

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

le 21 juin 2006

par Melle Claire LECOMTE

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Epidémiologie bactérienne du tube digestif
en période néonatale : étude préliminaire**

Président : Mme Françoise BALLEREAU, Professeur de Santé Publique et
Pharmacie Clinique - Pharmacie

Membres du jury : M. Jean Christophe ROZE, Professeur de Réanimation Pédiatrique
- Médecine
Mme Jocelyne CAILLON, Maître de Conférences de Bactériologie
Mme Marie France DE LA COCHETIERE, chercheur INSERM
Mme Christèle GRAS-LE GUEN, Praticien Hospitalier Réanimation
Pédiatrique

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
GENERALITES	6
I- Topographie du tube digestif : rappels	7
I-1 Les différents segments du tractus digestif.....	7
I-2 Définitions	7
I-2-1 Colonisation.....	7
I-2-2 Flore.....	8
I-2-2-1 Flore autochtone.....	8
I-2-2-2 Flore allochtone.....	8
I-2-3 Axénique / gnotoxénique.....	8
I-2-4 Effet de barrière.....	8
II-Principales pathologies digestives donnant lieu à chirurgie parmi les nouveau-nés inclus dans l'étude	9
II-1 Atrésie intestinale	9
II-2 Entérocolite ulcéro-nécrosante	10
II-3 Volvulus primitif du grêle	11
II-4 Malformations ano-rectales	11
II-5 Perforations colique et iléale	11
III- Facteurs impliqués dans la cinétique d'installation de la flore bactérienne digestive en période néonatale : revue de la littérature	12
III-1 Terme de naissance	12
III-2 Mode de délivrance	14
III-2-1 Flore vaginale.....	14
III-2-2 Flore fécale.....	14
III-2-3 Flore cutanée.....	15
III-2-4 Revue de la littérature	15
III-3 Mode de nutrition	16
III-3-1 Lait maternel	17
III-3-2 Formules	17
III-4 Environnement , hygiène	18
III-5 Antibiotiques	18
III-6 Autres facteurs	19
III-6-1 Immunité d'origine maternelle	19
III-6-2 Terrain génétique	19
MATERIEL ET METHODE	20
I- Population étudiée	21
I-1 Critères d'inclusion.....	21

I-1-1 Age lors des prélèvements.....	21
I-1-2 Indication de la chirurgie digestive	21
I-1-3 Consentement signé des parents.....	21
I-2 Prélèvements biologiques	21
I-2-1 Nature	21
I-2-1-1 Prélèvement per opératoire	22
I-2-1-2 Prélèvement de selles	22
I-2-2 Contenant et acheminement	22
II-Culture	22
II-1 Ensemencement	22
II-1-1 Dilutions	22
II-1-2 Milieux ensemencés	22
II-1-3 Mode d'ensemencement.....	24
II-2 Incubation	24
II-3 Lecture des cultures	24
II-3-1 Analyse quantitative.....	25
II-3-2 Analyse qualitative.....	25
II-4 Identification.....	25
II-4-1 Vitek 2	25
II-4-2 Galeries biochimiques (API 20A).....	28
II-5 Antibiogrammes	28
II-5-1 Vitek 2	28
III- Approche par biologie moléculaire.....	30
III-1 Extraction de l'ADN	30
III-1-1 Lyse chimique.....	31
III-1-2 Lyse mécanique	31
III-1-3 Précipitation des gros débris.....	31
III-1-4 Précipitation des acides nucléiques.....	31
III-1-5 Contrôle de l'extraction	32
III-2 Amplification de l'ADNr 16S par PCR V6-V8	32
III-2-1 Choix de la séquence à amplifier	32
III-2-2 Choix des amorces	32
III-2-3 Préparation du mix.....	33
III-2-4 Les différentes étapes de la PCR	34
III-3 Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE).....	36
III-3-1 Principe	36
III-3-2 Mode opératoire	38
III-4 Séquençage :.....	40
III-4-1 Excision des bandes de TTGE	40
RESULTATS	43
I-Nouveau-nés inclus	44
I-1 Age lors des prélèvements	44
I-2 Indication de la chirurgie digestive.....	45
I-3 Autres caractéristiques de la population étudiée.....	45
I-3-1 Terme de naissance.....	45
I-3-2 Poids de naissance	46
I-3-3 Mode de naissance.....	46
I-3-4 Antibiotiques	47

I-3-5 Mode de nutrition	48
II-Culture	48
II-1 Prélèvements per opératoires.....	48
II-2 Prélèvements de selles	49
II-3 Antibiogrammes	52
III-Biologie moléculaire.....	65
III-1 Contrôle de l'extraction.....	65
III-2 Révélation de la PCR V6-V8	66
III-3 TTGE.....	67
III-3-1 Séquençage des bandes de TTGE	69
III-3-2 Gel compar 2.2®.....	76
III-3-2-1 Comparaison intra-patient	76
III-3-2-2 Comparaison inter-gels.....	79
DISCUSSION	80
CONCLUSION	86
ANNEXES	91
BIBLIOGRAPHIE.....	99

INTRODUCTION

Les indications de chirurgie digestive au cours du premier mois de vie sont rares. De fait il n'existe pas de recommandation concernant le type d'antibioprophylaxie à administrer au nouveau-né. L'antibioprophylaxie choisie est donc la même que celle de l'adulte, et ce, alors que leurs flores digestives diffèrent notablement. Elle consiste, le plus souvent, en l'association d'un aminoside, d'une céphalosporine et de vancomycine. Or, le risque de complications étant essentiellement lié à la flore colonisant le tube digestif, il importe d'adapter au mieux cette antibioprophylaxie.

La plupart des études déjà réalisées sur l'écologie bactérienne digestive portent sur l'analyse de la flore fécale, or celle-ci ne reflète que la partie terminale du tube digestif (**El Mohandes et al, 1993**), (**Benno et al, 1984**), (**Favier et al, 2002**), (**Gronlund et al, 1999**), (**Gewolb et al, 1999**).

L'objectif de notre étude est de décrire l'installation de la flore bactérienne à différents niveaux du tube digestif chez des nouveau-nés âgés de 0 à 30 jours afin de proposer une antibioprophylaxie adaptée.

Dans notre étude, tous les nouveau-nés ont été prélevés au niveau digestif lors de leur chirurgie digestive ; puis des prélèvements fécaux ont en plus été réalisés jusqu'à J30 de vie.

Dans une première partie, après un bref rappel de la topographie du tractus digestif et des pathologies digestives du nouveau-né susceptibles d'entraîner une chirurgie digestive, nous aborderons les facteurs impliqués dans la cinétique d'installation de la flore digestive.

Dans une deuxième partie, nous présenterons les deux approches utilisées dans cette étude pour identifier la flore bactérienne présente dans les prélèvements digestifs et fécaux :

- la culture (aérobie /anaérobie)
- la biologie moléculaire : après extraction de l'ADN total du prélèvement puis amplification par PCR de la région V6-V8 de l'ADNr 16S et enfin révélation par électrophorèse en gradient de température dénaturant (TTGE).

Ces deux approches différentes sont complémentaires. Les limites de chaque méthode seront discutées.

GENERALITES

I- Topographie du tube digestif : rappels

La composition de la flore microbienne digestive d'un individu est caractérisée par sa complexité et sa diversité. Elle est variable dans le temps et dans l'espace.

Ainsi les flores digestives du nouveau-né, du nourrisson puis de l'adulte sont différentes.

De même elle présente un gradient croissant de la bouche à l'anus. Cependant une fois établie cette flore digestive est relativement stable chez un même individu, elle lui est propre (**Rambaud *et al*, 2004**).

I-1 Les différents segments du tractus digestif

Le tube digestif est composé de :

- l'estomac : du fait de son pH acide (pH=3) les bactéries éventuellement ingérées sont rapidement détruites. La flore gastrique dépasse rarement 10^4 , 10^5 UFC/mL.

- l'intestin grêle : composé respectivement des segments suivants : duodénum, jéjunum, iléon. Après le passage de l'estomac à pH acide, le pH redevient neutre, l'oxygène se raréfie et la flore bactérienne qui a survécu au passage gastrique va augmenter progressivement du duodénum à l'iléon. La flore du duodénum-jéjunum n'excède pas 10^4 à 10^6 UFC/g de contenu intestinal et est composée d'espèces aéroanaérobies facultatives (AAF). La flore iléale est plus importante, atteignant 10^5 à 10^7 UFC/g de contenu intestinal avec une flore anaérobie stricte prédominante.

- le côlon est le segment du tube digestif le plus riche en bactéries. On admet qu'il contient 10^9 à 10^{11} bactéries par gramme de contenu intraluminal. Du fait du potentiel redox très faible, le côlon est colonisé essentiellement par des bactéries anaérobies.

Ces données quantitatives quant aux bactéries présentes dans le tractus digestif ont été établies chez l'adulte (**Hagiage, 1994**) ; on dispose de nettement moins de données concernant le nouveau-né, qu'il soit prématuré ou à terme (**Rambaud *et al*, 2004**).

I-2 Définitions

Quelques définitions sont proposées pour caractériser la flore digestive (**Hagiage, 1994**).

I-2-1 Colonisation

La colonisation correspond à la flore bactérienne présente dans le tube digestif.

I-2-2 Flore

I-2-2-1 Flore autochtone

On appelle flore « autochtone » ou encore « résidente », l'ensemble des espèces microbiennes présentes de façon constante dans le tube digestif et capables de s'y multiplier. Ces souches présentant un tropisme cellulaire et tissulaire spécifique sont isolées de façon répétée dans la flore sur une longue période de temps et sont caractéristiques d'un individu. Au sein de cette flore résidente on distingue la flore dominante présente à des taux de 10^9 à 10^{11} UFC/g (essentiellement composée de bactéries anaérobies strictes) et la flore sous-dominante présente à des taux de 10^6 à 10^8 UFC/g et essentiellement composée de bactéries aéroanaérobies facultatives.

I-2-2-2 Flore allochtone

On qualifie de flore « allochtone » ou « de passage » les espèces bactériennes en transit ou à pouvoir d'implantation transitoire dans le tube digestif. Cette flore ne s'implante pas dans le tube digestif sauf circonstances pathologiques particulières. Cette flore dont la densité est très inférieure (10^5 à 10^6 UFC/g) est relativement polymorphe.

I-2-3 Axénique / gnotoxénique

Axénique caractérise l'absence totale de colonisation bactérienne; cet état correspond au statut du nouveau-né juste avant la naissance.

Gnotoxénique définit, à l'inverse un individu colonisé de façon normale.

I-2-4 Effet de barrière

La stabilité de la composition de la flore intestinale chez un même individu adulte est remarquable car le tube digestif est soumis à l'apport constant de microorganismes provenant de l'environnement par l'intermédiaire de l'alimentation, par exemple. Elle est la conséquence de l'efficacité de mécanismes de défense empêchant ou limitant le développement de populations de microorganismes d'origine exogène. La première ligne de défense étant le pH gastrique; la seconde étant ce que l'on appelle « l'effet de barrière ». L'effet de barrière correspond à la capacité des très nombreuses espèces qui colonisent le tube digestif à s'opposer à l'implantation et à la multiplication de bactéries exogènes. Cet effet de barrière

est lié à la présence d'une ou plusieurs espèces microbiennes appartenant à la flore dominante (**Hagiage, 1994**).

Une expérience met en évidence cet effet de barrière: suite à l'administration d'une souche de *Shigella flexneri* à une souris axénique, celle-ci s'implante dans le tube digestif de la souris. En revanche cette même souche administrée à une souris ayant une flore normale va subir l'effet de barrière de l'écosystème intestinal. Les mécanismes responsables de cet effet de barrière sont mal connus. Ils font sans doute intervenir des mécanismes de compétition entre les bactéries pour des substrats, des sites d'adhésion sur la muqueuse intestinale ou encore la production de substances inhibitrices par certaines d'entre elles vis à vis d'autres (**Freney et al, 2000**).

II-Principales pathologies digestives donnant lieu à chirurgie parmi les nouveau-nés inclus dans l'étude

Les indications de chirurgie digestive durant le premier mois de vie ne sont pas fréquentes (**Navarro & Schmitz, 2000**) les principales sont :

II-1 Atrésie intestinale

L'atrésie intestinale correspond à l'interruption de la continuité intestinale. Selon le niveau de cette interruption on distingue notamment l'atrésie duodénale et l'atrésie jéjunale.

Atrésie duodénale :

L'atrésie duodénale désigne l'occlusion complète ou incomplète du duodénum. Il s'agit d'une malformation congénitale rare : 1/5000 à 1/10000 naissances sans prédominance de sexe.

Le diagnostic prénatal est possible par échographie : il associe hydramnios, dilatation de l'estomac et du premier duodénum (image en double bulle) et raréfaction des images intestinales vues à 2 ou 3 examens successifs.

Les signes révélateurs après la naissance sont :

- des vomissements bilieux apparaissant à J1 ou J2 de vie , en tout cas dès les premiers essais d'alimentation

- des régurgitations , fausses routes
- l'absence d'évacuation de méconium (obstacle sous-vatérien).

Il s'agit d'une occlusion à ventre plat.

Pour affirmer l'occlusion duodénale la réalisation d'un abdomen sans préparation est nécessaire. Celui-ci objective ce diagnostic par l'image caractéristique de double niveau hydro-aérique. L'estomac est en effet distendu par rétention de liquide et de gaz ; le duodénum situé en amont de l'occlusion est également distendu (rétention liquidienne).

Les atrésies duodénales provoquent une stase dans l'anse occluse et distendue ; la stase risquant de favoriser une pullulation bactérienne.



Photo 1 : Abdomen sans préparation d'une atrésie duodénale

Atrésie jéjunale :

De la même façon que pour l'atrésie duodénale il s'agit d'une occlusion de la continuité intestinale, mais située plus en aval.

II-2 Entérocolite ulcéro-nécrosante

Il s'agit d'une pathologie du prématuré essentiellement. Sa fréquence est estimée à 1-3 nouveau-nés / 1000 naissances vivantes.

Son étiologie est multifactorielle mais la prématurité y prend une place importante. L'âge de début est inversement proportionnel au poids de naissance et à l'âge de gestation; ainsi des diagnostics d'entérocolites ulcéro-nécrosantes peuvent survenir très tardivement chez de grands prématurés.

Les signes digestifs sont les suivants :

- vomissements
- rectorragies
- météorisme abdominal

Et à un stade ultérieur un tableau de subocclusion intestinale avec vomissements, résidus bilieux, arrêt du transit, abdomen douloureux et tendu.

II-3 Volvulus primitif du grêle

Il s'agit d'une torsion de la totalité du grêle autour de son mésentère en dehors d'une anomalie mésentérique. Le mécanisme reste inexpliqué. Cette pathologie rare de survenue brutale peut entraîner une nécrose irréversible du grêle.

Le tableau clinique est celui d'une occlusion néonatale survenant à J1 ou J2 après la naissance. Elle correspond à une occlusion duodénale car les vomissements sont bilieux. La gravité est due au caractère complet du volvulus : parfois la nécrose intestinale est immédiate. Le diagnostic est posé sur l'abdomen sans préparation qui montre une dilatation aérique importante de l'estomac voire de la partie proximale du duodénum, l'aération sous-jacente étant pauvre.

L'échographie abdominale avec doppler des vaisseaux mésentériques montre une orientation anormale des vaisseaux mésentériques.

II-4 Malformations ano-rectales

Les malformations anorectales regroupent un spectre de malformations allant de l'anomalie mineure et isolée de l'anus à la malformation complexe fréquemment associée à d'autres malformations. Leur fréquence est estimée à 1/4000 naissances.

II-5 Perforations colique et iléale

Il s'agit de perforations survenant au niveau terminal de l'intestin grêle ou au niveau du côlon et mettant en communication le contenu intraluminal avec la cavité abdominale.

III- Facteurs impliqués dans la cinétique d'installation de la flore bactérienne digestive en période néonatale : revue de la littérature

In utero, le tractus digestif est stérile. Après la naissance une microflore le colonise progressivement. Plusieurs facteurs interviennent dans l'établissement de cette flore digestive en période néonatale, on peut citer notamment :

le terme de naissance, le mode de délivrance, le mode de nutrition, l'environnement, l'hygiène, les antibiotiques, mais aussi l'immunité d'origine maternelle, le système immunitaire du nouveau-né, son terrain génétique...

III-1 Terme de naissance

Un nouveau-né est dit prématuré quand sa naissance survient entre 22 et 37 semaines d'aménorrhée (SA) révolues. Les nouveau-nés prématurés ont des caractéristiques susceptibles d'intervenir dans l'établissement de la flore digestive.

Certains paramètres sont perturbés: la production d'acide gastrique est diminuée (or celui ci procure la première défense contre la colonisation du petit intestin), le taux de mucus protecteur également, la motilité intestinale est ralentie (risque de stase), l'activité des enzymes protéolytiques plus faible (destruction incomplète des toxines), le taux de lymphocytes B et T est bas de même que le taux d'Ig A sécrétoires (risque d'augmentation de l'adhérence bactérienne à la muqueuse intestinale) (**Hoy et al, 2000**).

Une étude américaine (**Gewolb et al, 1999**) portant sur des selles de 29 prématurés prélevées au cours du premier mois de vie et dans les conditions suivantes : antibiothérapie, nutrition par lait maternel (n=15) ou par formule (n=14) a montré que sur la population totale :

- à J10 les espèces prédominantes sont :

Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae

- à J30 les espèces prédominantes sont :

Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus haemolyticus

Par contre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* n'ont été identifiés que chez un prématuré, et à J30 seulement.

Le nombre d'espèces présentes augmente avec le temps, ainsi dans le groupe des prématurés nourris au lait maternel, le nombre moyen d'espèces est de : 2,5 à J10, 3,1 à J20 et 4,2 à J30.

A J30 l'auteur constate qu'il existe une corrélation inverse entre le nombre de jours d'antibiotiques et le nombre total de bactéries par gramme de selles.

Une étude japonaise, plus ancienne (**Sakata et al, 1985**) réalisée parmi des prématurés montrait que dans cette population le taux initial d'entérobactéries et de streptocoques était élevé; que les *Bifidobacterium* apparaissaient plus tard (J11) et devenaient prédominant à J19 seulement. Les nouveaux-nés à terme étant eux colonisés à J4 par *Bifidobacterium*.

Une autre étude (**Bennet et al, 1986**) confirme ce délai à la colonisation et la colonisation par un nombre limité d'espèces dans cette population.

Dans une étude comparative (**Hall et al, 1990**), l'auteur établit qu'à 10 jours de vie la prévalence de colonisation par *Lactobacillus* est plus haute chez les nouveau-nés à terme que chez les prématurés avec la réserve toutefois que les antibiotiques n'y sont pas complètement étrangers...

El Mohandes remarque une augmentation de la fréquence de *Staphylococcus epidermidis* dans des selles de prématurés par rapport à des selles de nouveau-nés à terme (**El Mohandes et al, 1993**).

Adlerberth souligne la disparition de la flore anaérobie chez les prématurés en raison de l'antibiothérapie. Il montre également que ceux-ci sont plutôt porteurs de *Klebsiella* ou d'*Enterobacter* que d'*Escherichia coli*; toujours en raison de cette antibiothérapie (**Adlerberth, 1999**)

Une étude allemande menée par Andreas Schwiertz compare par biologie moléculaire (technique d'électrophorèse dénaturante en gradient de concentration) la flore de prématurés hospitalisés à celle de nouveau-nés à terme nourris au sein pendant les quatre premières semaines de vie (**Schwiertz et al, 2003**). La comparaison des résultats obtenus fait ressortir que :

- le profil des prématurés est très simple à la naissance par rapport au profil des nouveau-nés à terme nourris au sein, puis il se diversifie avec le temps.

Une étude par culture de Hoy (**Hoy et al, 2000**) portant sur l'analyse d'aspirations duodénales lors du retrait des tubes nasogastriques chez 122 prématurés a montré que :

-de J1 à J3 : 69% des prélèvements sont stériles ; 31% comportent des bactéries à Gram positif

-de J4 à J7 : 42% des prélèvements sont stériles ; 48% comportent des bactéries à Gram positif et 10% des bactéries à Gram négatif

-de J8 à J14 : 23% des prélèvements sont stériles; 53% présentent des bactéries à Gram positif et 25% des bactéries à Gram négatif

-de J15 à J28 : 24% des prélèvements sont stériles ; 37% renferment des bactéries à Gram positif et 39% des bactéries à Gram négatif

En résumé ces différentes études montrent que les prématurés :

- présentent un retard à la colonisation de façon générale
- sont colonisés par un nombre réduit d'espèces bactériennes
- sont surtout colonisés par des entérobactéries ou par des bactéries de l'environnement
- présentent un retard important d'apparition de la flore anaérobie voire une suppression, or la flore anaérobie est principalement responsable de l'effet de barrière (**Hagiage, 1994**). L'absence de celle-ci risque donc de favoriser l'implantation de bactéries potentiellement pathogènes au niveau digestif.

III-2 Mode de délivrance

Selon le mode de naissance les premières bactéries rencontrées sont différentes; ainsi les enfants nés par voie basse sont d'abord en contact avec la flore maternelle (vaginale et fécale) alors que les enfants nés par césarienne sont d'abord en contact avec les bactéries de l'environnement (flore cutanée du personnel...).

III-2-1 Flore vaginale

Elle est essentiellement représentée par :

Lactobacillus : il s'agit de bactéries à Gram positif, anaérobies facultatifs (sauf exception) ou microaérophiles, ne produisant pas de spore. Leur morphologie microscopique étant assez variable d'une espèce à l'autre : allant de cocco-bacilles à bacilles. Ils sont isolés ou en courte chaînettes. Leur métabolisme énergétique est de type fermentaire.

Bifidobacterium : il s'agit de bacilles à Gram positif, anaérobies et se présentant sous forme de bâtonnets incurvés aux contours irréguliers et ondulés. Leurs extrémités sont effilées, bifurquées ou spatulées.

