* était significativement moins isolé au CHU de Nantes avec, le premier mois, 5 prélèvements positifs sur 57 contre 42/85 à l'IPP. L'étude s'orientait alors vers les facteurs pouvant favoriser la colonisation à entérobactéries et à *Clostridium*.

Tableau II : Caractéristiques de la population au sein des deux centres

	Centre 1 CHU Nantes N = 22 n (%)	Centre 2 Institut de Puériculture de Paris N = 24 n (%)	p
Sexe (M/F)	14/8	14/10	0,71
Age gestationnel en semaines d'aménorrhée	29,00 (28,00 - 29,25)	27,50 (25,25 - 29,00)	0,02
< 27 SA	2 (9)	8 (33)	
27 -28,9 SA	5 (23)	5 (21)	
29-29,9 SA	11 (50)	8 (33)	
> ou = 30 SA	4 (18)	3 (13)	
Poids de naissance en grammes	1218 (954 - 1286)	1010 (761 - 1335)	0,28
< 1000 g	6 (27)	9 (38)	
> ou = 1000 g	16 (73)	15 (62)	
Type de grossesse			0,04
Simple	13 (59)	6 (25)	
Gémellaire	6 (27)	15 (63)	
Triple	3 (14)	3 (13)	
Corticothérapie anténatale	21 (95)	16 (67)	0,02*
Antibiothérapie maternelle dans les 2 mois précédant la naissance (hors accouchement)	3 (14)	14 (58)	< 0,01
Antibiothérapie <i>per-partum</i>	6 (27)	6 (25)	0,86
Mode d'accouchement			0,84
Voie basse	7 (32)	7 (29)	
Césarienne	15 (68)	17 (71)	
Fraction inspirée en oxygène (FiO2) minimale durant les 48 premières heures			-
21 à 40%	21 (95)	24 (100)	
41 à 60%	0 (0)	0 (0)	
61 à 90%	0 (0)	0 (0)	
91 à 100%	0 (0)	0 (0)	
Donnée manquante	1 (5)	0 (0)	
Fraction inspirée en oxygène (FiO2) maximale durant les 48 premières heures			0,61
21 à 40%	18 (82)	18 (75)	
41 à 60%	2 (9)	3 (13)	
61 à 90%	0 (0)	0 (0)	
91 à 100%	1 (5)	3 (13)	
Donnée manquante	1 (5)	0 (0)	
Déficit en base durant les 48 premières heures			0,48
≤ 7	17 (77)	18 (75)	
7,1 à 9,9	2 (9)	5 (21)	
10 à 14,9	2 (9)	1 (4)	
≥ 15	0 (0)	0 (0)	
Donnée manquante	1 (5)	0 (0)	
Supplémentation probiotique	10 (45)	13 (54)	0,55
Durée d'hospitalisation en jours	49 (33 - 67)	70 (55 - 113)	< 0,01
Durée de ventilation assistée en jours	1 (0 - 3)	5 (1 - 24)	< 0,01
Durée de CPAP en jours	20 (8 - 35)	20 (9 - 29)	0,83
Durée de parentérale en jours	24 (14 - 29)	21 (16 - 30)	0,81
Durée d'arrêt de nutrition entérale en jours	6 (3 - 9)	4 (2 - 11)	0,93
Durée d'antibiothérapie post-natale en jours	7 (2 - 13)	9 (2 - 22)	0,28

Les données numériques sont exprimées en médiane (1^{er} et 3^e quartiles)

N = effectif total dans chaque population ; n (%) = nombre d'enfants concernés (pourcentage)