Mobiluncus : il s'agit de bacilles à Gram positif anaérobies, incurvés, mobiles.

Prevotella : bacilles à Gram négatif anaérobies.

III-2-2 Flore fécale

Elle est composée d'une flore anaérobie dominante représentée par :

Eubacterium : Coccobacilles à Gram positif non sporulés

Clostridium : plusieurs espèces font partie de la flore normale de l'Homme. Elles sont également largement distribuées dans l'environnement; où elles survivent en formant des spores. Il s'agit de bacilles à Gram positif généralement mobiles par flagelles péritriches et formant des spores terminales ou subterminales

Peptostreptococcus : Cocci à Gram positif

Bacteroides : Bacilles à Gram négatif

Fusobacterium : Bacilles à Gram négatif fusiformes.

Et d'une flore aérobie sous-dominante essentiellement représentée par :

- Des **Entérobactéries** : Bacilles à Gram négatif aéroanaérobies facultatifs catalase-positifs, oxydase-négative, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche, possédant une nitrate réductase et fermentant le glucose.
- ***Enterococcus*** : Cocci à Gram positif groupés par paires ou en courtes chaînettes, catalase négative.

III-2-3 Flore cutanée

Elle est surtout représentée par *Staphylococcus* : il s'agit de cocci à Gram positif groupés en amas, catalase positive.

III-2-4 Revue de la littérature

Gronlund a étudié l'influence du mode de naissance sur la colonisation digestive dans une population de 64 nouveau-nés, 30 étant nés par césarienne, 34 par voie basse (une chimioprophylaxie étant administrée à la mère de façon systématique en cas de césarienne) (**Gronlund et al, 1999**).

Cette étude montre un délai à la colonisation fécale dans le groupe « césarienne » (C). Dans ce groupe les taux de colonisation par *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* est plus faible que dans le groupe « voie basse » (VB) :

Le taux de colonisation de *Bifidobacterium* dans le groupe C atteint le taux du groupe VB au bout d'1 mois.

Le taux de colonisation des *Lactobacillus* dans le groupe C atteint le taux du groupe VB au bout de 10 jours.

A 1 mois d'âge le taux de colonisation par *Clostridium perfringens* est plus haut chez les nouveau-nés nés par césarienne.

A 6 mois de vie les enfants nés par césarienne ne sont toujours pas colonisés de façon similaire aux enfants nés par voie basse (le taux de colonisation par *Bacteroides fragilis* est de 36% dans le groupe des enfants nés par césarienne versus 76% dans le groupe des enfants nés par voie basse).

Une autre étude (**Neut et al, 1987**) montre qu'après J14 , les selles de nouveau-nés nés par césarienne :

- ne présentent *Bifidobacterium* que sporadiquement
- ne présentent pas le groupe *Bacteroides fragilis*

et que *Clostridium perfringens* est la bactérie anaérobie la plus isolée dans le groupe des enfants nés par césarienne.

Deux autres études montrent que les enfants nés par césarienne présentent un retard à l'établissement d'une flore stable (**Orrhage & Nord, 1999**) (**Bennet & Nord, 1987**).

Hall montre qu'il existe une association significative entre la colonisation par *Lactobacillus* à 10 jours de vie et la délivrance par voie basse (VB) (59% vs 28%) (**Hall et al, 1990**).

Il ressort de cette étude également que le mode de délivrance n'influence pas la présence de coliformes et de *Bifidobacterium* aussi bien à J10 qu'à J30. A 1 mois, la colonisation et le comptage sont les mêmes chez tous les nouveau-nés quel que soit le mode de délivrance.

Bezirtzoglou a étudié la flore fécale de 20 nouveau-nés nés par césarienne au cours des 14 premiers jours de vie. Il ressort que : *Bacteroides* et *Clostridium* (autre que *C. perfringens*) s'installent après *Clostridium perfringens* (**Bezirtzoglou & Romond, 1990**).

En résumé, il ressort selon ces auteurs que chez les nouveau-nés nés par césarienne :

- il existe un délai à la colonisation
- les taux de colonisation par *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont plus faibles
- *Clostridium perfringens* est la bactérie anaérobie la plus isolée

III-3 Mode de nutrition

Il s'agit vraisemblablement du facteur le plus étudié. Le mode de nutrition pouvant être chez ces enfants le lait maternel et/ou les formules.

III-3-1 Lait maternel

Le lait maternel contient notamment des facteurs antimicrobiens non spécifiques (lactoferrine, lysozyme), des facteurs d'immunité passive (Ig A polymériques, macrophages), des facteurs favorisant la maturation intestinale (Epidermal Growth Factor (EGF), Transferring Growth Factor (TGF), Glutamine).

La plupart des études s'intéressent au délai d'apparition de *Bifidobacterium* chez les nouveau-nés nourris au lait maternel :

Yoshioka *et al* montrent dans deux études (Yoshioka *et al*, 1983) (Yoshioka *et al*, 1991) que ce délai d'apparition est de 6 jours dans cette population avec un ratio de 1000 / 1 versus les entérobactéries

Pour Orrhage (Orrhage & Nord,1999) ce délai ne serait que de 4 jours.

Une autre étude (Roberts *et al*, 1992) confirme qu'à la fin de la première semaine de vie la flore de ces nouveau-nés est riche en *Bifidobacterium* sans que celle-ci soit prédominante cependant.

Par contre à 1 mois de vie, Yoshioka (Yoshioka *et al*, 1983), Balmer (Balmer & Wharton, 1989) et Roberts (Roberts *et al*, 1992) sont d'accord pour affirmer que la flore est stable dans cette population, et dominée par *Bifidobacterium*.

L'incidence des Staphylocoques est supérieur dans cette population. El Mohandes montre que parmi les Staphylocoques, *Staphylococcus epidermidis* est le plus isolé (El Mohandes *et al*, 1993).

III-3-2 Formules

Roberts a établi qu'à la fin de la première semaine de vie les nouveau-nés nourris par formule ne présentent pas de prévalence de telle ou telle bactérie, même si *Bifidobacterium* est isolé chez 60% de ces enfants (Roberts *et al*, 1992).

Benno (Benno *et al*, 1984), Stark (Stark & Lee, 1982) et Finegold (Finegold *et al*, 1983), dans trois études distinctes, montrent que l'incidence de *Clostridium difficile* est plus haute chez les nouveau-nés nourris par formule (50% des espèces totales versus 20% pour le lait maternel).

Harmsen a analysé par biologie moléculaire la microflore intestinale de 12 nouveau-nés à terme âgés de 1 à 20 jours; 6 étant nourris au sein, les 6 autres par formule (Harmsen *et al*, 2000). Chez les enfants nourris au lait maternel, le pourcentage moyen de bifidobactéries était inférieur à 40% à la naissance, les *Bacteroides* étaient compris entre 0 et 80% et *Escherichia coli* entre 0 et 30%. Dès le quatrième jour de vie, la flore de tous les enfants nourris au sein

était dominée par les bifidobactéries qui représentaient entre 60 et 91% de la flore. Les autres genres bactériens occupaient une position sous-dominante dans le même temps. Chez les enfants nourris par formule, la composition initiale était comparable à celle des enfants nourris au lait maternel. En revanche l'évolution était différente. Chez certains enfants (3/6) les bifidobactéries ne devenaient pas dominantes. Elles représentaient entre 28 et 75% avec une moyenne d'environ 50%. Chez un des enfants, les bifidobactéries n'étaient pas détectables. Chez la majorité des enfants, le taux de *Bacteroides* diminuait à partir du quatrième jour mais augmentait à nouveau vers le vingtième jour atteignant un niveau compris entre 35 et 61%.

En résumé, il ressort que :

- les nouveau-nés nourris par lait maternel présentent une dominance de *Bifidibacterium* dans la première semaine de vie
- les nouveau-nés nourris par formules ne présentent pas de prédominance bactérienne.

III-4 Environnement , hygiène

Les nouveau-nés hospitalisés sont soumis à des bactéries provenant de l'environnement qui vont pouvoir s'implanter beaucoup plus facilement que chez l'adulte car ils ne possèdent pas encore de flore de barrière protectrice, et ce, malgré toutes les précautions d'hygiène prises.

Dans l'étude allemande d' Andreas Schwiertz citée plus haut (**Schwiertz et al, 2003**) :

- les profils des prématurés obtenus par électrophorèse en gradient de concentration dénaturant présentent un indice de similarité croissant avec le temps; ceci pose le problème de la transmission inter-individuelle dans les hôpitaux. A l'inverse les nouveau-nés à terme nourris au sein à domicile présentent un indice de similarité bas.

Cette étude fait ressortir que la notion de colonisation initiale du tube digestif est très dépendante de l'environnement.

III-5 Antibiotiques

Les antibiotiques ne sont pas indissociables de facteurs tels que la prématurité, la césarienne. Leurs conséquences sur la flore du nouveau-né se traduisent à différents niveaux.

Adleberth constate un effet principal : la suppression de toute bactérie anaérobie, sauf *Clostridium*.

La deuxième conséquence étant l'augmentation des taux de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas* et la diminution des taux d'*Escherichia coli* (**Adleberth, 1999**).

Une autre étude (**Bennet et al, 1986**) a comparé deux groupes d'enfants âgés de 2 semaines : l'un traité par antibiotiques l'autre pas; il ressort que :

parmi les enfants non traités, 90% ont une flore anaérobie

parmi les enfants traités : 5-25% ont une flore anaérobie (et à 1 mois de vie ce pourcentage ne monte qu'à 57%). Cette étude souligne l'effet suppresseur des antibiotiques sur la flore anaérobie essentiellement.

En résumé, les conséquences des antibiotiques :

- sur la flore anaérobie : diminution voire disparition de celle-ci
- sur la flore aérobie : émergence de bactéries plus résistantes au détriment des phénotypes sauvages.

En émettant la réserve toutefois que ces antibiotiques sont administrés dans un contexte particulier souvent (prématurité notamment) donc associés à d'autres facteurs.

III-6 Autres facteurs

III-6-1 Immunité d'origine maternelle

Le lait maternel apporte au nouveau-né une immunité passive : des IgA polymériques et des macrophages.

III-6-2 Terrain génétique

Ce facteur a été étudié dans deux études récentes (2001) : l'une chez la souris, l'autre chez l'Homme.

Dans l'étude réalisée chez l'Homme, Zoetendal a analysé la flore digestive par biologie moléculaire (électrophorèse en gradient de concentration dénaturant ou DGGE) de jumeaux homozygotes et l'a comparée à celle de deux individus non apparentés et à celle d'un mari et de sa femme (**Zoetendal et al, 2001**). Il ressort que l'indice de similarité des profils DGGE de jumeaux homozygotes est significativement plus élevé (2,73) que celui de deux individus non apparentés ou d'un homme et de sa femme (1,03), ces deux derniers étant similaires. Selon ces données le génotype de l'homme serait déterminant dans la composition bactérienne de la flore digestive.

MATERIEL ET METHODE

I- Population étudiée

Cette étude s'est déroulée sur le site de l'Hôpital de la Mère et de l'Enfant à Nantes, conjointement entre les services de Réanimation pédiatrique, Néonatalogie, chirurgie infantile, le laboratoire de bactériologie et l'équipe EA3826 de la faculté de Médecine de Nantes.

11 nouveau-nés répondant aux critères d'inclusion ci-dessous ont été recrutés.

I-1 Critères d'inclusion

I-1-1 Age lors des prélèvements

Les nouveau-nés inclus dans cette étude devaient être âgés de 0 à 30 jours lors des prélèvements.

I-1-2 Indications de la chirurgie digestive

Les nouveau-nés inclus devaient présenter une indication de chirurgie digestive avec ouverture du tube digestif.

Les indications de chirurgies digestives étant les suivantes :

- atrésie intestinale
- entérocolite ulcéro-nécrosante
- volvulus primitif du grêle
- malformation anorectale
- perforation intestinale.

I-1-3 Consentement signé des parents

Le consentement signé des parents autorisant le prélèvement durant la chirurgie digestive ainsi que les prélèvements de selles ultérieurs a été obtenu pour tous les nouveau-nés entrant dans cette étude.

I-2 Prélèvements biologiques

I-2-1 Nature

I-2-1-1 Prélèvement per opératoire

Il s'agit d'un prélèvement digestif réalisé au bloc lors de l'intervention chirurgicale.

I-2-1-2 Prélèvement de selles

Zéro à trois prélèvements de selles ont été analysés pour chaque nouveau-né.

I-2-2 Contenant et acheminement

Les prélèvements ont été recueillis dans des pots stériles et sur des écouvillons stériles.

Pour l'étude anaérobie, les prélèvements ont été recueillis dans des flacons Portagerm* permettant de conserver l'anaérobiose jusqu'au traitement des échantillons.

Il s'agit d'un milieu contenu dans un flacon fermé hermétiquement sous vide. Le milieu est une gélose tamponnée contenant des substances réductrices.

Un indicateur d'oxydo-réduction (résazurine) permet de visualiser la présence ou l'absence d'oxygène. En présence d'oxygène celui-ci change de couleur.

Les prélèvements sont rapidement acheminés au laboratoire de bactériologie en moins d'une heure puis sont ensuite mis en culture immédiatement pour une partie, l'autre partie étant congelée à -80°C pour l'analyse parallèle en biologie moléculaire.

II-Culture

Un examen direct est réalisé sur les prélèvements après coloration de Gram.

II-1 Ensemencement

II-1-1 Dilutions

Pour chaque prélèvement, que ce soit un prélèvement per-opératoire ou un prélèvement de selles, trois dilutions sont effectuées en eau stérile.

La dilution au $1/10^{\text{ème}}$ est réalisée en déchargeant un écouvillon contenant 1 g de prélèvement dans un tube contenant 10 mL d'eau stérile. Puis les dilutions au $1/1000^{\text{ème}}$ et au $1/100\ 000^{\text{ème}}$ sont réalisées.

II-1-2 Milieux ensemencés

Des milieux aérobies et anaérobies ont été ensemencés pour chaque prélèvement

En aérobiose :

⇒ **Milieu non sélectif au bromocrésol pourpre (BCP)**

Le milieu au bromocrésol pourpre est un milieu non sélectif; de nombreuses espèces de bactéries à gram positif et à gram négatif n'appartenant pas forcément à la famille des Entérobactéries peuvent s'y développer. Ces milieux permettent seulement de différencier les espèces qui fermentent le lactose de celles qui ne le fermentent pas (annexe 1).

⇒ **Milieu sélectif constitué de gélose au sang, d'acide nalidixique et de colimycine (CNA)**

Le milieu sélectif CNA est une gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton. Elle contient un mélange de peptones particulièrement adaptées à la culture de bactéries exigeantes. La présence de sang de mouton permet l'expression de l'hémolyse, critère d'orientation dans l'identification bactérienne. L'acide nalidixique et la colimycine présents dans la composition de cette gélose permettent d'inhiber la croissance de la plupart des bactéries à Gram négatif ainsi que les *Bacillus* (annexe 1).

⇒ **Milieu Chapman**

Le milieu Chapman, milieu sélectif, est une gélose contenant une forte teneur en chlorure de sodium (75g/L de NaCl), un substrat particulier : le mannitol et un indicateur coloré.

La teneur élevée en NaCl du milieu limite le développement de certains autres germes que *Staphylococcus*. Le mannitol permet d'identifier *Staphylococcus aureus*, qui fermente le mannitol et donne ainsi des colonies jaunes par virage de l'indicateur coloré (annexe 1).

En anaérobiose :

⇒ **Milieu Schaedler (SCS)**

La gélose schaedler + 5% de sang de mouton est un milieu d'isolement destiné plus particulièrement à la recherche des bactéries anaérobies strictes. Elle est composée de facteurs de croissance tels que l'extrait de levure, l'hémine et la vitamine K3 et du sang de mouton; ceux-ci permettant la croissance des espèces les plus exigeantes.

La présence d'un réducteur (L-Cystine) et de glucose à forte concentration favorisent le développement des espèces anaérobies (annexe 1).

⇒ **Milieu Schaedler Néomycine-Vancomycine (SNVS)**

Il s'agit d'un milieu d'isolement sélectif destiné à la recherche des bactéries anaérobies appartenant aux genres *Bacteroides* et *Prevotella*. De la même façon que pour le milieu précédent, la présence de facteurs de croissance tels que l'extrait de levure, l'hémine, la vitamine K3 et le sang de mouton permettent la croissance des bactéries les plus exigeantes.

La présence d'un réducteur (L-Cystine) et de glucose à forte concentration favorisent le développement des espèces anaérobies.

La présence d'antibiotiques (Néomycine, Vancomycine) inhibe la plupart des bactéries à Gram positif ainsi que certaines autres bactéries à Gram négatif aérobies (annexe 1).

II-1-3 Mode d'ensemencement

Les trois dilutions réalisées ont été ensemencées à l'aide d'un ensementeur à spiral (Interscience) qui dépose de façon centripète 50 µL sur les différentes géloses.

II-2 Incubation

Les milieux de culture ont été incubés à l'étuve (37°C) en atmosphère aérobie et enrichie en CO₂ pour faciliter la culture des bactéries aéro-anaérobies facultatives.

Les milieux Schaedler avec ou sans antibiotique ont été incubés en anaérobiose.

L'anaérobiose est générée grâce à des sachets générateurs de gaz placés à l'intérieur de poches refermables à usage unique.

Le sachet générateur de gaz comprend du carbonate inorganique, du charbon actif, de l'acide ascorbique et de l'eau.

Au contact de l'air, une activation se produit; les milieux de culture sont placés dans la poche avec le sachet réactif, la poche étant fermée hermétiquement. Le sachet réactif diminue rapidement la concentration en oxygène dans la poche. Le carbonate inorganique produit du dioxyde de carbone en même temps.

L'atmosphère anaérobie est générée en 2,5 heures avec une teneur en dioxyde de carbone égale ou supérieure à 10% en 24 heures.

La bandelette témoin indicatrice d'anaérobiose placée avec les milieux de culture, initialement bleue, apparaît blanche (réduction) dans ces conditions anaérobies.

II-3 Lecture des cultures

Les cultures aérobies sont lues à 24 heures et 48 heures.

Les cultures anaérobies sont lues à 48 heures puis 5 jours puis 10 jours.

II-3-1 Analyse quantitative

Une numération totale est réalisée sur la dilution la plus appropriée; le chiffre final tenant compte, bien sûr, de cette dilution. La dilution la plus appropriée étant celle à laquelle les colonies sont suffisamment séparées les unes des autres et en nombre raisonnable pour permettre une numération. Les colonies sont également dénombrées par type de colonie.

II-3-2 Analyse qualitative

Chaque type de colonie différent est réisolé sur une nouvelle gélose.

Le réisolement permet de s'assurer de la pureté de la souche avant de l'identifier et ainsi éviter des problèmes d'identification. Il permet également de vérifier le caractère anaérobie d'une colonie par réisolement en parallèle en conditions aérobies et en conditions anaérobies.

II-4 Identification

Toutes les bactéries aérobies ont été identifiées par le système Vitek 2. Concernant les bactéries anaérobies, une galerie biochimique type API 20A étaitensemencée en première intention.

II-4-1 Vitek 2

Inoculum :

Un inoculum de 0,6 Mc Farland est réalisé dans un tube d'eau physiologique. Il sert à la réalisation de l'identification et de l'antibiogramme.

Appareillage :

Les cartes d'identification contenant les différents tests biochimiques sont reliées au tube contenant l'inoculum bactérien calibré par l'intermédiaire d'une petite paille. Puis l'ensemble est inséré dans l'automate Vitek 2 (annexe 2).

Principe :

La lecture des tests biochimiques se fait en fluorescence.

Les fluorophores utilisés étant selon les cas :

-le 4-Méthyl Umbelliferone (4MU)

-le 7 Amino-méthyl-coumarine (7AMC)

Les paramètres étudiés par ces cartes d'identification sont les suivants :

-l'activité enzymatique : si celle-ci est présente il y a hydrolyse du substrat et libération du fluorophore donc augmentation de la fluorescence :

-Osidase : le 4MU lié au sucre à tester est libéré si l'enzyme produit par la bactérie est capable de couper les liens qui les unissent, l'hydrolyse du substrat libère l'oxygène, l'électron libre va alors émettre de la fluorescence.

-Arylamidase : la 7AMC est liée aux acides aminés par une liaison peptidique, l'hydrolyse du substrat libère la 7AMC qui est naturellement fluorescente quelque soit le pH.

-la fermentation des hydrates de carbone : elle se traduit si elle est présente par une production d'acide dans le milieu. Pour détecter cette acidité ou cette absence d'acidité du milieu, le principe est le suivant :

Le fluorophore utilisé est le 4MU , celui-ci excité à l'aide d'une lampe flash à 360 nm est capable d'émettre un signal à 440 nm. Le taux de lumière émise étant directement proportionnel à la croissance ou à l'activité de la bactérie. En effet, excité par la lampe flash, l'électron mobile se déplace de liaison en liaison vers l'hydroxyde . Si O⁻ est libre l'électron réintègre sa position initiale et émet de la lumière.

Ainsi, dans un environnement alcalin, OH⁻ de la base et H⁺ vont se combiner et laisser un O⁻ libre : ceci aura pour conséquence l'émission de fluorescence.

A l'inverse , dans un environnement acide, le lien entre O et H se renforce: la conséquence est une diminution de la fluorescence car l'électron ne se délocalise pas.

Interprétation :

⇒ Premier niveau d'interprétation :

Au cours de la lecture des cartes inoculées l'instrument fournit des valeurs brutes qui sont transformées en profil biochimique à l'aide du premier niveau d'interprétation de l'automate.

Ces valeurs sont donc interprétées par l'automate en + / - / ? si le résultat du test considéré est douteux. La fonction de ce premier niveau d'interprétation est donc de transformer un ensemble de mesures cinétiques en réponses qualitatives (+ / - / ?), et ce, pour chaque test.

Pour cela, toutes les 15 minutes, une nouvelle valeur est obtenue pour chaque test biochimique.

A chaque point de lecture une pente est calculée. Pour chaque test une valeur seuil de pente détermine si le résultat est +, - ou douteux (?) si le résultat se trouve dans la zone d'incertitude. Un temps maximum d'interprétation est défini pour chaque test :

-90-180 minutes pour l'identification d'un bacille à Gram négatif

-120 minutes pour l'identification d'un cocci à Gram positif.

⇒ **Deuxième niveau d'interprétation**

Alors que dans le premier niveau d'interprétation de l'algorithme, la pente de chaque cupule est calculée, puis la valeur comparée à une valeur seuil pour déterminer la positivité, la négativité ou le caractère douteux du test; dans le deuxième niveau de l'algorithme, les résultats provenant du premier niveau sont combinés pour produire une interprétation finale.

Trois étapes interviennent dans ce deuxième algorithme :

- l'étape de comparaison :

Les résultats des tests de la souche inconnue sont comparés aux typicités des tests pour chacun des taxons inclus dans la base de données.

En cas de résultat typique, la valeur 1 est attribuée

En cas de résultat douteux la valeur 1 est également attribuée car ce test ne permet pas de distinguer deux espèces

En cas de résultats atypique, une valeur entre 0 et 1 est attribuée.

- l'étape d'agrégation :

Un nombre d'agrégation est calculé pour chaque taxon que le système peut identifier.

Ce nombre quantifie la distance entre le taxon inconnu et le taxon répertorié dans la base de données.

Un calcul mathématique utilisant le logarithme du nombre d'agrégation et le seuil de décision donne l'index de typicité du taxon.

- l'étape de décision :

Un seuil de décision est fixé pour chaque type de carte. Tous les taxons présentant un indice de typicité supérieur à un seuil donné seront considérés comme identification potentiellement correcte.

Si un seul taxon est retenu il correspond à l'identification finale.

Si aucun taxon n'est retenu le résultat sera « germe non identifié ».

Si plusieurs taxons sont retenus, le seuil de tolérance est appliqué : cela signifie que seul le taxon dont la typicité est plus élevée que le seuil de tolérance sera retenu pour l'identification finale.

Si deux ou trois taxons sont retenus après l'application du seuil de tolérance, ceux-ci sont rendus avec leur indice de typicité respectif.

Si plus de trois taxons sont retenus aucun résultat n'est rendu.

II-4-2 Galeries biochimiques (API 20A)

Elles ont été utilisées pour l'identification des bactéries anaérobies.

Inoculum :

L'inoculum doit être de 3 Mc Farland (10^9 bact/mL). Les colonies sont prélevées à l'écouvillon et dispersées dans une solution de Medium.

Principe :

La galerie api 20 A comporte 20 cupules contenant des substrats déshydratés. Ces cupules sontensemencées à partir de l'inoculum.

Après l'incubation (48 heures), les réactions produites ou pas se traduisent par le virage d'indicateur coloré ou l'absence de virage si la réaction est négative.

L'interprétation globale se fait grâce au logiciel d'identification qui établit le profil numérique de la bactérie et le compare à une base de données.

II-5 Antibiogrammes

II-5-1 Vitek 2

Principe :

La carte antibiogramme comportant les différents antibiotiques à tester estensemencée par l'automate à partir de l'inoculum ayant servi à l'identification.

La lecture se fait en transmission à 660 nm. L'analyse du taux de croissance est réalisée toutes les 15 minutes en cinétique. Trois lectures par cupule sont faites en 16 points différents.

Pour chaque antibiotique un algorithme spécifique convertit les valeurs brutes (RTU : Raw Transmission Unit) en CMI calculées.

Plusieurs contrôles permettent de s'assurer du bon remplissage des cupules, de l'absence de bulle d'air. Une cupule de contrôle présente sur chaque carte permet d'assurer que la carte a étéensemencée. Elle permet également à l'automate de déterminer la durée d'incubation

nécessaire selon qu'il s'agit d'un germe à croissance rapide ou lente. Le but étant de détecter la résistance aux antibiotiques dans le temps le plus approprié.

Interprétation :

Quatre paramètres permettent d'analyser le profil de croissance de la bactérie considérée en présence de l'antibiotique :

- Les RTU sont converties en pourcentage de changement de transmission de lumière ou PCTS qui mesurent l'amplitude de la croissance bactérienne.
- La valeur de la pente nous informe sur le taux de croissance
- La surface sous la courbe permet d'apprécier à la fois l'amplitude et le taux de croissance.
- Le taux de changement de la surface sous la courbe informe sur la vitesse d'évolution de cette surface.

Les résultats en CMI de la bactérie testée vis à vis de l'antibiotique testé sont interprétés en : Sensible (S), Intermédiaire (I), Résistant (R) en fonction des concentrations critiques spécifiques établies par des comités nationaux tels que le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM).

III- Approche par biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire utilisées dans l'étude de la flore digestive se sont largement développées ces dernières années. Il s'agit de techniques indépendantes de la culture, basées sur les propriétés dénaturantes de l'ADN (**Zoetendal *et al*, 2004**).

Les principales techniques utilisent les ADN ribosomiaux (ADNr 16S essentiellement) .

L'analyse comparée de séquences d'ADNr permet d'évaluer le degré de parenté entre différents micro-organismes.

Le séquençage d'ADNr permet d'aller jusqu'au diagnostic d'espèce par comparaison de la séquence donnée avec une banque de séquences d'ADNr d'espèces connues. Il existe ainsi une banque de données concernant ces séquences d'ADNr qui est disponible sur Internet, il s'agit de RDP Database.

Les méthodes électrophorétiques en conditions dénaturantes de fragments d'ADNr obtenus par PCR permettent une analyse dynamique (dans le temps ou entre sujets), sur la base de leur dénaturation que détermine leur séquence interne. Le résultat obtenu est un profil électrophorétique pour lequel chaque bande correspond en première approximation à une espèce dominante de l'écosystème. Il s'agit notamment de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE), les conditions dénaturantes étant représentées par le gradient d'urée ; ou encore l'électrophorèse en gradient de température dénaturant (TTGE).

- les techniques d'hybridation in situ (ou FISH) utilisent quant à elles des sondes d'hybridation spécifiques des principaux groupes phylogénétiques connus.

Nous avons utilisé dans notre étude la technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes dénommée TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis). Les conditions dénaturantes sont obtenues par le gradient de température.

III-1 Extraction de l'ADN

L'extraction des prélèvements per opératoires et des selles est réalisée selon une méthode voisine de Godon (**Godon *et al*, 1997**).

Dans un premier temps une lyse chimique est réalisée suivie d'une lyse mécanique.

III-1-1 Lyse chimique

A 150 mg d'échantillon contenu dans un tube on ajoute :

- 250 μ L de guanidine thiocyanate 4M-Tris-HCl pH 7,5-0,1M
- 40 μ L de N-Lauroyl sarcosine (LS) 10%
- 500 μ L de Lauroyl Sarcosine 5%-Tampon Phosphate pH 8,0-0,1M

La guanidine thiocyanate permet la dénaturation protéique. Quant au LS il facilite la désintégration des structures cellulaires.

III-1-2 Lyse mécanique

Les tubes sont ensuite placés 1 heure à 70°C sur bain sec. Un volume équivalent (soit environ 750 μ L) de billes de verre autoclavées de 0,1 mm est ajouté.

Puis une agitation est réalisée au moyen d'un amalgamateur ou « mini Bead beater 8 » à vitesse moyenne pendant 2 fois 5 minutes d'agitation. Ce traitement permet la lyse mécanique des cellules.

III-1-3 Précipitation des gros débris

15 mg de Polyvinylpyrrolidone (PVPP) sont ajoutés : ceci permet la précipitation des gros débris. Après vortex et centrifugation 3 minutes à 15000 rpm, le surnageant est récupéré.

On ajoute au culot 500 μ L de TENP préparé extemporanément (annexe 3).

Après vortex puis centrifugation (3 minutes, 15000 rpm), le surnageant est à nouveau récupéré dans le même aliquot que précédemment.

Cette opération de lavage du culot au TENP est ainsi répétée 2 fois. Après le deuxième lavage chaque surnageant est récupéré dans 2 tubes ce qui nous permet à l'issue de l'étape d'extraction de disposer d'un tube de réserve.

III-1-4 Précipitation des acides nucléiques

Dans chaque tube on ajoute 1 volume d'isopropanol pour 1 volume de surnageant soit environ 850 μ L. L'isopropanol étant sorti extemporanément du réfrigérateur.

L'isopropanol permet de précipiter les acides nucléiques. Les tubes sont mélangés délicatement par retournement : des méduses d'ADN apparaissent. Les tubes sont laissés 10 minutes à température ambiante, 15 minutes dans la glace, puis centrifugés 30 minutes à 15000 rpm. Le surnageant est rejeté et le culot conservé.

On ajoute au culot 56 μ L de tampon phosphate pH 8,0-0,1M et 6 μ L d'acétate de potassium 5M. Le culot est remis en suspension et les tubes sont laissés 1 heure 30 dans la glace.

Les tubes sont alors centrifugés 30 minutes à 15000 rpm, puis le surnageant (contenant l'ADN) récupéré dans un tube eppendorf stérile. Dans chaque tube on ajoute 10 µL de Rnase 1mg/mL. Le tout est homogénéisé par vortex. Les échantillons sont ensuite incubés 30 minutes à 37°C.

On ajoute alors 500 µL d'éthanol 100% sorti extemporanément du congélateur à -20°C et 25 µL d'acétate de sodium 3M. Les tubes sont mélangés délicatement par retournement puis incubés 15 minutes dans la glace. Ils sont ensuite centrifugés 30 minutes à 15000 rpm. Le surnageant est retiré et le culot lavé avec 200 µL d'éthanol à 70% sorti extemporanément du congélateur à -20°C. Le culot est remis en suspension par vortex, puis centrifugé 10 minutes à 15000 rpm. Le culot est ensuite séché sous hotte à flux laminaire jusqu'à disparition totale de l'éthanol, soit environ 30 minutes. Le culot est ensuite repris dans 30 µL de Tris-EDTA puis congelé à -20°C.

III-1-5 Contrôle de l'extraction

Pour vérifier que de l'ADN a bien été extrait une électrophorèse en gel d'agarose est réalisée.

Le marqueur III est utilisé comme marqueur de poids moléculaire (annexe 4).

Un gel d'agarose à 1% dans du TAE 1X (annexe 3) est réalisé. 10 µL de bromure d'éthidium sont incorporés à ce gel. Après migration, le gel est lu sous UV.

III-2 Amplification de l'ADNr 16S par PCR V6-V8

III-2-1 Choix de la séquence à amplifier

Les ADN ribosomaux comportent :

- des régions hautement conservées au cours de l'évolution et ayant permis de définir les principaux groupes phylogénétiques Bacteria, Archea et Eucarya .
- des régions variables et hyper-variables, spécifiques d'un groupe, d'un genre, d'une espèce et parfois d'une souche : la séquence V6-V8, comptant 500 paires de bases et codant pour l'ADNr 16S permet ainsi de définir l'appartenance à une espèce en se basant sur la composition relative en guanine et cytosine, communément appelé le GC% (annexe 5).

III-2-2 Choix des amorces

Le choix des deux amorces est guidé par la nature de la séquence à amplifier.

La séquence à amplifier étant la région hyper variable du gène d'ADNr 16S : région V6-V8 (annexe 5).

Les amorces choisies doivent être complémentaires des deux extrémités de cette séquence.

Les amorces que nous avons utilisées sont les suivantes :

- U968-GC (Genosys)
- L 1401 (Genosys)

Elles sont fournies sous forme lyophilisées et doivent être reconstituées avec de l'eau afin de réaliser une solution mère à 100 μ M. Des solutions filles à 0,50 μ M sont ensuite préparées à partir de la solution mère.

⇒ **U968-GC**

U968-GC est une séquence de 57 nucléotides , elle comprend le GC-clamp qui est situé à l'extrémité 5' de cette amorce. Le GC-clamp permet que l'ouverture des deux brins d'ADN se fasse toujours du même côté. Il intervient dans la reproductibilité. Il permet également de conserver les brins d'ADN partiellement double-brins.

<p>5' CGC CCG GGG CGC GGC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC 3'</p>
--

⇒ **L 1401**

L 1401 comprend 17 nucléotides .

<p>5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3'</p>

III-2-3 Préparation du mix

Un mix comprend (par échantillon) :

- 19,3 μ L d'eau stérile
- 0,25 μ L de primer U968 (50 μ M)
- 0,25 μ L de primer L 1401 (50 μ M)
- 0,25 de chaque dNTP (10 μ M) (A, T , G , C)
- 2,5 μ L de buffer 10X
- 1,5 μ L de MgCl₂ (25 mM)
- 0,2 μ L de Taq polymérase (HotStarTaq Polymérase-Qiagen)

Après vortex et centrifugation du mix , 25 μ L sont distribués dans chaque tube de PCR ainsi que 0,5 μ L d'ADN.

Le témoin positif correspond à l'ADN d'une souche pure de *Clostridium perfringens*.

Le témoin négatif est composé du mix seul.

Les tubes fermés sont centrifugés et placés dans le thermocycleur (GeneAmp® PCR System 9700)

III-2-4 Les différentes étapes de la PCR

Le cycle sélectionné sur le thermocycleur se fait en plusieurs étapes :

La Taq polymérase est tout d'abord activée en montant la température à 95°C pendant 15 minutes.

Puis une succession de 30 cycles comprenant dénaturation/hybridation/élongation est réalisée selon le schéma ci dessous :

95°C pendant 15 minutes	} 30 cycles
94°C pendant 1 minute	
56°C pendant 1 minute	
72°C pendant 1 minute 30	
72°C pendant 15 minutes	
4°C ∞	

La dénaturation thermique :

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les 2 brins d'ADN en rompant les liaisons hydrogène. L'ADN double brin est chauffé à une température élevée (**94°C pendant 1 minute**). Cette température est supérieure à la température de dénaturation de l'ADN qui passe alors sous forme simple brin dans le milieu. Ces brins serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.

L'hybridation des amorces :

Le milieu réactionnel contient 2 amorces (« Primers »), chacune complémentaire d'un des brins. Celles-ci déterminent les bornes de la séquence à amplifier. Le milieu est amené à une température inférieure à la température d'hybridation des amorces (T_m) (**56°C pendant 1 minute**). Cette température, fonction de la séquence, est en règle générale de l'ordre de 45 à 70 °C. Les amorces, en large excès s'hybrident à tout ADN simple brin comportant la séquence complémentaire.

L'élongation :

La Taq Polymérase (ADN Polymérase) allonge les amorces en y incorporant les déoxyribonucléotides complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse s'effectue dans le sens 5' => 3' à **72°C pendant 1 minute 30**, température optimale. A la fin du cycle deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.

Un nouveau cycle commence par l'étape de dénaturation suivie successivement des étapes d'hybridation et d'élongation. A chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible. Trente cycles sont nécessaires, générant en trois heures un nombre considérable de copies. L'amplification est exponentielle, ainsi une PCR de trente cycles génère théoriquement 2^{30} copies de chaque cible.

Les réactions se terminent par une période de 15 minutes à 72°C.

Enfin la température est ramenée à 4°C, température à laquelle seront conservés les produits de PCR jusqu'à utilisation.

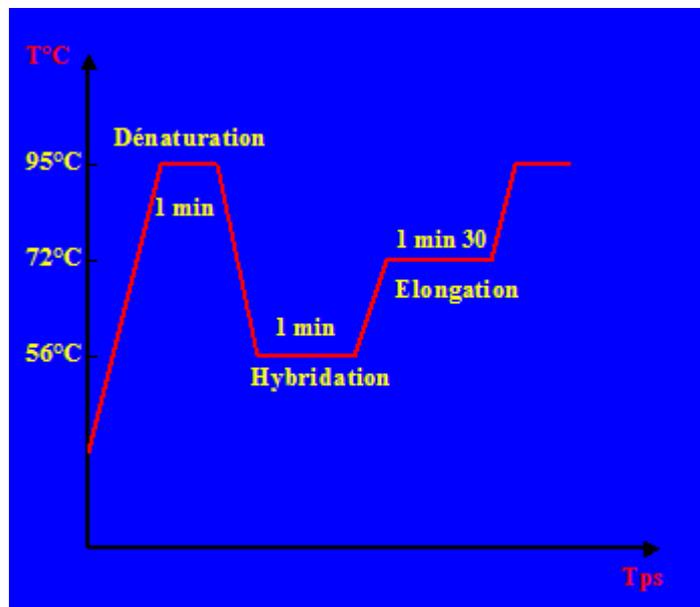


Schéma 1: Représentation du cycle de PCR utilisé

III-3 Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE)

III-3-1 Principe

Il s'agit d'une méthode d'électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide permettant, après les étapes précédemment décrites d'extraction et d'amplification, de séparer et d'analyser des fragments d'ADN ribosomaux bactériens 16S selon leur pourcentage de GC. Le gradient dénaturant est constitué par le gradient de température, celle-ci est en effet programmée pour croître régulièrement pendant l'électrophorèse. La concentration en urée par contre est constante en tout point du gel. Quand l'amplicon a atteint sa température de fusion, l'ADN s'ouvre ; en pratique, il s'arrête de migrer : ceci est visualisé par une bande sur le gel de polyacrylamide.

La température de dénaturation de l'ADN double-brins en ADN simple-brin est fonction de son pourcentage en GC (GC%). En effet, dans l'ADN, les bases guanine et cytosine sont reliées entre elles par 3 liaisons hydrogène, à la différence des bases adénine et thymine qui, elles, sont reliées par seulement 2 liaisons (Schémas 2 et 3).

Les séquences riches en guanine et en cytosine sont donc plus stables et par conséquent plus résistantes à la dénaturation ; c'est pourquoi elles migrent plus loin dans le gel.

Deux espèces différentes ont un GC% différent et par conséquent leur température de fusion (T_m) c'est à dire de désappariement des 2 brins d'ADN est différente.

Le GC% n'est pas caractéristique d'espèce, c'est la séquence des bases qui est caractéristique d'espèce.

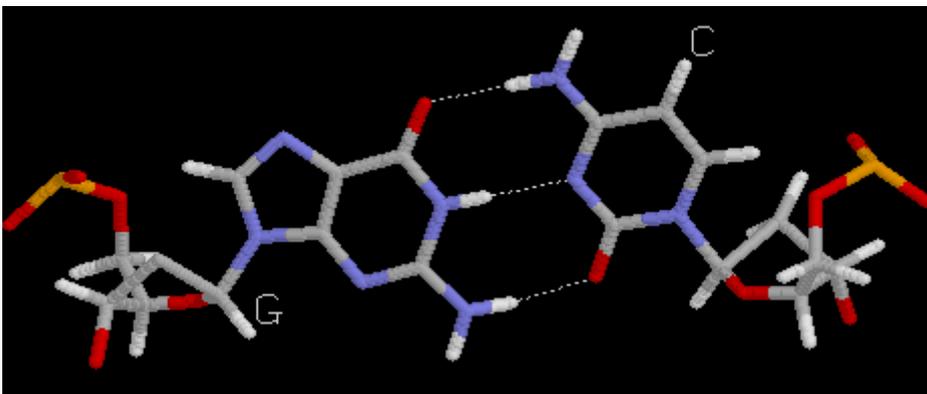


Schéma 2 : Représentation des liaisons hydrogène entre les bases G et C

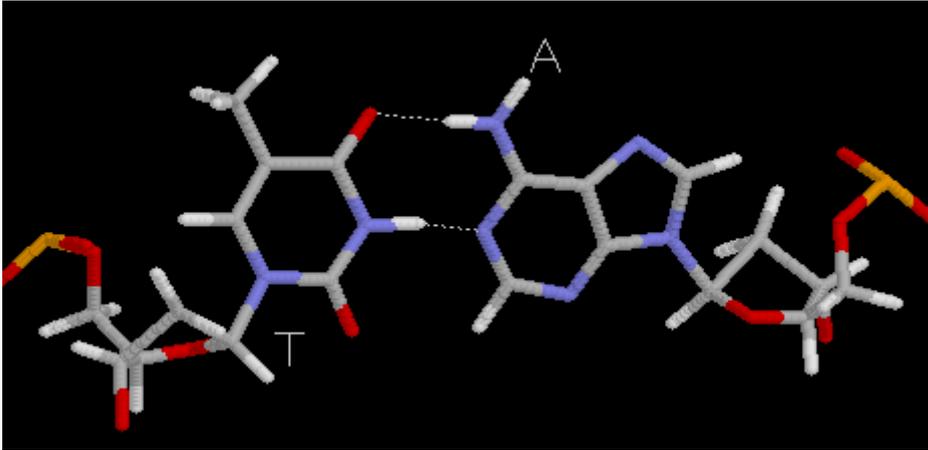


Schéma 3 : Représentation des liaisons hydrogène entre les bases A et T

Une représentation schématique de la technique de TTGE est proposée ci-dessous :

Dans cet exemple, l'ADN identifié par la couleur rouge présente un faible GC% : rapidement dénaturé, il a peu migré. A l'inverse, l'ADN identifié par la couleur verte a migré plus loin : il présente un GC% supérieur.