* Test de Fisher exact

CPAP : Continuous Positive Airway Pressure

Tableau III : Colonisation microbienne au sein des deux centres

	Centre 1 CHU Nantes	Centre 2 Institut de Puériculture de Paris	<i>p</i>
	n/N (%)	n/N (%)	
<i>Staphylococcus</i>			
Semaine 1	11/17 (65)	17/22 (77)	0,48*
Semaine 2	15/16 (94)	20/21 (95)	1,00*
Semaine 3	13/13 (100)	19/22 (86)	0,28*
Semaine 4	11/11 (100)	19/20 (95)	1,00*
<i>Enterococcus</i>			
Semaine 1	0/17 (0)	2/22 (9)	0,49*
Semaine 2	3/16 (19)	2/21 (10)	0,63*
Semaine 3	2/13 (15)	7/22 (32)	0,43*
Semaine 4	2/11 (18)	8/20 (40)	0,26*
Entérobactéries			
Semaine 1	0/17 (0)	5/22 (23)	0,06*
Semaine 2	0/16 (0)	13/21 (62)	< 0,01
Semaine 3	0/13 (0)	18/22 (82)	< 0,01
Semaine 4	1/11 (9)	17/20 (85)	< 0,01*
<i>Clostridium</i>			
Semaine 1	1/17 (6)	5/22 (23)	0,21*
Semaine 2	0/16 (0)	8/21 (38)	< 0,01*
Semaine 3	4/13 (31)	14/22 (64)	0,06
Semaine 4	4/11 (36)	15/20 (75)	0,06*
<i>Bifidobacterium BB536</i>			
Semaine 1	15/19 (79)	20/21 (95)	0,17*
Semaine 2	13/21 (62)	15/22 (68)	0,67
Semaine 3	13/20 (65)	13/21 (62)	0,84
Semaine 4	8/12 (67)	16/21 (76)	0,69*
<i>Lactobacillus GG</i>			
Semaine 1	17/19 (90)	21/21 (100)	0,22*
Semaine 2	11/21 (52)	15/22 (68)	0,29
Semaine 3	8/20 (40)	10/21 (48)	0,62
Semaine 4	7/12 (58)	11/21 (52)	0,74

n = nombre de prélèvements positifs ; N = nombre total de prélèvements hebdomadaires

% = taux de colonisation

* Test de Fisher exact

Colonisation à entérobactéries

La colonisation à entérobactéries était associée à une fréquence significativement plus importante d'antibiothérapie maternelle (limitée au 2 derniers mois de grossesse, hors accouchement) (Tableau IV). On notait également un nombre moindre de cures de corticothérapie anténatale. Les nouveau-nés colonisés à entérobactéries présentaient une durée de ventilation assistée ainsi qu'une durée d'hospitalisation plus importantes. L'analyse

multivariée était limitée par un « effet centre » fort, lequel avait tendance à réduire toute autre association avec la colonisation à entérobactéries. Le retrait du paramètre « centre » permettait toutefois de retrouver le lien unissant entérobactéries et antibiothérapie maternelle (Tableau V).

Tableau IV : Colonisation à entérobactéries et caractéristiques des populations

	Absence de colonisation à entérobactéries N = 23 n (%)	Colonisation à entérobactéries N = 23 n (%)	p
Sexe (M/F)	14/9	14/9	1
Age gestationnel en semaines d'aménorrhée	29 (28 - 29)	29 (26 - 29)	0,35
Poids de naissance en grammes	1 205 (880 - 1 285)	1 040 (870 - 1 340)	0,94
Type de grossesse			0,29
Simple	12 (52)	7 (30)	
Gémellaire	8 (35)	13 (56)	
Triple	3 (13)	3 (13)	
Corticothérapie anténatale	21 (91)	16 (70)	0,13*
Antibiothérapie maternelle dans les 2 mois précédant la naissance (hors accouchement)	5 (22)	12 (52)	0,03
Antibiothérapie <i>per-partum</i>	6 (26)	6 (26)	1
Mode d'accouchement			0,2
Voie basse	9 (39)	5 (22)	
Césarienne	14 (61)	18 (78)	
Supplémentation probiotique	12 (52)	11 (48)	0,77
Durée d'hospitalisation en jours	53 (37 - 67)	70 (52 - 113)	< 0,05
Durée de ventilation assistée en jours	1 (0 - 6)	3 (1 - 23)	0,14
Durée de CPAP en jours	19 (6 - 34)	20 (11 - 29)	0,96
Durée de parentérale en jours	26 (15 - 35)	19 (16 - 28)	0,23
Durée d'arrêt de nutrition entérale en jours	7 (3 - 10)	4 (2 - 9)	0,38
Durée d'antibiothérapie post-natale en jours	10 (2 - 20)	7 (2 - 15)	0,73

Les données numériques sont exprimées en médiane (*1^{er}* et *3^e* quartiles)

N = effectif total dans chaque population ; n (%) = nombre d'enfants concernés (pourcentage)

* Test de Fisher exact

CPAP : Continuous Positive Airway Pressure

Tableau V : Régression logistique vis-à-vis de la colonisation à entérobactéries

	p	Odd Ratio (95% IC)
Antibiothérapie maternelle au cours des deux derniers mois de grossesse (hors accouchement)	0,04	4,06 (1,04 - 15,86)
Corticothérapie anténatale	0,09	0,22 (0,04 - 1,27)
Poids de naissance	0,88	1,73 (0,79 - 1,31)

IC : Intervalle de confiance

Colonisation à *Clostridium*

La colonisation à *Clostridium* n'était significativement associée à aucun facteur anté- ou per-natal (Tableau VI). L'antibiothérapie maternelle (limitée aux 2 derniers mois de grossesse, hors accouchement) avait cependant tendance à être plus fréquente chez les enfants colonisés. De même, la colonisation à *Clostridium* était plus souvent associée à une durée de CPAP, de nutrition parentérale et d'antibiothérapie post-natale moins importante. En analyse multivariée, aucun facteur anténatal ne ressortait de manière significative (Tableau VII). L'« effet centre » limitait en effet la régression logistique et ainsi la détermination d'une association avec la colonisation à *Clostridium*.

Tableau VI : Colonisation à *Clostridium* et caractéristiques des populations

	Absence de colonisation à <i>Clostridium</i>	Colonisation à <i>Clostridium</i>	<i>p</i>
	N = 20	N = 26	
	n (%)	n (%)	
Sexe (M/F)	14/6	14/12	0,27
Age gestationnel en semaines d'aménorrhée	29 (28 - 29)	28 (27 - 29)	0,21
Poids de naissance en grammes	1158 (931 - 1324)	1100 (840 - 1313)	0,63
Type de grossesse			0,83
	Simple	10 (39)	
	Gémellaire	12 (46)	
	Triple	4 (15)	
Corticothérapie anténatale	18 (90)	19 (73)	0,26*
Antibiothérapie maternelle dans les 2 mois précédant la naissance (hors accouchement)	5 (25)	12 (46)	0,14
Antibiothérapie <i>per-partum</i>	5 (25)	7 (27)	0,88
Mode d'accouchement			0,56
	Voie basse	7 (27)	
	Césarienne	19 (73)	
Supplémentation probiotique	9 (45)	14 (54)	0,55
Durée d'hospitalisation en jours	65 (44 - 94)	62 (34 - 78)	0,63
Durée de ventilation assistée en jours	1 (0 - 17)	3 (1 - 10)	0,54
Durée de CPAP en jours	28 (11 - 41)	17 (6 - 25)	0,02
Durée de parentérale en jours	26 (20 - 34)	18 (16 - 27)	0,08
Durée d'arrêt de nutrition entérale en jours	6 (3 - 10)	4 (2 - 10)	0,48
Durée d'antibiothérapie post-natale en jours	11 (3 - 22)	4 (2 - 10)	0,12

Les données numériques sont exprimées en médiane (1^{er} et 3^e quartiles)

N = effectif total dans chaque population ; n (%) = nombre d'enfants concernés (pourcentage)

* Test de Fisher exact

CPAP : Continuous Positive Airway Pressure

Tableau VII : Régression logistique vis-à-vis de la colonisation à *Clostridium*

	p	Odd Ratio (95% IC)
Antibiothérapie maternelle au cours des deux derniers mois de grossesse (hors accouchement)	0,19	2,40 (0,64 - 8,90)
Corticothérapie anténatale	0,18	0,30 (0,05 - 1,70)
Poids de naissance	0,73	0,96 (0,75 - 1,20)