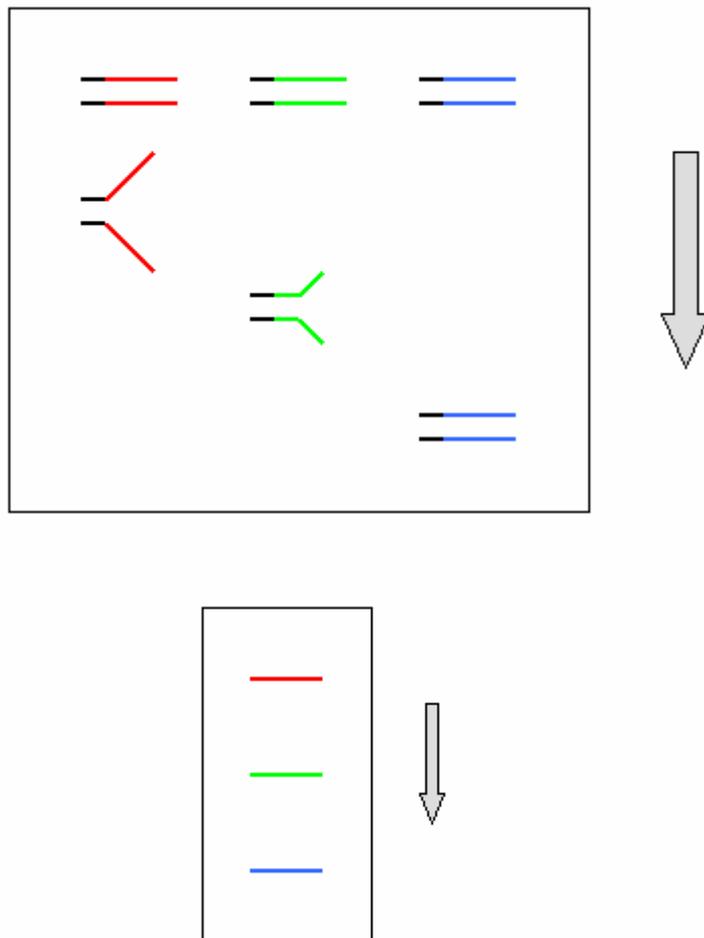


Schéma 4 : Représentation de la technique de TTGE

Le seuil de sensibilité de cette technique est de 10^6 bactéries /g d'échantillon. Elle permet donc de visualiser la flore dominante. Elle permet la mise en évidence de bactéries dites non cultivables.

III-3-2 Mode opératoire

Appareillage TTGE :

L'appareillage de TTGE (Dcode Universal Mutation Detection System-Biorad) comprend :

- la cuve contenant le tampon de migration, et le module de contrôle, placé sur la cuve et comprenant un système de chauffage, un agitateur, une sonde thermique et une pompe assurant une bonne circulation de l'eau.
- un support vertical permettant de fixer les plaques de verre enserrant les gels.
- un appareil assurant un voltage donné (annexe 6).

Préparation du gel :

12,6 g d'urée est dissout à chaud dans 14,5 mL d'eau distillée. Après refroidissement complet les éléments suivants sont ajoutés :

- 6 mL d'acrylamide bis acrylamide 40%
- 0,75 mL de TAE 50X
- 27,5 μ L de TEMED (agent polymérisant)
- 225 μ L d'ammonium persulfate 10%

Après homogénéisation du mélange le gel est immédiatement coulé entre les deux plaques de verre placées verticalement puis les peignes sont positionnés.

Après une heure de polymérisation à température ambiante, le gel est placé à 4°C pendant une nuit.

Préparation des échantillons :

A 8 μ L de chaque échantillon (= produit de PCR), on ajoute 8 μ L de tampon de charge TTGE (annexe 3).

Préparation des échelles internes :

Une échelle interne est utilisée, elle servira par la suite pour normaliser les gels. Elle est composée de 7 espèces bactériennes :

Enterobacter cloacae, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus gasseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bifidobacterium longum*.

Tampon de migration :

Le tampon de migration est constitué de TAE 1,25X préparé à partir du TAE 50X (annexe 3).

Programmation du gradient de température :

La cuve de TTGE remplie du tampon de migration est d'abord mise à chauffer 1 heure à 66°C. Puis après le dépôt des échantillons et une pré-incubation 2 minutes à 20V, la programmation du gradient de température est réalisée de la façon suivante :

Température initiale : 66°C

Voltage : 65V

Gain de température par heure : 0,2°C

Temps d'incubation : 969 min

Température finale : 70,5°C

Coloration du gel :

A l'issue de l'électrophorèse, le gel est placé dans un bain de SYBR green (SYBR Green dilué au 1/10000^{ème} dans du TAE 1,25X) pendant 3 minutes, sous agitation lente et à l'abri de la lumière.

Le principe est le suivant :

le SYBR green est un fluorophore, c'est un agent intercalant qui peut s'insérer dans la chaîne d'ADN uniquement si elle se trouve sous forme double brin. En solution, le SYBR green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (annexe 7).

Lecture du gel :

Elle se fait sur table à UV en utilisant le logiciel Quantity One de Gel Doc 2000 (Biorad).

III-4 Séquençage :

III-4-1 Excision des bandes de TTGE

Après lecture du gel de TTGE, certaines bandes sont excisées à l'aide d'une pince et sous UV. Elles sont placées dans de l'eau stérile 48 h à 4°C. Une PCR V6-V8 est ensuite réalisée sur chaque bande puis révélée sur gel d'agarose à 1,5%. Une nouvelle TTGE est réalisée sur le produit de PCR de chaque bande excisée avant de réaliser le séquençage.

III-4-2 Principe du séquençage

Le séquençage d'un ADN est la détermination de la succession des nucléotides le composant. La technique de séquençage nécessite l'ADN à séquencer, une ADN polymérase, une amorce, des désoxyribonucléotides (dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate), et des nucléotides légèrement différents : les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH bien précis, la conséquence est la suivante : lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête...

Les techniques de séquençage se basent sur ces connaissances. On procède de la façon suivante : une ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN à séquencer à partir d'une amorce. Dans le milieu de réaction se trouvent des dNTP en grand nombre, et une faible proportion d'un ddNTP (à Adénine, ou Guanine, ou Thymine, ou Cytosine). A un moment totalement aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne en cours de synthèse par l'ADN polymérase. Cette synthèse s'arrêtera donc à cet endroit. Par exemple, si le milieu réactionnel contient une faible proportion de didésoxyribonucléotide à Guanine (ddGTP), on obtiendra à la fin des réactions un ensemble de brins d'ADN de tailles variées, selon l'endroit où un ddGTP se sera inséré et que la réaction aura ainsi été stoppée (ce qui correspond, du fait de la complémentarité des bases, à la présence d'une Cytosine dans le brin d'ADN séquencé). On répète la même opération avec un milieu contenant du ddATP, un milieu contenant du ddCTP, et un milieu contenant du ddTTP.

Le séquençage est réalisé sur des séquenceurs automatiques capables de réaliser les réactions de séquence, puis de les lire : pour cela, les fragments d'ADN sont marqués grâce à des

marqueurs fluorescents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en fait en terme de nucléotides.

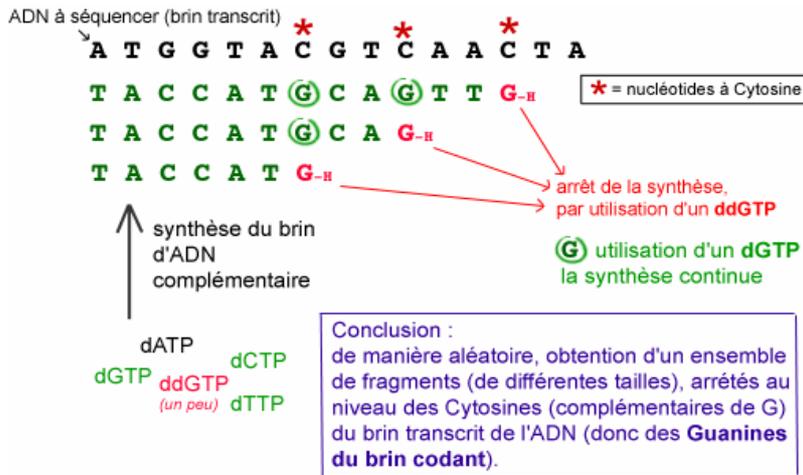


Schéma 5 : Principe du séquençage

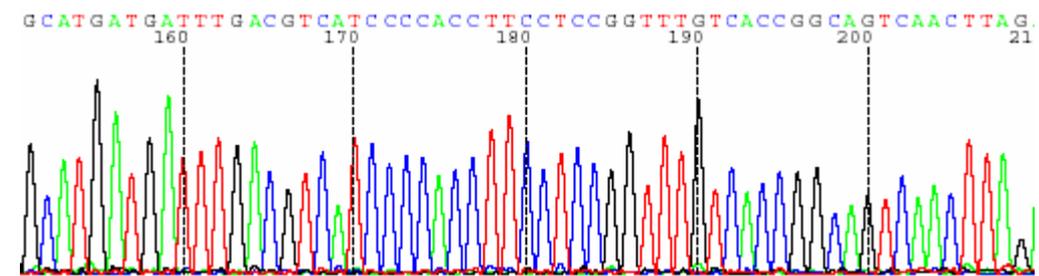


Schéma 6 : Représentation brute du résultat du séquençage

En résumé, le schéma général d'analyse est le suivant :

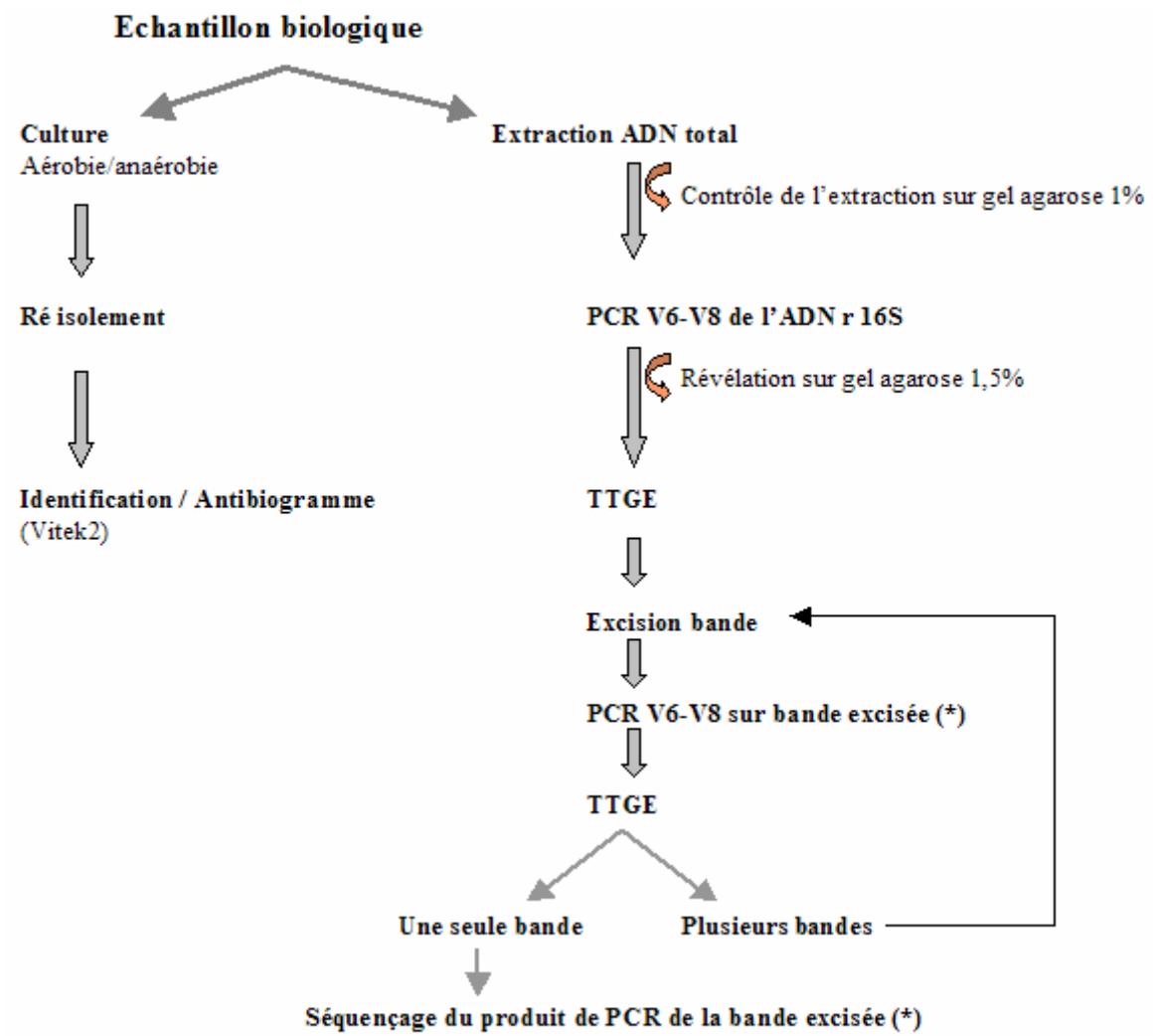


Schéma 7 : schéma général d'analyse des échantillons

RESULTATS

I-Nouveau-nés inclus

Les prélèvements provenant des nouveau-nés inclus dans ce protocole ont été identifiés de la façon suivante :

Les 3 premières lettres du nom – les 2 premières lettres du prénom puis la nature du prélèvement :

- PO pour per opératoire
- S1 pour selles n°1
- S2 pour selles n°2
- S3 pour selles n°3

I-1 Age lors des prélèvements

L'âge des nouveau-nés lors des différents prélèvements, qu'il s'agisse de prélèvements per opératoires ou de prélèvements de selles est indiqué dans le tableau ci dessous.

Identification des NNés	Date lors du prélèvement exprimée en jour (J)			
	chirurgie	Selles 1	Selles 2	Selles 3
BLO-KI	21	24		
PIC-NO	0	20		
BEN-CL	23			
LEC-LE	27	30		
GUE-NA	1	2	8	17
PAI-MA	13	24	28	30
HER-TH	5	10	16	23
TRI-GE	21			
PAS-DY	2	12		
POT-CH	0			
BEN-SO	1	7	14	21

J0 : Jour de la naissance

Tableau 1 : Age des nouveau-nés inclus lors des prélèvements per opératoires et de selles

I-2 Indications de la chirurgie digestive

La répartition des indications de chirurgie digestive parmi les nouveau-nés recrutés est présentée dans le tableau suivant :

Indication de la chirurgie digestive	nouveau-nés
Atrésie duodénale	PIC-NO POT-CH
Atrésie jéjunale	BEN-SO
Perforation colique	BLO-KI PAI-MA
Perforation iléale	HER-TH
Volvulus du grêle	TRI-GE
Volvulus sur entérocolite	PAS-DY
Imperforation anale	GUE-NA
Entérocolite ulcéronécrosante	LEC-LE
Peritonite	BEN-CL

Tableau 2 : Indications de la chirurgie digestive des nouveau-nés inclus

I-3 Autres caractéristiques de la population étudiée

I-3-1 Terme de naissance

Sur les 11 nouveau-nés recrutés, 9 sont prématurés.

Identification des NNés	BLO-KI	PIC-NO	BEN-CL	LEC-LE	GUE-NA	PAI-MA	HER-TH	TRI-GE	PAS-DY	POT-CH	BEN-SO
Terme de naissance (SA)	26	33	39	27	39	32	32	33	34	34	36

Tableau 3 : Terme de naissance des nouveau-nés inclus

	A terme
	Prématuré

I-3-2 Poids de naissance

Le poids à la naissance allait de 0,845 kg à 3,270 kg.

Noms des NNés	BLO-KI	PIC-NO	BEN-CL	LEC-LE	GUE-NA	PAI-MA	HER-TH	TRI-GE	PAS-DY	POT-CH	BEN-SO
Poids de naissance (kg)	0,845	1,690	2,830	0,900	3,210	1,585	1,170	1,470	2,400	2,100	3,270

Tableau 4 : Poids de naissance des nouveau-nés inclus

I-3-3 Mode de naissance

8 nouveau-nés sur les 11 sont nés par voie basse, 2 par césarienne et pour l'un des enfants, né dans un hôpital périphérique, le mode de naissance n'est pas connu.

Noms des NNés	BLO-KI	PIC-NO	BEN-CL	LEC-LE	GUE-NA	PAI-MA	HER-TH	TRI-GE	PAS-DY	POT-CH	BEN-SO
Mode de naissance	VB	VB	NR	VB	VB	VB	C	C	VB	VB	VB

VB : voie basse C : césarienne NR : Non renseigné

Tableau 5 : Mode de naissance des nouveau-nés inclus

Le tableau ci-dessous récapitule les caractéristiques des nouveau-nés inclus :

Nom	Terme de naissance (SA)	Poids de naissance (kg)	Mode de naissance	Indication de la chirurgie digestive
BLO-KI	26	0,845	VB	Perforation colique
PIC-NO	33	1,690	VB	Atrésie duodénale
BEN-CL	39	2,830	NR	Péritonite
LEC-LE	27	0,900	VB	Entérocolite ulcéronécrosante
GUE-NA	39	3,210	VB	Imperforation anale
PAI-MA	32	1,585	VB	Perforation colique
HER-TH	32	1,170	C	Perforation iléale
TRI-GE	33	1,470	C	Volvulus du grêle
PAS-DY	34	2,400	VB	Volvulus sur entérocolite
POT-CH	34	2,100	VB	Atrésie duodénale
BEN-SO	36	3,270	VB	Atrésie jéjunale

VB : voie basse C : Césarienne

Tableau 6 : Récapitulatif des caractéristiques des nouveau-nés inclus

I-3-4 Antibiotiques

Le nombre de jours d'antibiotiques reçus sur la période allant de J0 à Jx (Jx étant l'âge de l'enfant lors du dernier prélèvement) est indiquée pour chaque enfant dans le tableau ci-dessous; de même que l'administration ou non d'une antibioprofylaxie chez la mère lors de la naissance.

Nb de Jours d'antibiotiques de J0 à Jx :

	Age du NNé lors des différents prélèvements	Antibiothérapie Administrée au NNé pendant la période allant de J0 à Jx (nb de jours)	Antibioprofylaxie Administrée à la mère
PIC-NO	J0 à J20	3	OUI
LEC-LE	J 27 à J30	28	OUI
GUE-NA	J1 à J17	13	NON
BLO-KI	J21 à J24	4	NON
BEN-CL	J23	1	NR
PAI-MA	J13 à J30	22	NON
HER-TH	J5 à J23	11	OUI
TRI-GE	J21	14	OUI
PAS-DY	J2 à J12	4	NON
POT-CH	J0	1	NON
BEN-SO	J1 à J21	1	NR

J0 : J de la naissance Jx : J du dernier prélèvement NR : Non renseigné

Tableau 7 : Nombre de jours d'antibiotiques reçus par les nouveau-nés sur la période étudiée

Nb de J d'antibiotiques jusqu'au prélèvement per opératoire :

	Age du NNé lors du prélèvement per opératoire	Antibiothérapie Administrée au NNé jusqu'au prélèvement per opératoire (nb de jours)
PIC-NO	J0	1
LEC-LE	J 27	19
GUE-NA	J1	1
BLO-KI	J21	> 2
BEN-CL	J23	1
PAI-MA	J13	5
HER-TH	J5	3
TRI-GE	J21	14
PAS-DY	J2	2
POT-CH	J0	1
BEN-SO	J1	1

Tableau 8 : Nombre de jours d'antibiotiques jusqu'au prélèvement per opératoire

I-3-5 Mode de nutrition

Pendant la période étudiée :

- tous les nouveau-nés ont reçu une alimentation parentérale.
- 5 des 11 nouveau-nés ont également reçu du lait maternel.

	Nutrition Parentérale	Lait maternel
PIC-NO	OUI	OUI (dès J15)
LEC-LE	OUI	OUI (dès J30)
GUE-NA	OUI	NON
BLO-KI	OUI	NON
BEN-CL	OUI	NR
PAI-MA	OUI	OUI (dès J0)
HER-TH	OUI	OUI (J1 à J2 et J12 à J23)
TRI-GE	OUI	NON
PAS-DY	OUI	NON
POT-CH	OUI	NON
BEN-SO	OUI	OUI (dès J18)

NR : non renseigné

Tableau 9 : Mode de nutrition des nouveau-nés inclus

II-Culture

II-1 Prélèvements per opératoires

Les résultats concernant l'identification des bactéries ayant poussé en culture sont représentés dans les tableaux ci-dessous.

La bactérie prédominante apparaît en gras.

NOM	J du prélèvement per op	Localisation du prélèvement per opératoire	Microorganismes isolés		
PIC-NO	0	Duodénum	<i>0</i>		
POT-CH	0	Duodénum	<i>0</i>		
GUE-NA	1	Côlon	<i>0</i>		
BEN-SO	1	Jéjunum	<i>S. warneri</i>	<i>E. coli</i>	
PAS-DY	2	Intestin grêle	<i>0</i>		
HER-TH	5	Iléon	<i>P.aeruginosa</i>		
PAI-MA	13	Côlon	<i>B. distasonis</i>		
TRI-GE	21	Intestin grêle	<i>M.morganii</i>		
BLO-KI	21	Colon	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	
BEN-CL	23	Intestin grêle	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
LEC-LE	27	Intestin grêle	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>	

Tableau 10 : Résultats des cultures des prélèvements per opératoires

- Parmi les prélèvements réalisés entre **J0 et J2** inclus, soit 5 prélèvements : 4 sont stériles.
- La présence d'anaérobies n'est retrouvée que dans un seul prélèvement.
- Dans 3 prélèvements les bactéries identifiées sont les staphylocoques en prédominance.

Le tableau ci-dessous permet de mettre en évidence la **chronologie** d'apparition des différentes espèces bactériennes dans ces prélèvements per opératoires.