IC : Intervalle de confiance

DISCUSSION

L'étude de la colonisation microbienne du tractus gastro-intestinal de nouveau-nés prématurés au sein de 2 services de néonatalogie (CHU de Nantes et IPP) retrouvait une incidence plus élevée d'entérobactéries et de *Clostridium* à l'IPP. L'analyse multivariée n'a pas permis d'associer la colonisation à *Clostridium* à un facteur anténatal particulier ; l'« effet centre » est ainsi apparu prédominant sur tout autre effet. Concernant les entérobactéries, un lien fort existant avec l'administration d'antibiotiques au cours des deux derniers mois de grossesse (hors accouchement) a pu être mis en évidence. Cependant, l'origine de ce lien (causalité directe/indirecte ou simple association) n'a pu être précisée.

Penders et al ont recherché chez 1032 nouveau-nés de plus de 34 semaines d'aménorrhée les différents facteurs pouvant influencer la colonisation bactérienne du tractus digestif néonatal [19]. La prise d'antibiotiques lors de la grossesse n'a pas influé significativement sur le microbiote intestinal. Cette constatation va à l'encontre d'un effet causal direct entre l'antibiothérapie maternelle et la « sur-représentation » des entérobactéries. Toutefois, la population décrite par Penders différait en âge ; par ailleurs, la notion d'antibiothérapie maternelle était limitée au dernier mois de grossesse. Le lien de causalité pourrait alors être indirect. L'administration d'antibiotiques lors de la grossesse serait susceptible de sélectionner des souches résistantes qui, transmises au nouveau-né au moment de la naissance, se développeraient de manière prépondérante puisque insensibles aux antibiotiques. Cependant, la fréquence des césariennes est élevée chez le nouveau-né prématuré (près de 70% dans notre étude), ce qui limite les cas de transmission du microbiote maternel. Enfin, l'association antibiothérapie maternelle – microbiote intestinal néonatal pourrait être liée à d'autres facteurs caractérisant l'IPP (prédominance de l'« effet centre »). Celui-ci était en effet marqué par une incidence plus élevée de prématurissimes (< 28 SA), laquelle pourrait

être liée à l'incidence plus élevée de grossesses multiples. La prématurité est caractérisée par un retard de colonisation [12, 33, 42 - 44] retentissant notamment sur les bifidobactéries [36]. L' « effet barrière » exercé par ces dernières est alors moindre, favorisant la prédominance des germes pathogènes et potentiellement pathogènes [12, 35]. La fréquence plus élevée d'antibiothérapie maternelle à l'IPP serait donc le reflet de pathologies obstétricales plus graves entraînant une prématurité accrue. Celle-ci majorerait alors le retard de colonisation retentissant principalement sur les germes « bénéfiques ». Les entérobactéries et le genre *Clostridium* pourraient ainsi bénéficier d'un « effet barrière » altéré voire absent.

Par ailleurs, un défaut dans le transport des prélèvements n'est pas à exclure. En effet, seul 1 prélèvement parmi les 52 réalisés au CHU de Nantes a permis d'isoler des entérobactéries. La mise en culture, bien que peu sensible et peu spécifique par rapport aux techniques modernes de biologie moléculaire [29, 45], n'apparaissait pas en cause puisque l'identification fut possible pour les prélèvements provenant de l'IPP. Ainsi, l'absence d'entérobactéries sur les prélèvements nantais pourrait être liée à un problème technique en rapport avec le transport.

L'interprétation de la différence de colonisation entre les 2 centres pâtissait de l'absence de certaines informations anté- et post-natales. Ainsi le détail des antibiothérapies maternelles ainsi que les résultats des prélèvements bactériologiques maternels n'étaient pas renseignés. De même, les conditions d'accueil du nouveau-né (prise en charge en salle de naissance, à domicile ; notion de transfert secondaire) étaient inconnues. Celles-ci définissent pourtant le premier microbiote auquel le nouveau-né est exposé. Enfin la connaissance des mesures d'hygiène propres aux services (soins antiseptiques, conditions d'isolement, prévention des infections nosocomiales...) aurait peut-être conduit à définir de nouvelles particularités propres aux centres.

L' « effet centre » limitait l'analyse multivariée. Il paraissait en effet difficile de dissocier l'association « facteurs anténataux » - « centre » de celle liant ces mêmes facteurs avec la colonisation microbienne. Au décours de l'analyse multivariée, il ressortait que l'antibiothérapie maternelle pourrait interférer sur le microbiote intestinal du nouveau-né prématuré. Une étude observationnelle ouverte à un nombre plus important de centre permettrait de préciser le lien entre les différents facteurs anténataux et le développement du microbiote intestinal néonatal.

CONCLUSION

La mise en place du microbiote intestinal débute à la naissance et est sous l'influence de nombreux facteurs dont le mode de naissance, le type d'allaitement et l'administration éventuelle d'antibiotiques. Chez le nouveau-né prématuré, ce microbiote subit un retard de colonisation du fait de conditions physiologiques particulières (immaturité digestive et immunitaire, troubles de la vascularisation mésentérique, troubles de la motilité intestinale) et de modifications touchant les principaux facteurs influençants (prédominance des césariennes, retard dans l'introduction de l'alimentation entérale, limitation des rations, utilisation accrue des antibiotiques).

L'étude du microbiote intestinal néonatal au sein de deux services de néonatalogie a permis de mettre en évidence une différence de colonisation. La causalité n'a pu clairement être établie du fait d'un « effet centre » majeur. L'impact de l'antibiothérapie maternelle au cours des 2 derniers mois de grossesse sur la colonisation bactérienne du nouveau-né prématuré reste cependant à éclaircir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Guamer F, Magagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 360: 512-9.
- 2 Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 1997; 6: S43-5.
- 3 Frankel WL, Zhang W, Singh A, et al. Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 1994; 106: 375-80.
- 4 Mazmanian SK, Liu CH, Tzanabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122: 107-18.
- 5 Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996; 89: 494-50.
- 6 Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology* 2000; 100: 119-30.
- 7 Bernet-Camard MF, Lievin V, Brassart D, Neeser JR, Servin A, Hudault S. The human lactobacillus acidophilus strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *App Env Microbiol* 1997; 63: 2747-53.
- 8 Lievin V, Peiffer I, Hudault S, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646-52.
- 9 Araya-Kojima T, Yaeshima T, Ishibashi N, et al. Inhibitory effects of Bifidobacterium longum BB536 on harmful intestinal bacteria. *Bifidobacteria microflora* 1995; 14: 59-66.
- 10 Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984; 86: 174-93.
- 11 Papastathopoulou A, Bezirtzoglou E, Legakis NJ. Bacteroides fragilis : production and sensitivity to bacteriocins. *Anaerobe* 1997; 3: 203-6.
- 12 Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy : composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91: 48-55.
- 13 Sudo N, Sawamura S, Tanaka R, et al. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997; 159: 1739-45.
- 14 Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breast-fed infants. *Acta paediatr Suppl* 1999; 88: 47-57.
- 15 Ducluzeau R. Development, equilibrium and role of microbial flora in the newborn. *Ann Pediatr* 1993; 40: 13-22.