Espèce bactérienne	Nombre de prélèvements positifs en l'espèce considérée	Age des nouveau-nés lors des prélèvements							
		0	1	2	5	13	21	23	27
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2						1		1
<i>Staphylococcus capitis</i>	1						1		
<i>Staphylococcus warneri</i>	2		1						1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1							1	
<i>Enterococcus faecium</i>	1							1	
<i>Morganella morganii</i>	1						1		
<i>Enterobacter cloacae</i>	1							1	
<i>Escherichia coli</i>	1		1						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1				1				
<i>Bacteroides distasonis</i>	1					1			

Tableau 11 : Résultats des cultures des prélèvements per opératoires présentés de façon chronologique

II-2 Prélèvements de selles

L'étude de la composition de la flore fécale nous donne des informations sur la flore colique. Dans le tableau ci-dessous sont colligées les bactéries retrouvées :

NOM	J des selles	Microorganismes isolés			
GUE-NA	2	0			
BEN-SO	7	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. cloacae</i>		
GUE-NA	8	<i>S. epidermidis</i>	levure		
HER-TH	10	<i>S. epidermidis</i>	levure		
PAS-DY	12	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>		
BEN-SO	14	<i>E. coli</i>			
HER-TH	16	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. haemolyticus</i>	levure	
GUE-NA	17	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	levure	
PIC-NO	20	<i>P. mirabilis</i>			
BEN-SO	21	<i>S. lugdunensis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
HER-TH	23	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. haemolyticus</i>	levure	<i>S. epidermidis</i>
PAI-MA	24	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecalis</i>		
BLO-KI	24	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>	
PAI-MA	28	<i>S. haemolyticus</i>	<i>E. faecalis</i>		
PAI-MA	30	<i>E. faecalis</i>			
LEC-LE	30	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>		

Tableau 12 : Résultats des cultures des prélèvements de selles

- On dispose d'une seule selle entre **J0 et J2** : elle est stérile (méconium).
- De **J0 à J19** : 75% des prélèvements renferment des staphylocoques à coagulase négative.
- De **J20 à J30** : 87,5% des prélèvements renferment des staphylocoques à coagulase négative sauf dans un cas où il est associé à *Staphylococcus aureus*.
- De **J0 à J30** , l'espèce de staphylocoque la plus représentée est *Staphylococcus epidermidis* qui représente 47% des staphylocoques identifiés. Il est suivi par *Staphylococcus haemolyticus* qui représente plus de 29% des staphylococques identifiés.
- De **J0 à J30** :

87,5%	des prélèvements sont positifs à cocci à Gram positif
81%	des prélèvements sont positifs à staphylocoques à coagulase négative
31%	des prélèvements sont positifs à bacilles à Gram négatif

Le tableau ci-dessous permet de mettre en évidence la chronologie d'apparition des différentes espèces bactériennes dans ces prélèvements de selles.

Espèce bactérienne	Nombre de prélèvements positifs en l'espèce considérée	Age des nouveau-nés lors des prélèvements													
		2	7	8	10	12	14	16	17	20	21	23	24	28	30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8		1	1	1	1			1			1	1		1
<i>Staphylococcus capitis</i>	1												1		
<i>Staphylococcus warneri</i>	2												1		1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5					1		1				1	1	1	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1										1				
<i>Staphylococcus aureus</i>	1										1				
<i>Enterococcus faecalis</i>	4										1		1	1	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1								1						
<i>Escherichia coli</i>	3		1				1				1				
<i>Proteus mirabilis</i>	1									1					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2							1				1			

Tableau 13: Résultats des cultures des prélèvements de selles présentés de façon chronologique

II-3 Antibiogrammes

NOM : BLO-KI

Staphylococcus epidermidis (per opérateur)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	I	8
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	S	≤ 4
Tobramycine	S	2
Gentamicine	S	≤ 0,5
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	I	8
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus capitis (per opérateur et selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	2
Gentamicine	R	8
Erythromycine	S	0,5
Lincomycine	S	2
Pristinamycine	S	
Quinupristine/Dalfopristine	S	0,5
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus epidermidis (Selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	4
Ofloxacine	S	1
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	≥ 16
Gentamicine	R	≥ 16
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/ Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprime/ Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus warneri (Selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	4
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	2
Gentamicine	R	8
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/ Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprime/ Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	32

NOM : PIC-NO***Proteus mirabilis***
(Selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Ampicilline	S	≤ 2
Amox + Ac clavulanique	S	≤ 2
Ticarcilline	S	≤ 8
Ticar + Ac clavulanique	S	≤ 8
Pipera + Tazobactam	S	≤ 4
Céfalotine	S	4
Cefoxitine	S	≤ 4
Cefotaxime	S	≤ 1
Ceftazidime	S	≤ 1
Imipénème	S	1
Acide nalidixique	S	8
Norfloxacine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	S	≤ 0,25
Ciprofloxacine	S	≤ 0,25
Gentamicine	S	≤ 1
Netilmicine	S	≤ 1
Tobramycine	S	≤ 1
Amikacine	S	≤ 2
Nitrofurantoine	R	128
Triméthoprim / Sulfa	S	≤ 20

NOM : BEN-CL

Enterobacter cloacae
(per opérateur)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Ampicilline	R	≥ 32
Amox + Ac clavulanique	R	≥ 32
Ticarcilline	S	≤ 8
Ticar + Ac clavulanique	S	≤ 8
Pipera + Tazobactam	S	≤ 4
Céfalotine	R	≥ 64
Cefoxitine	R	≥ 64
Cefotaxime	S	≤ 1
Ceftazidime	S	≤ 1
Imipénème	S	≤ 0,5
Acide nalidixique	S	4
Norfloxacine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	S	≤ 0,25
Ciprofloxacine	S	≤ 0,25
Gentamicine	S	≤ 1
Netilmicine	S	≤ 1
Tobramycine	S	≤ 1
Amikacine	S	≤ 2
Nitrofurantoïne	I	64
Triméthoprim / Sulfa	S	≤ 20

Enterococcus faecalis
(per opérateur)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	I	2
Ampicilline	S	≤ 2
Ampi + Sulbactam	S	≤ 2
Imipénème	S	≤ 1
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	I	2
Ciprofloxacine	S	≤ 0,5
Levofloxacine	S	1
Moxifloxacine	S	≤ 0,25
Erythromycine	R	≥ 8
Clindamycine	R	≥ 8
Quinupristine / Dalfo	R	4
Tetracycline	R	≥ 16
Nitrofurantoïne	S	≤ 16
Triméthoprim / Sulfa	R	
Streptomycine HL	R	
Kanamycine HL	R	
Gentamicine HL	S	

Enterococcus faecium
(per opérateur)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	I	≤ 0,12
Ampicilline	S	≤ 2
Ampi + Sulbactam	S	≤ 2
Imipénème	S	≤ 1
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	I	2
Ciprofloxacine	S	≤ 0,5
Levofloxacine	S	1
Moxifloxacine	S	≤ 0,25
Erythromycine	I	4
Clindamycine	R	≥ 8
Quinupristine / Dalfo	I	1
Tetracycline	S	≤ 1
Nitrofurantoïne	I	64
Triméthoprim / Sulfa	S	≤ 10
Streptomycine HL	S	
Kanamycine HL	S	
Gentamicine HL	S	

NOM : LEC-LE

Staphylococcus warneri
(per opérateur et selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	1
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	≥ 16
Gentamicine	R	8
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,5
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	I	4
Triméthoprim/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus epidermidis
(per opérateur et selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	1
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	S	≤ 4
Tobramycine	S	≤ 1
Gentamicine	S	≤ 0,5
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprim/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

NOM : GUE-NA

Staphylococcus epidermidis
(Selles n°2)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	4
Teicoplanine	I	8
Ofloxacin	S	≤ 0,5
Kanamycine	S	≤ 4
Tobramycine	S	≤ 1
Gentamicine	S	≤ 0,5
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Enterococcus faecium
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G		
Ampicilline	R	≥ 32
Ampi + Sulbactam	R	≥ 32
Imipénème	R	≥ 16
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ciprofloxacine	S	1
Levofloxacine	I	2
Moxifloxacine	S	1
Erythromycine	R	≥ 8
Clindamycine	S	≤ 0,25
Quinupristine / Dalfo	S	0,5
Tetracycline	R	≥ 16
Nitrofurantoine	I	64
Triméthoprime / Sulfa	R	≤ 10
Streptomycine HL	R	
Kanamycine HL	R	
Gentamicine HL	S	

Staphylococcus epidermidis
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	4
Ofloxacin	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	≥ 16
Gentamicine	R	≥ 16
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	R	8
Pristinamycine	R	
Quinupristine/Dalfopristine	S	0,5
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	I	16
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprime/Sulfa	I	80
Nitrofurantoine	S	≤ 16

NOM : PAI-MA

Staphylococcus haemolyticus
(Selles n°1 et 2)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	
Oxacilline	R	
Vancomycine	S	
Teicoplanine	S	
Ofloxacine	R	
Kanamycine	R	
Tobramycine	R	
Gentamicine	R	
Erythromycine	R	
Lincomycine	S	
Pristinamycine	S	
Fosfomycine	R	
Acide fusidique	S	
Rifampicine	R	
Triméthoprim/Sulfa	R	
Nitrofurantoine	S	

Enterococcus faecalis
(Selles n°2)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G		
Ampicilline	S	≤ 2
Ampi + Sulbactam	S	≤ 2
Imipénème	S	≤ 1
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ciprofloxacine	S	≤ 0,5
Levofloxacine	S	1
Moxifloxacine	S	≤ 0,25
Erythromycine	S	0,5
Clindamycine	R	≥ 8
Quinupristine / Dalfo	I	2
Tetracycline	S	≤ 1
Nitrofurantoine	S	≤ 16
Triméthoprim / Sulfa	R	
Streptomycine HL	S	
Kanamycine HL	S	
Gentamicine HL	S	

Enterococcus faecalis
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G		
Ampicilline	S	≤ 2
Ampi + Sulbactam	S	≤ 2
Imipénème	S	≤ 1
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ciprofloxacine	S	1
Levofloxacine	S	1
Moxifloxacine	S	≤ 0,25
Erythromycine	S	0,5
Clindamycine	R	≥ 8
Quinupristine / Dalfo	R	4
Tetracycline	S	≤ 1
Nitrofurantoine	S	≤ 16
Triméthoprim / Sulfa	R	
Streptomycine HL	S	
Kanamycine HL	S	
Gentamicine HL	S	

NOM : HER-TH

Pseudomonas aeruginosa
(per opérateur et selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Ticarcilline	I	32
Ticarcilline + ac clavu	I	32
Pipéracilline	S	8
Pipéracilline+Tazobact	S	≤ 4
Ceftazidime	S	4
Céfépime	S	2
Aztréonam	I	16
Imipénème	S	≤ 1
Méropénème	S	≤ 0,25
Péfloxacin	S	0,5
Ciprofloxacine	S	≤ 0,25
Gentamicine	S	≤ 1
Tobramycine	S	≤ 1
Amikacine	S	≤ 2
Isepamicine	S	2
Minocycline	R	≥ 16
Colistine	S	2
Triméthoprime/Sulfa	R	80

Staphylococcus epidermidis
(Selles n°1)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	4
Ofloxacin	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	≥ 16
Gentamicine	R	4
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	I	1
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus haemolyticus
(Selles n°2 et 3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	4
Ofloxacin	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	≥ 16
Gentamicine	R	≥ 16
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,5
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus epidermidis
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	I	8
Ofloxacin	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	8
Gentamicine	R	8
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	I	8
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

NOM : TRI-GE***Morganella morganii***
(per opérateur)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Ampicilline	R	≥ 32
Amox + Ac clavulanique	R	≥ 32
Ticarcilline	R	≥ 128
Ticar + Ac clavulanique	R	≥ 128
Pipera + Tazobactam	R	≥ 64
Céfaloine	R	≥ 64
Cefoxitine	R	≥ 64
Cefotaxime	R	≥ 64
Ceftazidime	R	≥ 64
Imipénème	S	2
Acide nalidixique	S	≤ 2
Norfloxacine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	S	≤ 0,25
Ciprofloxacine	S	≤ 0,25
Gentamicine	S	≤ 1
Netilmicine	S	≤ 1
Tobramycine	S	≤ 1
Amikacine	S	≤ 2
Nitrofurantoine	R	128
Triméthoprim / Sulfa	R	≥ 320

NOM : PAS-DY

Staphylococcus haemolyticus
(Selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	R	≥ 8
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	≥ 16
Gentamicine	R	≥ 16
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprim/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Staphylococcus epidermidis
(Selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	2
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	8
Gentamicine	R	≥ 16
Erythromycine	R	≥ 8
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprim/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

NOM : BEN-SO

Staphylococcus warneri
(per opératoire)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	S	≤ 0,5
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	S	≤ 4
Tobramycine	S	≤ 1
Gentamicine	S	≤ 0,5
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	1
Quinupristine/Dalfopristine	S	0,5
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	R	≥ 128
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprim/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Escherichia coli
(per opératoire et selles)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Ampicilline	I	8
Amox + Ac clavulanique	S	4
Ticarcilline	S	≤ 8
Ticar + Ac clavulanique	S	≤ 8
Pipera + Tazobactam	S	≤ 4
Céfalotine	I	16
Cefoxitine	S	≤ 4
Cefotaxime	S	≤ 1
Ceftazidime	S	≤ 1
Imipénème	S	≤ 1
Acide nalidixique	S	4
Norfloxacin	S	≤ 0,5
Ofloxacin	S	≤ 0,25
Ciprofloxacine	S	≤ 0,25
Gentamicine	S	≤ 1
Netilmicine	S	≤ 1
Tobramycine	S	≤ 1
Amikacine	S	≤ 2
Nitrofurantoine	S	≤ 16
Triméthoprim / Sulfa	S	≤ 20

Staphylococcus epidermidis
(Selles n°1)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	R	≥ 8
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	I	8
Ofloxacine	S	≤ 0,5
Kanamycine	R	≥ 64
Tobramycine	R	8
Gentamicine	R	≥ 16
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	R	≥ 32
Triméthoprim/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Enterobacter cloacae
(Selles n°1)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Ampicilline	R	8
Amox + Ac clavulanique	R	16
Ticarcilline	S	≤ 8
Ticar + Ac clavulanique	S	≤ 8
Pipera + Tazobactam	S	≤ 4
Céfalotine	R	≥ 64
Cefoxitine	R	32
Cefotaxime	S	≤ 1
Ceftazidime	S	≤ 1
Imipénème	S	≤ 1
Acide nalidixique	S	4
Norfloxacin	S	≤ 0,5
Ofloxacin	S	≤ 0,25
Ciprofloxacine	S	≤ 0,25
Gentamicine	S	≤ 1
Netilmicine	S	≤ 1
Tobramycine	S	≤ 1
Amikacine	S	≤ 2
Nitrofurantoine	I	64
Triméthoprim / Sulfa	S	≤ 20

Staphylococcus aureus
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	R	≥ 0,5
Oxacilline	S	≤ 0,5
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacin	S	≤ 0,5
Kanamycine	S	≤ 4
Tobramycine	S	≤ 1
Gentamicine	S	≤ 0,5
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Enterococcus faecalis
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G		
Ampicilline	S	≤ 2
Ampi + Sulbactam	S	≤ 2
Imipénème	S	≤ 1
Vancomycine	S	2
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ciprofloxacine	S	1
Levofloxacine	S	1
Moxifloxacine	S	≤ 0,25
Erythromycine	S	1
Clindamycine	R	4
Quinupristine / Dalfo	R	4
Tetracycline	S	≤ 1
Nitrofurantoine	S	≤ 16
Triméthoprime / Sulfa	R	
Streptomycine HL	S	
Kanamycine HL	S	
Gentamicine HL	S	

Staphylococcus lugdunensis
(Selles n°3)

Antibiotique	S/I/R	CMI
Penicilline G	S	0,06
Oxacilline	S	≤ 0,5
Vancomycine	S	≤ 1
Teicoplanine	S	≤ 0,5
Ofloxacin	S	1
Kanamycine	S	≤ 4
Tobramycine	S	≤ 1
Gentamicine	S	≤ 0,5
Erythromycine	S	≤ 0,25
Lincomycine	S	≤ 1
Pristinamycine	S	≤ 0,5
Quinupristine/Dalfopristine	S	≤ 0,25
Minocycline	S	≤ 0,5
Fosfomycine	S	≤ 8
Acide fusidique	S	≤ 0,5
Rifampicine	S	≤ 0,5
Triméthoprime/Sulfa	S	≤ 10
Nitrofurantoine	S	≤ 16

Concernant les bacilles à Gram négatif, ces antibiogrammes montrent :

- *Enterobacter cloacae* de BEN-CL est de phénotype sauvage
- *Morganella morganii* de TRI-GE présente un mécanisme de résistance de type céphalosporinase de haut niveau
- *Pseudomonas aeruginosa* de HER-TH présente une résistance de type efflux.

Concernant les staphylocoques à coagulase négative :

- le profil de résistance simplifié des souches de *Staphylococcus epidermidis* rencontrées est représenté dans le tableau ci-dessous :

	Pénicilline G	Oxacilline	Gentamicine	Erythromycine	Fluoro Quinolones
BLO-KI PO	R	R	S	R	S
BLO-KI S1	R	R	R	R	S
LEC-LE PO	R	R	S	R	S
LEC-LE S1	R	R	S	R	S
GUE-NA S2	R	R	S	R	S
GUE-NA S3	R	R	R	S	S
HER-TH S1	R	R	R	S	S
HER-TH S3	R	R	R	R	S
PAS-DY S1	R	R	R	R	S
BEN-SO S1	R	R	R	S	S

Tableau 15 : profil de résistance des souches de *S. epidermidis* isolées

On constate que parmi ces souches de *staphylococcus epidermidis* :

- 100% sont méticilline-oxacilline résistants
- 60% sont résistants aux aminosides
- 70% sont résistants à l'érythromycine
- Ils sont par contre tous sensibles aux quinolones

Le profil de résistance simplifié des souches de *staphylococcus haemolyticus* isolées est représenté dans le tableau ci-dessous :

	Pénicilline G	Oxacilline	Gentamycine	Erythromycine	Fluoro Quinolones
PAI-MA S1	R	R	R	R	R
PAI-MA S2	R	R	R	R	R
HER-TH S2	R	R	R	R	S
HER-TH S3	R	R	R	R	S
PAS-DY S1	R	R	R	R	R

Tableau 16 : profil de résistance des souches de *S. haemolyticus* isolées

Les souches de *Staphylococcus haemolyticus* isolées ont un profil de résistance élevé :

Elles sont toutes : - méticilline-oxacilline résistantes,
- aminosides-résistantes
- érythromycine-résistantes

60% sont résistantes aux fluoro-quinolones.

Enfin, le profil de résistance des souches de staphylocoques à coagulase négative autres que *S. epidermidis* ou *S. haemolyticus* est représenté dans le tableau ci-dessous :

	Pénicilline G	Oxacilline	Gentamicine	Erythromycine	Fluoro Quinolones
<i>S. capitis</i> BLO-KI PO BLO-KI S1	R	R	R	S	S
<i>S. warneri</i> LEC-LE PO LEC-LE S1 BLO-KI S1	R	R	R	S	S
<i>S. warneri</i> BEN-SO PO	R	S	S	S	S
<i>S. lugdunensis</i> BEN-SO S3	S	S	S	S	S

Tableau 17 : profil de résistance des souches de staphylocoques à coagulase négative isolées autres que *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*

Plus de 89% des staphylocoques à coagulase négative isolés sont méticilline-oxacilline résistants.

III-Biologie moléculaire

III-1 Contrôle de l'extraction

Une fois les prélèvements extraits, une partie du produit d'extraction est déposé sur gel d'agarose à 1% afin de contrôler l'extraction. Un marqueur de poids moléculaire est déposé sur ce même gel.

La présence d'une bande signifie la présence d'ADN. L'absence apparente de bande au niveau de certains prélèvements ne signifie pas qu'il n'y a pas eu extraction ; en effet il s'agit là d'une étape avant amplification par PCR V6-V8.

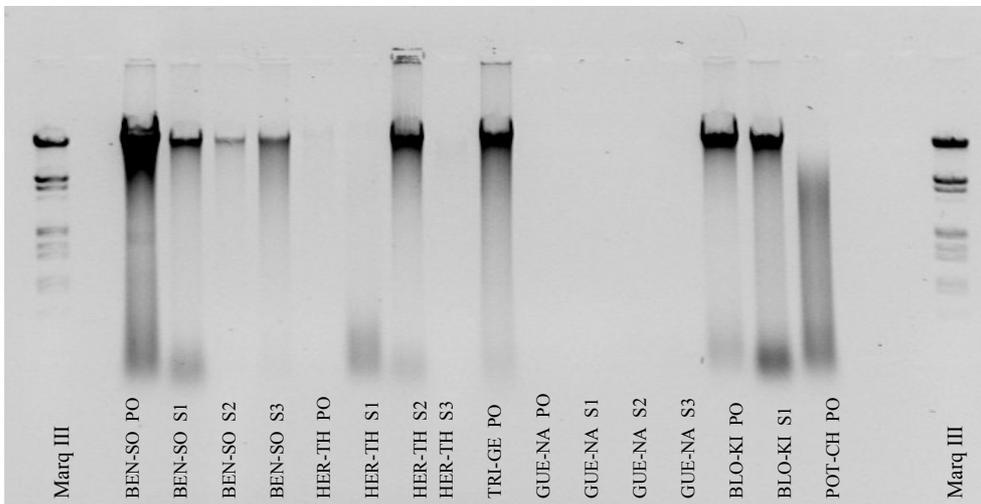


Photo 2 : Gel n°1 de contrôle d'extraction

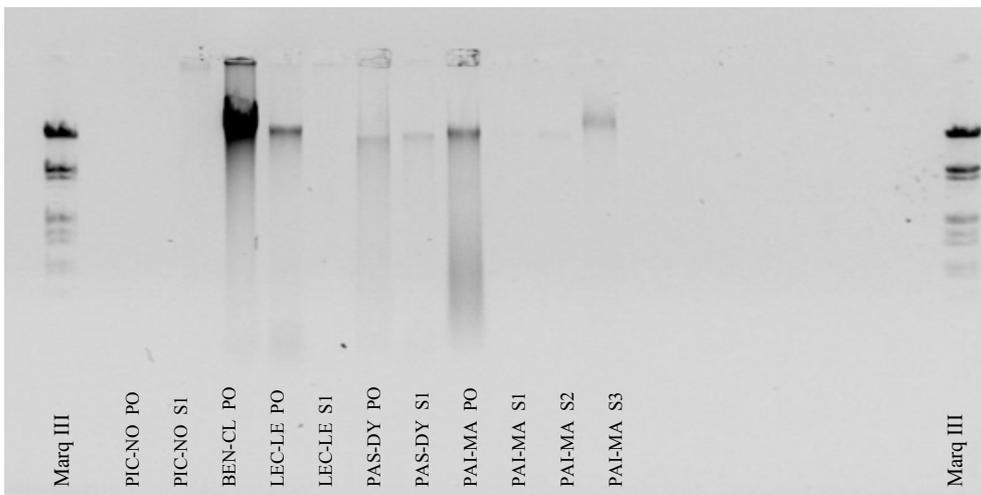


Photo 3 : Gel n°2 de contrôle d'extraction

III-2 Révélation de la PCR V6-V8

Une autre partie du produit d'extraction obtenu est amplifié par PCR V6-V8. Le produit de PCR est ensuite déposé sur gel d'agarose à 1,5% afin de contrôler cette étape. Un marqueur de poids moléculaire est déposé également : il s'agit du marqueur XIV. La séquence que nous avons cherchée à amplifier est une séquence de 500 paires de bases, le marqueur nous permet de visualiser cette séquence (indiquée par la flèche noire).

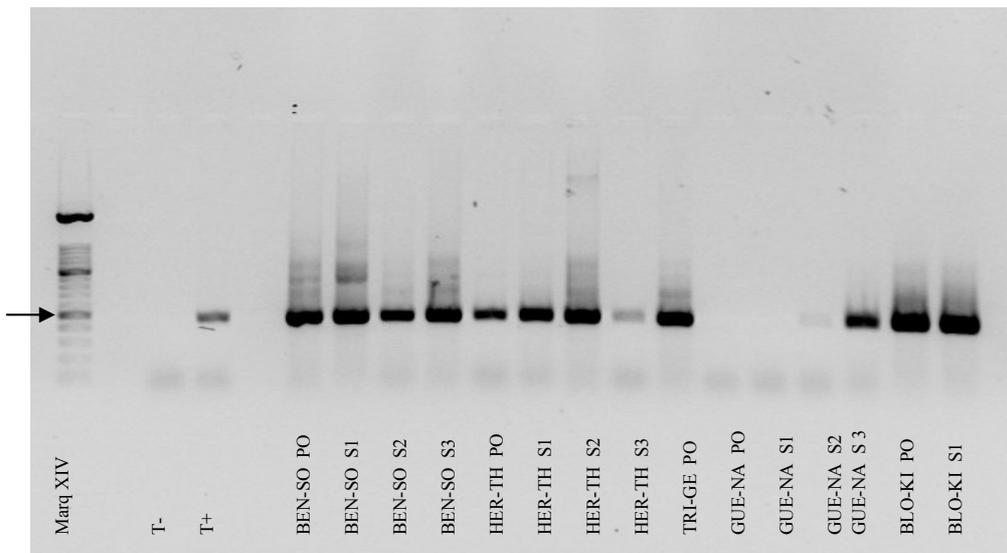


Photo 4 : Gel n°1 de contrôle de PCR V6-V8

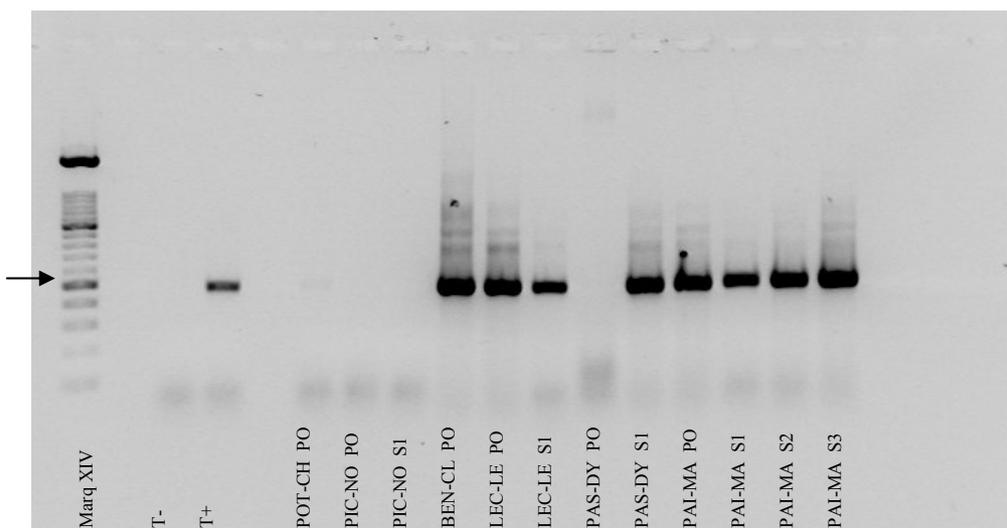


Photo 5 : Gel n°2 de contrôle de PCR V6-V8

Certains prélèvements qui semblaient négatifs après extraction ont cependant révélé, après amplification une bande au niveau de la séquence recherchée de 500 paires de bases. Il s'agit

des prélèvements identifiés : HER-TH PO / HER-TH S3 / GUE-NA S3 / LEC-LE S1 / PAI-MA S1 / PAI-MA S2.

Certains prélèvements ne présentent pas de bandes visibles à ce niveau, même après amplification ; il s'agit des prélèvements identifiés : GUE-NA PO / GUE-NA S1 / POT-CH PO / PIC-NO PO / PIC-NO S1 / PAS-DY PO.

Ces prélèvements ont malgré tout été analysés en TTGE, comme les autres.

III-3 TTGE

Tous les produits de PCR sont ensuite analysés en TTGE. Le gradient croissant de température dénature les différentes séquences selon leur pourcentage relatif en bases GC. Ainsi, les ADN double-brins pauvres en GC sont rapidement dénaturés en ADN partiellement simple-brin dont la migration est freinée : on les retrouve donc dans la partie supérieure du gel d'acrylamide. A l'inverse, les ADN double-brins riches en GC sont dénaturés plus tardivement : on les retrouve dans la partie inférieure du gel.

Les photos des différents gels de TTGE sont présentées ci-dessous :

1^{er} gel :

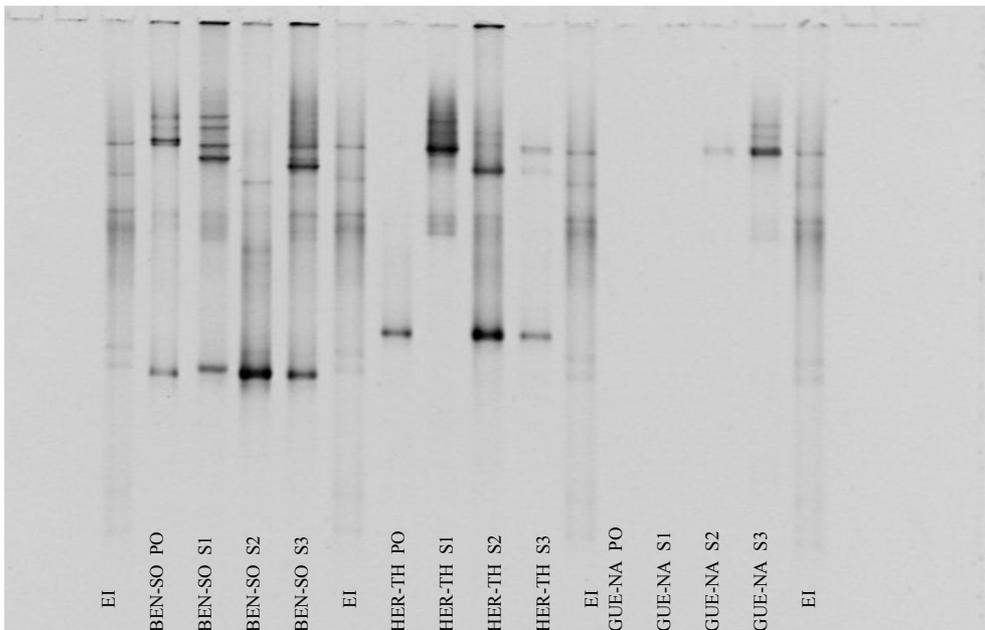


Photo 6: Gel n°1 de TTGE

2ème gel:

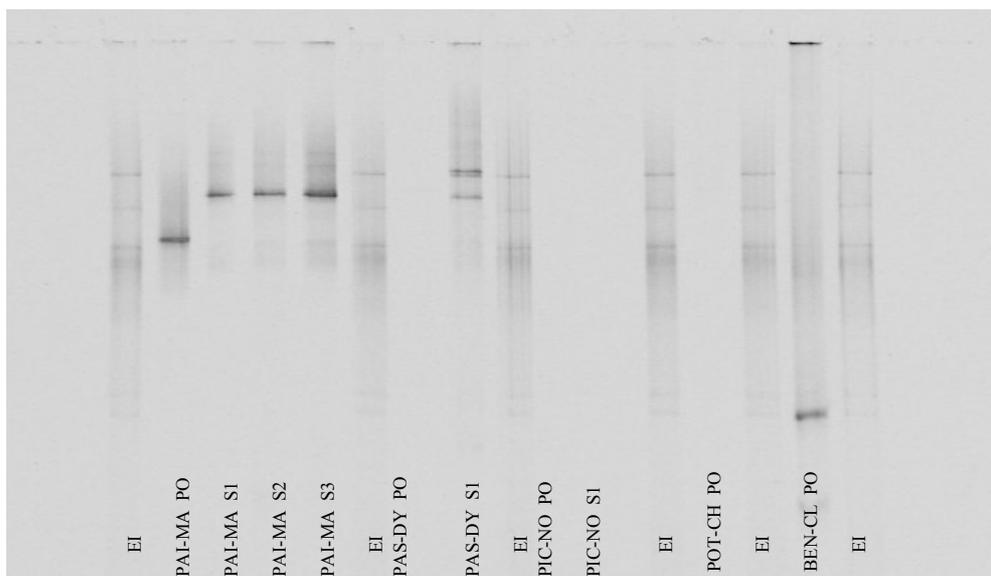


Photo 7: Gel n°2 de TTGE

3ème gel :

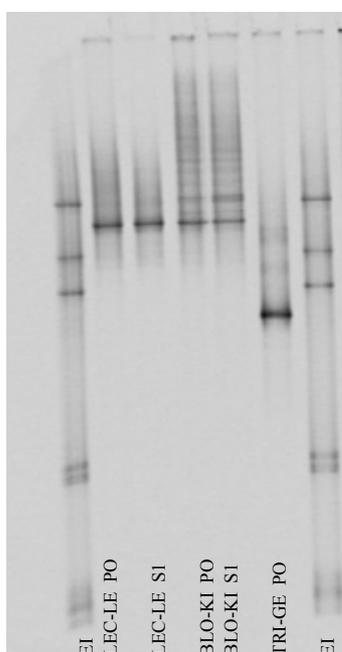


Photo 8 : Gel n°3 de TTGE

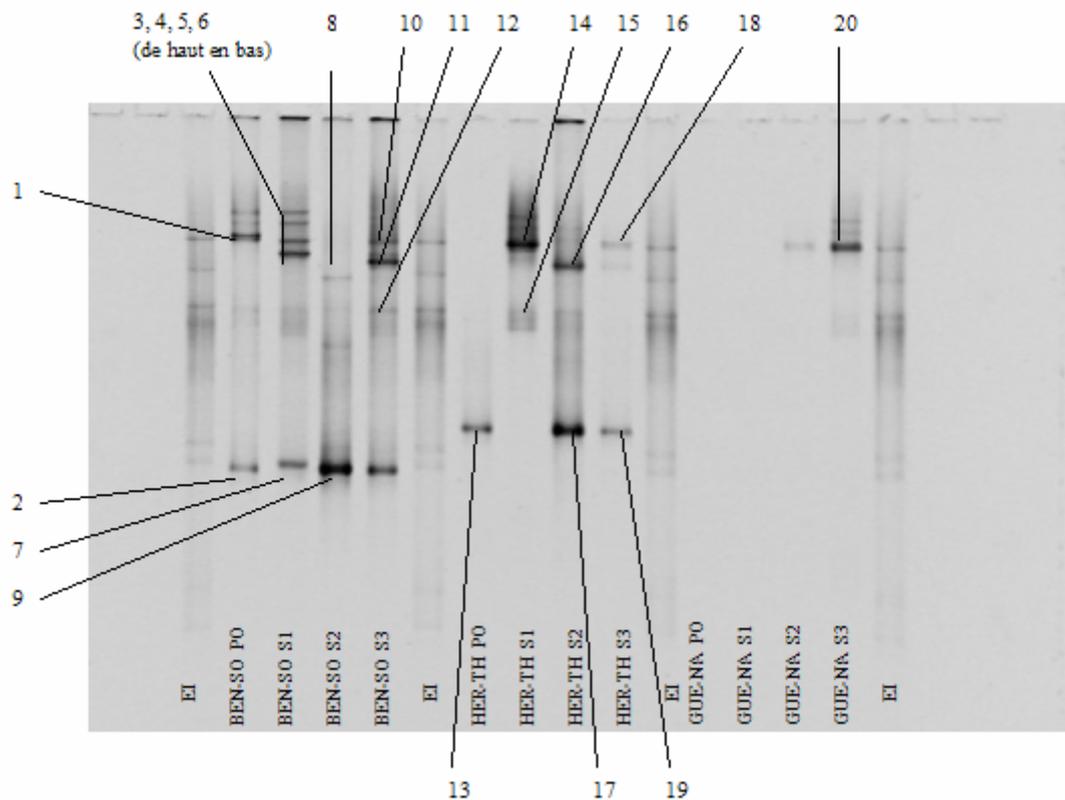
Certains prélèvements ne présentent aucune bande en TTGE, il s'agit des prélèvements identifiés : GUE-NA PO / GUE-NA S1 / PAS-DY PO / PIC-NO PO / PIC-NO S1 / POT-CH PO.

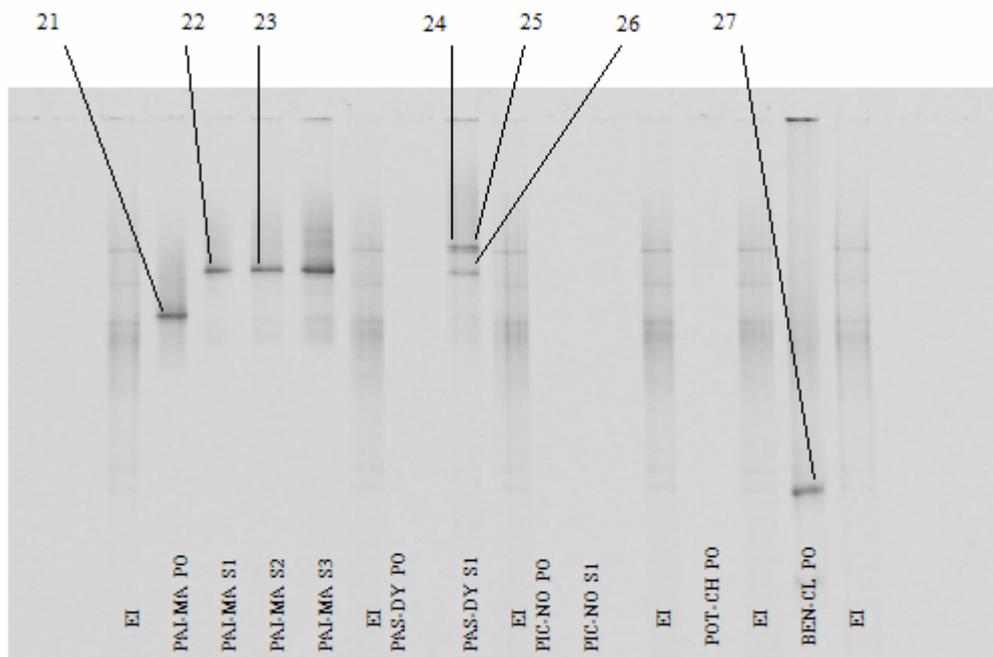
Ces prélèvements semblaient négatifs après PCR, ils ont été déposés en TTGE par précaution.

Les autres prélèvements présentent une à plusieurs bandes. Certaines d'entre-elles ont été explorées par séquençage. Le choix des bandes à séquencer a été guidé essentiellement par la nature du prélèvement : **tous** les prélèvements per-opératoires ont été séquencés ; la plupart des prélèvements de selles l'ont été également.

III-3-1 Séquençage des bandes de TTGE

Sur les trois gels de TTGE, les différentes bandes sont identifiées par un numéro de la façon suivante :





Le séquençage a été réalisé par Génome Express. Les résultats nous ont été transmis sous forme de séquence de bases et sous forme de courbe pour chaque bande. Concernant les courbes, chaque couleur représente une base :

L'adénine est représentée en vert, la thymine en rouge, la guanine en noir et la cytosine en bleu.

L'observation de la courbe nous permet de déterminer à partir de quelle base la séquence peut être lue : il ne faut pas en effet qu'il y ait de chevauchement entre les courbes.

Une fois ceci réalisé il nous reste à comparer cette séquence avec les séquences proposées sur la base de données RDP Database qui est une base de données pour l'ARN 16S.

Les résultats du séquençage des bandes de TTGE excisées provenant des prélèvements per opératoires sont représentées ci-dessous.

L'identification la plus probable selon la base de données RDP database est mentionnée.