- 16 Bezirtzoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe* 1997; 3: 173-7.
- 17 Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 19-25.
- 18 Bennet R, Nord CE. Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection* 1987; 15: 332-6.
- 19 Penders J, Thijs C, Vink C, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118: 511-21.
- 20 Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983; 72: 317-21.
- 21 Balmer SE, Wharton BA. Diet and faecal flora in newborn : breast milk and infant formula. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1672-7.
- 22 Lundequist B, Nord CE, Winberg J. The composition of the faecal microflora in breast-fed and bottle-fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatr Scand* 1985; 74: 45-51.
- 23 Balmer SE, Scott PH, Wharton BA. Diet and faecal flora in newborn : Casein and whey proteins. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1678-84.
- 24 Mevissen-Verhage E, Marcelis J, de Vos M, Harmsen-van Amerongen W, Verhoef J. Bifidobacterium, Bacteroides, and Clostridium spp. In fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J clin Microbiol* 1987; 25: 285-9.
- 25 Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 1984; 28: 975-86.
- 26 Collins MD, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1052S-7S.
- 27 Costalos C, Skouteri V, Gounaris, et al. Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*. *Early Hum Dev* 2003; 74: 89-96.
- 28 Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 1735-42.
- 29 Mohan R, Koebnick C, Schildt J, et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4025-31.
- 30 Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, et al. Early administration of *Bifidobacterium breve* to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 76: F101-07.
- 31 Newburg DS. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: S8-17.

- 32 Otnæss AK, Læg Reid A, Ertresvåg K. Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect Immun* 1983; 40: 563-9.
- 33 Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999; 80: F167-73.
- 34 Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of fecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990; 65: 185-8.
- 35 Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, et al. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 2003; 54: 393-9.
- 36 Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full term infants. *Eur J Pediatr* 1985; 144: 186-90.
- 37 Zupan V. Prématurité. In: Laugier J, Rozé JC, editors. Soins aux nouveau-nés. Avant, pendant et après la naissance. Paris : Masson ; 2002. p157-73.
- 38 López-Alonso M, Moya MJ, Cabo JA, Ribas J, del Carmen Macías M, Silny J, Sifrim D. Twenty-four-hour esophageal impedance-pH monitoring in healthy preterm neonates: rate and characteristics of acid, weakly acidic, and weakly alkaline gastroesophageal reflux. *Pediatric* 2006; 118: e299-308.
- 39 Andersson Y, Sävman K, Bläckberg L, Hernell O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta paediatr* 2007; 96: 1445-9.
- 40 Braga LPM, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83: 59-63.
- 41 Wight NE. Donor human milk for preterm infants. *J Perinatol* 2001; 21: 249-54.
- 42 Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, Bishop RF, Cambell NT, Gilliam GL. Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J Med Microbiol* 1982; 15: 519-29.
- 43 Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5: 533-9.
- 44 Westerbeek EAM, van den Berg A, Lafeber HN, et al. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants : a review of the literature. *Clin Nutr* 2006; 25: 361-8.
- 45 Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-7.

NOM : MAZEIRAS PRENOM : Gaël

Titre de Thèse :

FACTEURS INFLUENÇANT LA COLONISATION BACTERIENNE DU TRACTUS DIGESTIF CHEZ LE NOUVEAU-NE PREMATURE : A propos d'un « effet centre »

RESUME

Pré-requis : La mise en place du microbiote intestinal débute à la naissance et est sous l'influence de nombreux facteurs. La différence de colonisation observée au sein de deux services de néonatalogie a motivé la recherche des différents facteurs pouvant expliquer cet « effet centre ».

Méthode : Description des populations au sein des deux centres puis de leur colonisation bactérienne. Analyse univariée puis multivariée des différents facteurs caractérisant les populations colonisées.

Résultats : L'Institut de Puériculture de Paris (IPP) était caractérisé par une incidence accrue d'entérobactéries et de *Clostridium* durant le premier mois de vie. Il accueillait par ailleurs des enfants dont l'âge gestationnel était plus faible, issus plus fréquemment de grossesses multiples qu'au CHU de Nantes. L'antibiothérapie maternelle au cours des deux derniers mois de grossesse (hors accouchement) était plus fréquente à l'IPP ainsi que parmi les enfants colonisés à entérobactéries. La puissance de l' « effet centre » limitait l'analyse multivariée.

Conclusion : L' « effet centre » est apparu prédominant sur tout autre effet. L'antibiothérapie maternelle était cependant associée à une incidence accrue d'entérobactéries sans que le sens de ce lien soit clairement défini.

MOTS-CLES

Prématuré, microbiote intestinal, colonisation bactérienne, antibiothérapie maternelle