BEN-SO PO

⇒ bande n°1

S. epidermidis (RDP database 0,931)

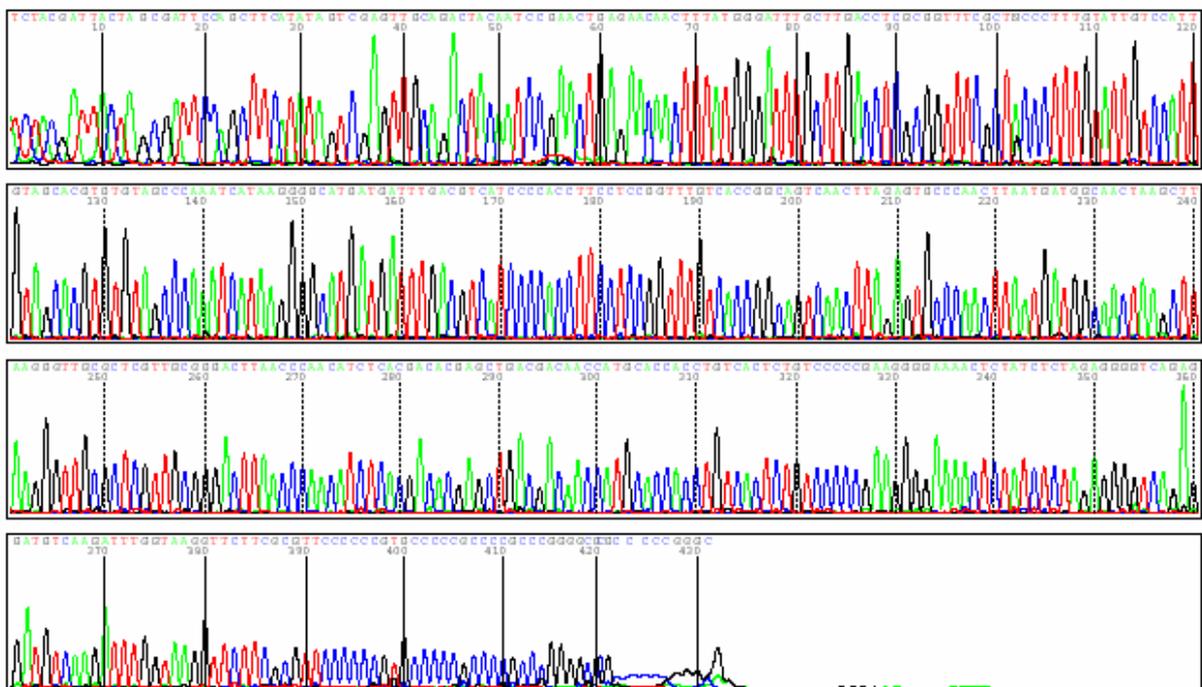


Schéma 8 : Résultat du séquençage de la bande n°1 de BEN-SO PO

⇒ bande n°2

E. coli (RDP database 0,948)

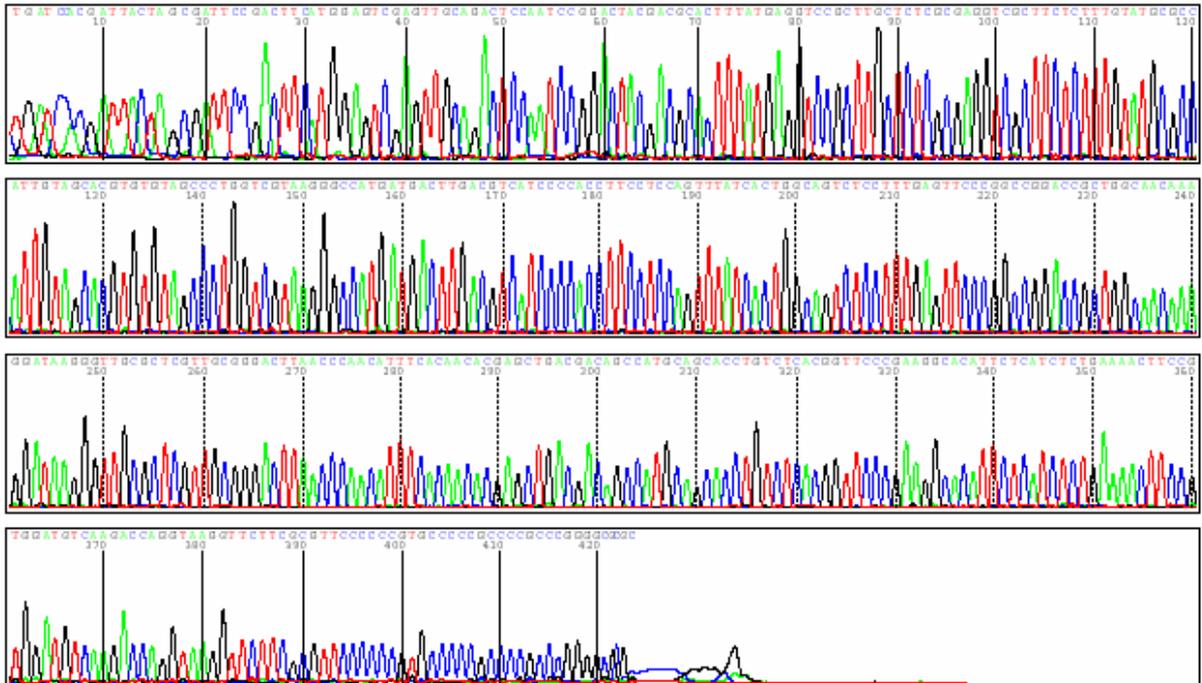


Schéma 9: Résultat du séquençage de la bande n°2 de BEN-SO PO

HER-TH PO

⇒ bande n°13

P. aeruginosa (RDP database 0,926)

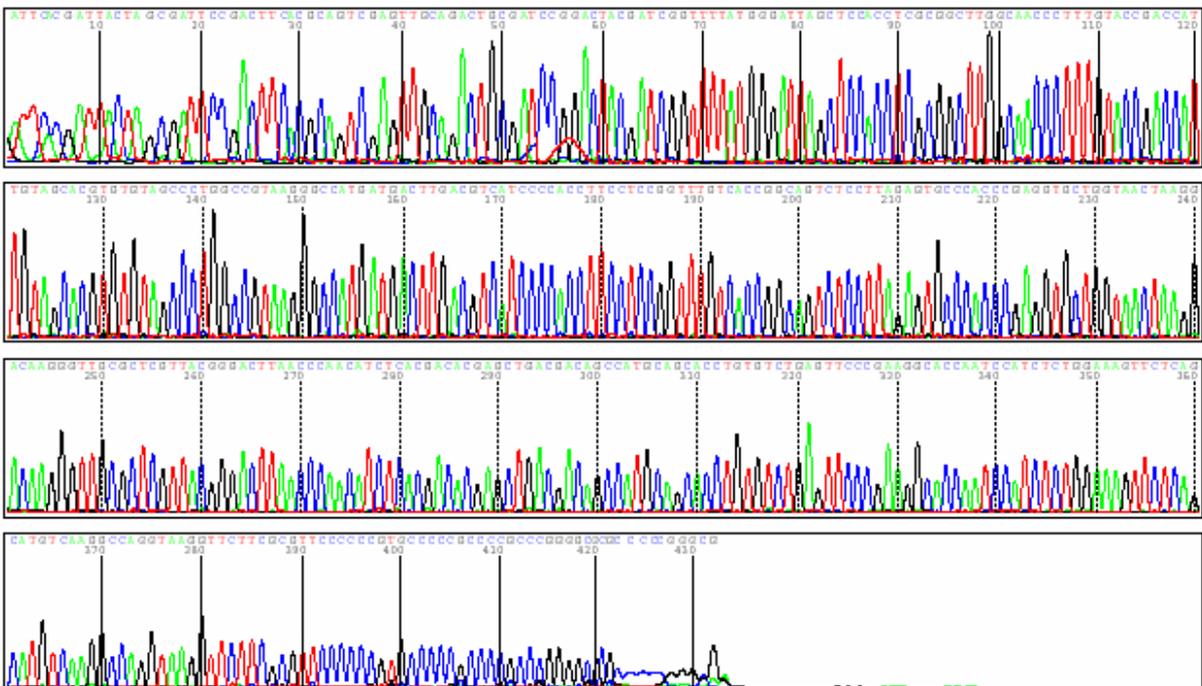


Schéma 10: Résultat du séquençage de la bande n°13 de HER-TH PO

BEN-CL PO

⇒ bande n°27

E. cloacae (RDP database 0,942)

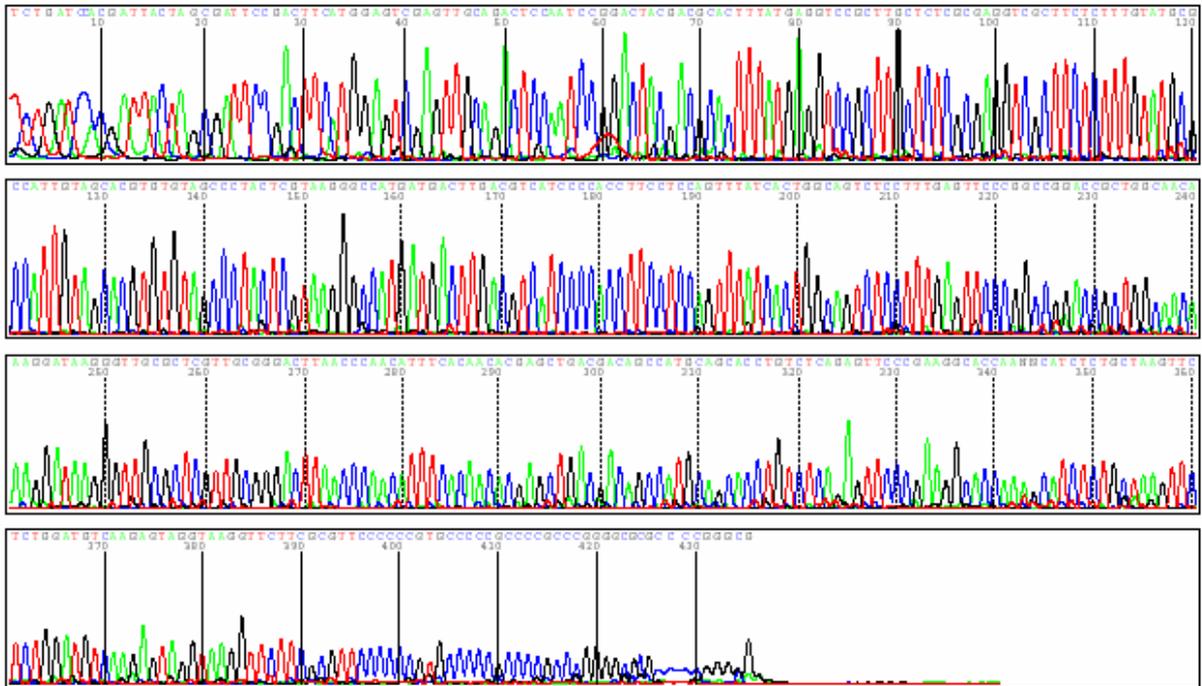


Schéma 11 : Résultat du séquençage de la bande n°27 de BEN-CL PO

LEC-LE PO

⇒ bande n°28

Staphylococcus sp (RDP database 0,916)

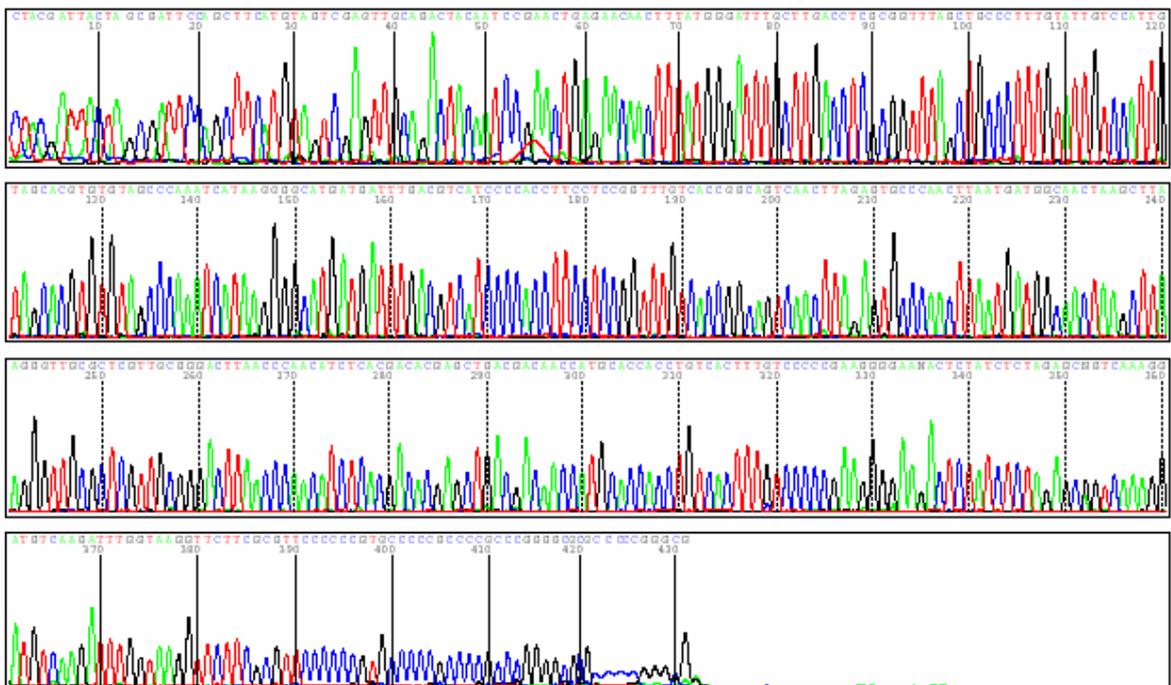


Schéma 12: Résultat du séquençage de la bande n°28 de LEC-LE PO

BLO-KI PO

⇒ bande n°29 *S. epidermidis* (RDP database 0,916) ou *S. capitis*

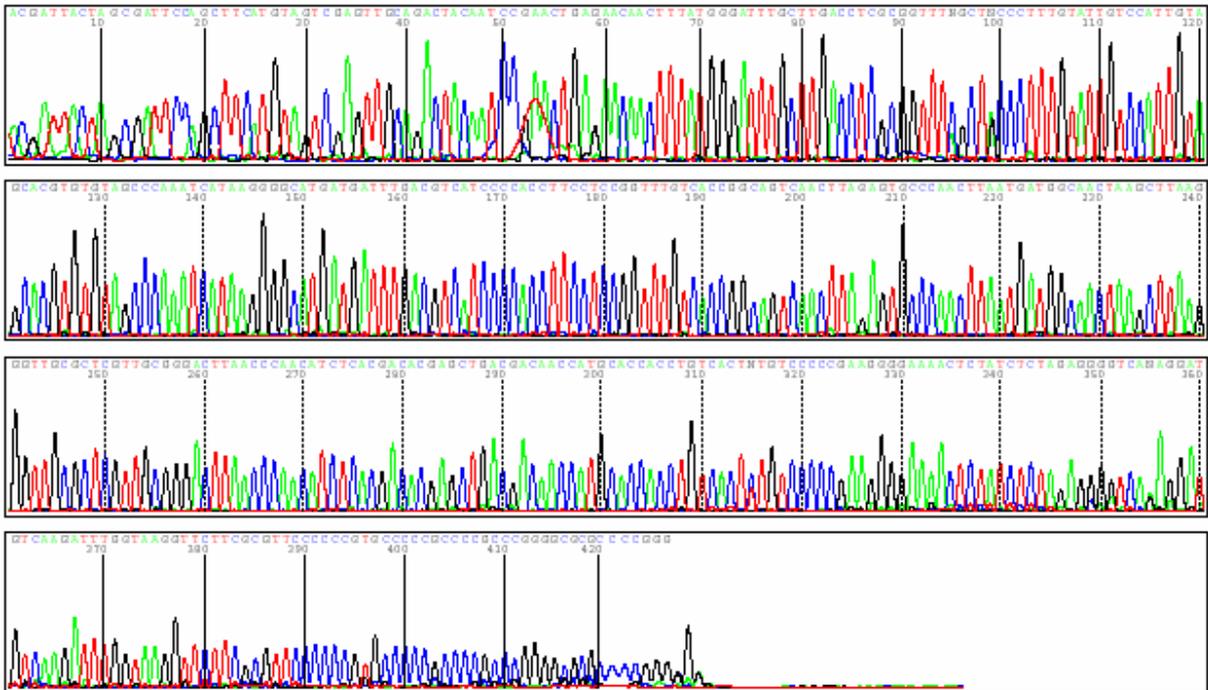


Schéma 13 : Résultat du séquençage de la bande n°29 de BLO-KI PO

TRI-GE PO

⇒ bande n°30 *Morganella morganii* (RDP database 0,915)

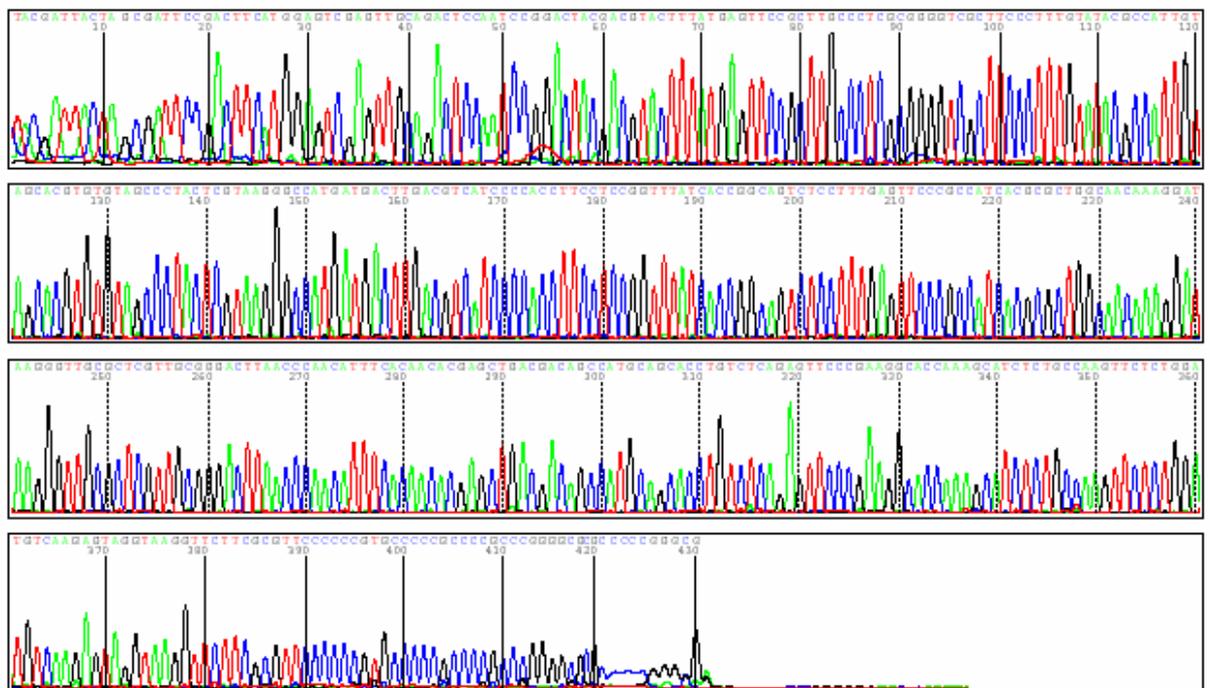


Schéma 14 : Résultat du séquençage de la bande n°30 de TRI-GE PO

PAI-MA

La bande n°21 n'a pas donné par séquençage d'identification satisfaisante.

Concernant les selles, les résultats par patient, selon cette même base de données rendent les identifications suivantes :

BEN-SO

⇒ S1 : les bandes n° 3, 4, 5, 6 indiquent qu'il s'agit d'un Staphylocoque sans pouvoir identifier l'espèce. Une sous séquence est en effet présente empêchant certainement cette identification.

La bande n°7 bien individualisée correspond à *E. cloacae*.

⇒ S2 : la bande n°8 correspond à une double séquence. L'identification n'a donc pas été possible.

La bande n°9 correspond à *E. coli*.

⇒ S3 : les bandes n°10, 11, 12 ont donné l'identification staphylocoque sans plus de précision.

HER-TH

⇒ S1 : la bande n°14 correspond à *S. epidermidis*, la bande n°15 correspond à un autre staphylocoque dont l'espèce n'a pas été identifiée.

⇒ S2 : la bande n°16 correspond à un staphylocoque; il y a présence d'une sous-séquence à ce niveau. La bande n°17 correspond à *Pseudomonas aeruginosa*.

⇒ S3 : la bande n°18 correspond à *S. epidermidis* ; la bande n°19 correspond à *P. aeruginosa*.

PAI-MA

⇒ S1 : la bande n°22 correspond à un staphylocoque d'espèce non identifiée.

PAS-DY

⇒ S1 : la bande n°24 correspond à *S. epidermidis*. Les bandes n°25 et 26 correspondent à des staphylocoques dont l'espèce n'a pas été identifiée.

III-3-2 Gel compar 2.2®

Gelcompar 2.2® (Applied Maths) est un logiciel permettant d'analyser des gels par comparaisons intra et inter-gels grâce à l'utilisation d'un même standard disposé en plusieurs pistes sur les gels à analyser.

Ce logiciel utilise l'index de similarité de Dice : Cs

$$Cs = [2j / a+b] \times 100$$

a = nombre de bandes de TTGE sur la piste 1

b = nombre de bandes de TTGE sur la piste 2

j = nombre de bandes communes

III-3-2-1 Comparaison intra-patient

Nous avons réalisé grâce à Gelcompar 2.2® une comparaison des profils de TTGE des enfants pour lesquels il existait au moins un prélèvement positif parmi les différents prélèvements réalisés (per opératoires ou selles). Il s'agit des prélèvements suivants :

BEN-SO

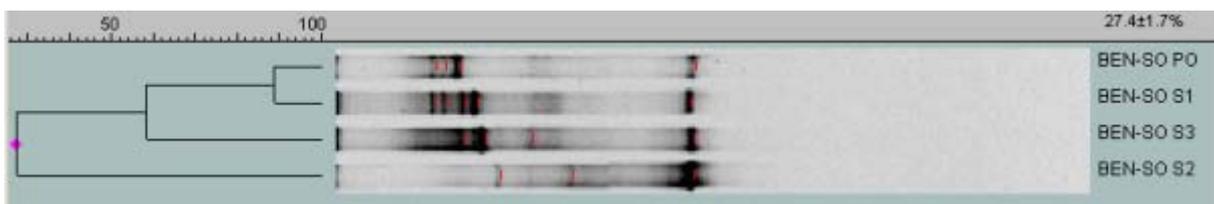


Schéma 15 : Dendrogramme BEN-SO

Cet enfant prématuré est né par voie basse. Les prélèvements per opératoire (PO) et de selles n°1 (S1) montrent presque 90% d'homologie. L'indice de similarité entre les selles n°1 (S1) et n°3 (S3) est plus grand que entre les selles n°1 et n°2.

HER-TH

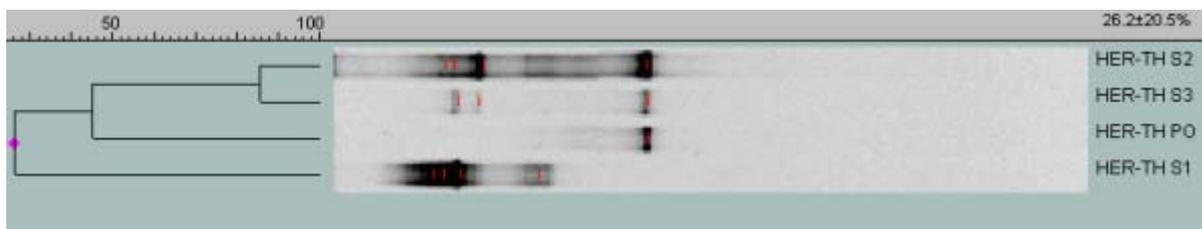


Schéma 16 : Dendrogramme HER-TH

Il s'agit d'un enfant prématuré né par césarienne. Le prélèvement per opératoire (PO) contient uniquement *P. aeruginosa*. Celui-ci est retrouvé dans les prélèvements de selles n°2 et n°3 mais pas dans le n°1. Entre les prélèvements per opératoire et de selles n°1, l'enfant a en effet reçu une antibiothérapie large spectre contenant notamment du Claventin®. Cette antibiothérapie a été arrêtée 3 jours avant le deuxième prélèvement de selles qui est à nouveau positif à *P. aeruginosa*.

GUE-NA



Schéma 17 : Dendrogramme GUE-NA

Le prélèvement per opératoire (PO) réalisé à J1 est stérile. Le prélèvement de selles réalisé à J2 (S1) l'est également. Par contre celui réalisé à J8 (S2) laisse apparaître un bande très faible qui est retrouvée dans le prélèvement suivant de façon plus nette (S3). Le séquençage de la bande majoritaire a mis en évidence *S. epidermidis*. Il s'agit d'un enfant né à terme mais sous antibiothérapie large spectre (Vancomycine, Ceftazidime, Amikacine).

PAI-MA

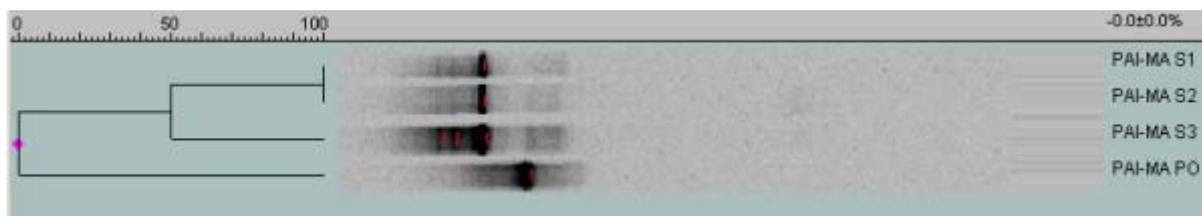


Schéma 18 : Dendrogramme PAI-MA

Cet enfant est né prématuré par voie basse. Il a reçu une antibiothérapie large spectre avant le prélèvement per opératoire et jusqu'au deuxième prélèvement de selles (S2). Le prélèvement per opératoire a mis en évidence *Bacteroides distasonis*.

BLO-KI



Schéma 19 : Dendrogramme BLO-KI

Il s'agit d'un enfant prématuré, né par voie basse. Les prélèvements per opératoire et de selles réalisés à 3 jours d'intervalle n'ont pas montré de différence de profils. La culture a mis en évidence *S. capitis* et *S. epidermidis*. Le séquençage l'a confirmé. Ces prélèvements ont été réalisés sous antibiothérapie large spectre (Vancomycine, Cefotaxime, Amikacine, Fluconazole, Métronidazole).

LEC-LE



Schéma 20 : Dendrogramme LEC-LE

Il s'agit d'un enfant prématuré dont la mère a reçu une antibioprofylaxie à la naissance. Il a de plus fait un sepsis à *S. epidermidis*. Les prélèvements per opératoire et de selles ont été réalisés sous antibiothérapie (Vancomycine, Cefotaxime, Métronidazole, Fluconazole). Ces deux prélèvements montrent un profil identique : la culture a retrouvé *S. epidermidis* en prédominance et *S. warneri*. Le séquençage n'a rendu que *Staphylococcus sp.*

III-3-2-2 Comparaison inter-gels

La normalisation des différents gels par le logiciel Gelcompar 2.2® nous permet de visualiser les profils des différents prélèvements positifs sur le même dendrogramme.

Le dendrogramme est représenté ci-dessous :

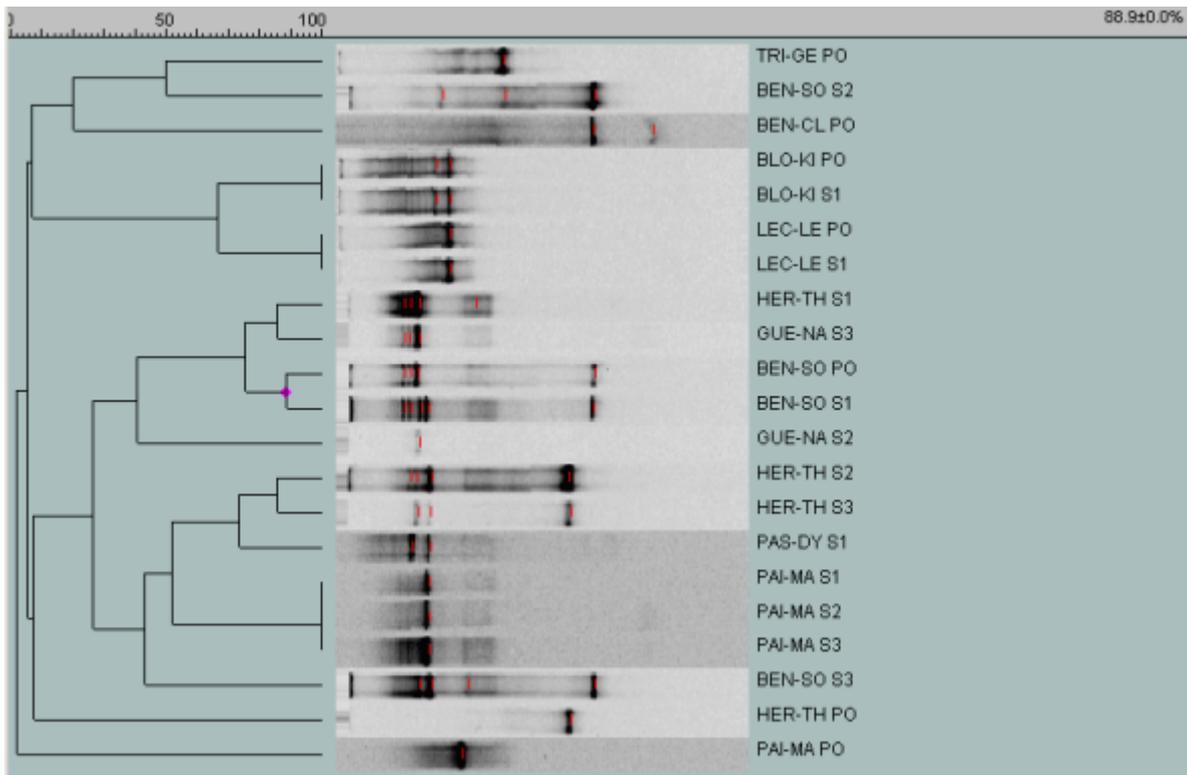


Schéma 21 : Dendrogramme inter-gels

Ce dendrogramme montre qu'il n'y a pas de cluster : chaque individu est différent.

Il permet également d'apprécier la dynamique dans le temps :

ainsi, si l'on considère le nouveau-né PAI-MA, celui-ci a reçu des antibiotiques depuis le prélèvement per opératoire et jusqu'au deuxième prélèvement de selles ; à l'arrêt des antibiotiques, les bandes sont nettement plus visibles à l'électrophorèse.

De même, la bande correspondant à la souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée dans le prélèvement per opératoire de l'enfant HER-TH n'est plus visible sur le prélèvement de selles suivant ; l'enfant a en effet reçu une antibiothérapie large spectre contenant notamment du Claventin® entre ces deux prélèvements. Quelques jours après l'arrêt des antibiotiques la bande correspondant à *P. aeruginosa* réapparaît.

DISCUSSION

Parmi les études déjà réalisées sur la flore digestive du nouveau-né, le facteur le plus étudié est très certainement le mode de nutrition; à l'inverse peu d'études portent sur l'influence du terme de l'enfant. Cependant certains de ces facteurs sont implicitement liés.

La plupart des études portent sur l'identification bactérienne dans des selles. Les techniques utilisées sont le plus souvent des techniques classiques de culture (le mode d'identification n'étant pas toujours précisé), et des techniques de biologie moléculaire plus récemment.

Ces études sont assez hétérogènes :

- dans leur recrutement : nombre très variable de nouveau-nés inclus (2 à plusieurs dizaines)
- dans leur déroulement : les jours de prélèvement des selles , l'étude ou pas des anaérobies ainsi que les conditions de transport ne sont pas toujours précisés.

A l'instar des quelques autres études réalisées sur le sujet notre étude comporte un nombre réduit d'échantillons : 11 prélèvements per opératoires et 16 prélèvements de selles chez 11 nouveau-nés.

Aucune exploitation statistique n'est donc envisageable.

Notre étude a une valeur descriptive. Elle diffère des autres études déjà réalisées sur le sujet en plusieurs points :

- l'association de deux techniques : la culture associée à la biologie moléculaire. La plupart des autres études n'utilisent qu'une technique. Notre étude n'avait pas pour but de comparer les deux techniques mais de décrire au mieux la flore digestive en utilisant la complémentarité des deux méthodes.
- le type de prélèvements : les études existantes analysent uniquement des prélèvements de selles sauf une étude qui analyse des prélèvements réalisés lors de chirurgie digestive chez des nouveau-nés âgés de moins de 10 jours, mais en utilisant uniquement les techniques traditionnelles de culture (**Peng et Chen, 1998**) ; notre étude a analysé en plus des prélèvements de selles, des prélèvements per opératoires réalisés lors de la chirurgie digestive des nouveau-nés.
- la période étudiée : notre étude s'est intéressée à la flore présente au cours des trente premiers jours de vie.
- L'objectif enfin : notre étude avait pour but de décrire cette flore afin d'adapter au mieux l'antibioprophylaxie en cas de chirurgie digestive. Une seule autre étude a été réalisée dans cette optique à notre connaissance (**Peng et Chen, 1998**).

Quelques points ressortent, ils seront à confirmer en prolongeant cette étude sur une plus longue période permettant un recrutement plus important.

Le profil des nouveau-nés recrutés dans notre étude est le suivant :

Il s'agit à 81 % de prématurés ; 72% sont nés par voie basse ; tous ont reçu des antibiotiques au cours de la période étudiée ; ils ont tous reçu une nutrition parentérale, certains ayant en plus reçu une alimentation par lait maternel.

Interressons nous tout d'abord aux prélèvements qui se sont révélés stériles en culture. Cela concerne 5 prélèvements (dont 4 prélèvements per-opératoires). Il s'agissait de prélèvements réalisés à J0, J1 ou J2. On n'a pas observé de bande en TTGE pour ces prélèvements : ceci ne signifie pas avec certitude que ces prélèvements soient stériles ; la TTGE présente en effet des limites.

Les prélèvements qui étaient positifs en culture ont tous donné un résultat positif en TTGE sauf un pour lequel un *Proteus mirabilis* avait été mis en évidence en culture en faible quantité alors que la TTGE n'a pas révélé de bande spécifique.

Il s'agissait d'une selle particulièrement visqueuse ; on peut imaginer que l'extraction n'a pas été suffisante ; la PCR peut également avoir été empêchée par des inhibiteurs.

Le nombre d'espèces par prélèvement est très réduit ; il faut cependant rappeler qu'il s'agit en majorité de nouveau-nés prématurés et sous antibiotiques. Gewolb a mis en évidence une corrélation inverse entre le nombre de jours d'antibiotiques administrés durant le premier mois de vie et le nombre d'espèces bactériennes retrouvées (**Gewolb, 1999**).

Le nombre d'espèces identifiées par culture croît avec l'âge du nouveau-né lors du prélèvement. Ceci est illustré par les tableaux représentant les résultats de façon chronologique (Tableaux 11 et 13).

Un seul prélèvement a révélé la présence d'anaérobies en culture (PAI-MA PO) : il s'agissait d'une souche de *Bacteroides distasonis*. Le profil électrophorétique obtenu par biologie moléculaire montrait la présence d'une bande mais le séquençage n'a pas rendu d'identification satisfaisante selon la base de données RDP Database.

Aucun *Lactobacillus* ni *Bifidobacterium* n'a été retrouvé quelle que soit la technique utilisée. Ceci corrobore les résultats de l'étude menée par Gewolb (**Gewolb, 1999**), dans laquelle un seul nouveau-né prématuré sur 29 est positif à *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dans ses selles au cours du premier mois de vie (15 des 29 nouveau-nés étant alimentés par lait maternel dans cette étude).

Plus récemment, Favier a analysé par biologie moléculaire (PCR-DGGE) les selles de 5 nouveau-nés dont 1 seul avait reçu des antibiotiques. Il était le seul à ne pas présenter *Bifidobacterium* (**Favier et al, 2003**).

De nombreux prélèvements sont positifs à staphylocoques à coagulase négative :

- 3 prélèvements per opératoires sur 11 et 12 prélèvements de selles sur 16.

Parmi ceux-ci *Staphylococcus epidermidis* est le plus représenté :

- Sur ces 3 prélèvements per opératoires, 2 sont positifs à *Staphylococcus epidermidis*

- Sur ces 12 prélèvements de selles, 8 sont positifs à *Staphylococcus epidermidis*.

Dans une étude, El Mohandes a montré que chez les prématurés hospitalisés en unité de soins intensifs, l'utilisation de lait maternel est associée à l'isolement plus fréquent de *S. epidermidis* par rapport aux prématurés nourris par formule (**El Mohandes et al, 1993**). Dans notre étude, *S. epidermidis* a été retrouvé dans les prélèvements de 6 nouveau-nés ; 3 d'entre eux recevaient du lait maternel.

Dans notre étude *S. haemolyticus* intervient en deuxième position en terme de fréquence d'isolement, derrière *S. epidermidis* : il est en effet retrouvé dans 5 prélèvements de selles sur 16.

Dans cette étude préliminaire, les nouveau-nés sont peu colonisés, s'ils le sont, avec *Staphylococcus epidermidis* essentiellement. Les souches de *S. epidermidis* et *S. haemolyticus* isolées ont un profil de résistance élevé. Toutes sont méticilline-oxacilline résistantes, 60% des *S. epidermidis* sont résistants aux aminosides ; 100% pour *S. haemolyticus*.

Ces données nous amènent à réfléchir sur l'antibioprophylaxie à utiliser ; celle-ci consiste actuellement en l'association d'une céphalosporine visant les bacilles à Gram négatif, de vancomycine destinée aux bactéries à Gram positif et d'un aminoside.

Il s'agit d'une antibioprophylaxie large spectre.

Dans l'étude menée par Peng et Chen citée précédemment (**Peng et Chen, 1998**), il est démontré que 90% des prélèvements sont stériles à 24 heures de vie ; par conséquent les auteurs considèrent que les chirurgies digestives effectuées durant cette période de la vie peuvent être considérées comme « propres ». Dans notre étude, parmi les 4 prélèvements réalisés de J0 à J1, 3 sont stériles.

L'intérêt de l'antibioprophylaxie pour une chirurgie digestive intervenant dans les 24 premières heures de vie peut donc être discuté. Ou, tout au moins, l'utilisation de l'aminoside : l'intérêt de celui-ci étant d'induire une bactéricidie rapide, ce qui n'est pas forcément utile dans ce contexte.

A ce jour, peu d'études concernent la flore du prématuré de moins de trente jours.

Notre étude représente la phase préliminaire d'une étude plus vaste, elle se poursuit actuellement et fait l'objet d'un PHRC au CHU de Nantes avec G. Caillaux.

L'interprétation des résultats doit tenir compte des limites des différentes techniques utilisées ; celles-ci sont brièvement rappelées ci-dessous :

Les limites de la culture :

⇒ Certains germes ne sont pas cultivables

Les limites de la biologie moléculaire :

Les techniques de biologie moléculaire ne s'appliquent qu'aux populations les plus représentées (10^6 bactéries/g pour la TTGE)

Elles sont sujettes à des biais introduits lors de ses différentes étapes, c'est à dire :

L'extraction :

⇒ Qualité de l'extraction ?

La PCR V6-V8 :

⇒ Présence d'inhibiteurs de PCR (sels biliaires, produits de dégradation de l'hémoglobine, polysaccharides complexes)

⇒ Certaines séquences peuvent amplifier mieux que d'autres

La TTGE :

- ⇒ Deux espèces de compositions relatives en GC proches peuvent apparaître sous forme d'une simple bande.

CONCLUSION

Cette étude ne permettra pas de tirer de conclusion définitive. Elle propose juste une description de la flore digestive et fécale observée chez ces nouveau-nés durant le premier mois de vie.

Les points importants à relever sont :

- Les prélèvements per opératoires qui étaient stériles en culture le sont également en biologie moléculaire.
- Dans les limites des techniques employées, il n'y a qu'une colonisation par des bactéries cultivables.
- La prépondérance de staphylocoques à coagulase négative tous prélèvements confondus et parmi ceux-ci *S. epidermidis* de façon majoritaire.
- Les profils électrophorétiques extrêmement simples de ces nouveau-nés, pour la plupart prématurés, et tous sous antibiotiques.
- Les profils électrophorétiques différents d'un nouveau-né à l'autre.
- L'absence de bactérie anaérobie sauf dans un prélèvement.

Toutes ces observations seront à confirmer en prolongeant cette étude afin d'obtenir le recrutement suffisant pour permettre une exploitation statistique et proposer une antibioprofylaxie adaptée.

Listes des tableaux, schémas et photos

Liste des tableaux

- Tableau 1 : Age des nouveau-nés inclus lors des prélèvements per opératoires et de selles
Tableau 2 : Indication de la chirurgie digestive des nouveau-nés inclus
Tableau 3 : Terme de naissance des nouveau-nés inclus
Tableau 4 : Poids de naissance des nouveau-nés inclus
Tableau 5 : Mode de naissance des nouveau-nés inclus
Tableau 6 : Récapitulatif des caractéristiques des nouveau-nés inclus
Tableau 7 : Nombre de jours d'antibiotiques reçus par les nouveau-nés sur la période étudiée
Tableau 8 : Nombre de jours d'antibiotiques jusqu'au prélèvement per opératoire
Tableau 9 : Mode de nutrition des nouveau-nés inclus
Tableau 10 : Résultats des cultures des prélèvements per opératoires
Tableau 11 : Résultats des cultures des prélèvements per opératoires présentés de façon chronologique
Tableau 12 : Résultats des cultures des prélèvements de selles
Tableau 13 : Résultats des cultures des prélèvements de selles présentés de façon chronologique
Tableaux 14 : Antibiogrammes
Tableau 15 : Profil de résistance des souches de *S. epidermidis* isolées
Tableau 16 : Profil de résistance des souches de *S. haemolyticus* isolées
Tableau 17 : Profil de résistance des souches de staphylocoques à coagulase négative isolées, autres que *S. epidermidis* et *S. haemolyticus*

Liste des schémas

- Schéma 1 : Représentation du cycle de PCR utilisé
Schéma 2 : Représentation des liaisons hydrogène entre les bases G et C
Schéma 3 : Représentation des liaisons hydrogène entre les bases A et T
Schéma 4 : Représentation de la technique de TTGE
Schéma 5 : Principe du séquençage
Schéma 6 : Représentation brute du résultat du séquençage
Schéma 7 : Schéma général d'analyse des échantillons
Schéma 8 : Résultat du séquençage de la bande n°1 de BEN-SO PO
Schéma 9 : Résultat du séquençage de la bande n°2 de BEN-SO PO
Schéma 10 : Résultat du séquençage de la bande n°13 de HER-TH PO
Schéma 11 : Résultat du séquençage de la bande n°27 de BEN-CL PO
Schéma 12 : Résultat du séquençage de la bande n°28 de LEC-LE PO
Schéma 13 : Résultat du séquençage de la bande n°29 de BLO-KI PO
Schéma 14 : Résultat du séquençage de la bande n°30 de TRI-GE PO
Schéma 15 : Dendrogramme BEN-SO
Schéma 16: Dendrogramme HER-TH
Schéma 17: Dendrogramme GUE-NA
Schéma 18 : Dendrogramme PAI-MA
Schéma 19 : Dendrogramme BLO-KI
Schéma 20: Dendrogramme LEC-LE
Schéma 21 : Dendrogramme inter-gels

Liste des photos

- Photo 1: Abdomen sans préparation d'une atresie duodenale
- Photo 2: Gel n°1 de contrôle d'extraction
- Photo 3: Gel n°2 de contrôle d'extraction
- Photo 4 : Gel n°1 de contrôle de PCR V6-V8
- Photo 5 : Gel n°2 de contrôle de PCR V6-V8
- Photo 6 : Gel °1 de TTGE
- Photo 7 : Gel °2 de TTGE
- Photo 8 : Gel °3 de TTGE

ANNEXES

ANNEXE 1

Formule de la gélose lactosée au bromocrésol pourpre (BCP) :

(en g/L d'eau purifiée)

Peptone.....	5
Extrait de viande.....	3
Lactose.....	10
Agar.....	15
Pourpre de bromocrésol.....	0,025

pH 7,0

Formule de la gélose Columbia ANC + 5% de sang de mouton (CNA) :

(en g/L d'eau purifiée)

Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10
Hydrolysate de protéines animales (bovin ou porcin).....	10
Peptone de cœur (bovin ou porcin).....	3
Amidon de maïs.....	1
Chlorure de sodium.....	5
Agar.....	13,5
Sang (mouton).....	50 mL
Acide nalidixique.....	0,015
Colimycine.....	0,010

pH 7,3

Formule de la gélose Chapman :

(en g/L d'eau purifiée)

Extrait de viande(bovin ou porcin).....	1
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10
Chlorure de sodium.....	75
D mannitol.....	10
Agar.....	15
Rouge de phénol.....	25 mg

pH 7,4

Formule de la gélose Schaedler + 5% de sang de mouton (SCS) :

Peptone de caséine (bovin).....	5,7 g
Peptone de soja.....	1 g
Peptone de viande (bovin et porcin).....	5 g
Extrait de levure.....	5 g
Glucose.....	5,83 g
Chlorure de sodium.....	1,7 g
Tris(hydroxyméthyl)amino-méthane.....	3 g
Hémine (bovin ou porcin).....	0,01 g
L-Cystine.....	0,40 g
Vitamine K3 (ménadione).....	0,0005 g
Agar.....	13,5 g
Sang (mouton).....	50 mL
Eau purifiée.....	1 mL

pH 7,3

Formule de la gélose Schaedler Néo.Vanco + 5% de sang de mouton (SNVS) :

(formule en g/L d'eau purifiée)

Peptone de caséine (bovin).....	5,7 g
Peptone de soja.....	1 g
Peptone de viande (bovin et porcin).....	5 g
Extrait de levure.....	5 g
Glucose.....	5,83 g
Chlorure de sodium.....	1,7 g
Phosphate bipotassique.....	0,83
Tris(hydroxyméthyl)amino-méthane.....	3 g
Hémine (bovin ou porcin).....	0,01 g
L-Cystine.....	0,40 g
Vitamine K3 (ménadione).....	0,0005 g
Agar.....	13,5 g
Sang (mouton).....	50 mL
Néomycine.....	0,005
Vancomycine.....	0,075

ANNEXE 2



Vitek 2 (Biomerieux)



Carte Vitek 2 (Biomerieux)

ANNEXE 3

TAE 50X :

Tris-base (MM=121,14)	242 g
Acide acétique glacial	57,1 mL
EDTA pH8,0-0,5M	100 mL
Eau distillée stérile	qsp 1 L

Tampon de charge PCR :

Sucrose	4 g
TAE 50X	1 mL
Eau distillée stérile	qsp 10 mL
Bromophénol	une pointe

Tampon de charge TTGE :

Bromophénol bleu 2%	250 µL
Xylène cyanol 2%	250 µL
Glycérol 100%	7 mL
Eau distillée	2,5 mL

Tris EDTA :

Tris-HCl pH 8,0-1M	500 µL
EDTA pH 8,0-0,5M	100 µL
Eau distillée stérile	qsp 50 mL

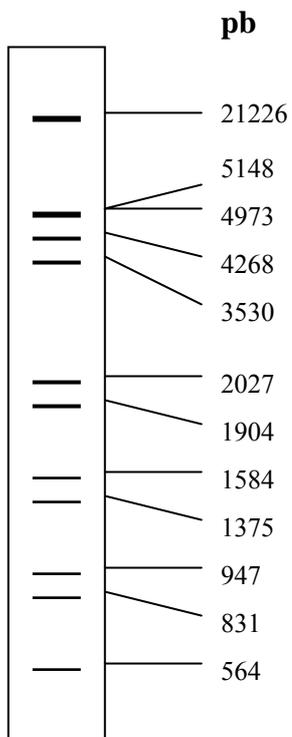
TENP :

Tris-HCl pH8,0-1M	500 µL
EDTA pH 8,0-0,5M	200 µL
NaCl 5M	200 µL
PVPP	0,1 g
Eau distillée stérile	qsp 10 mL

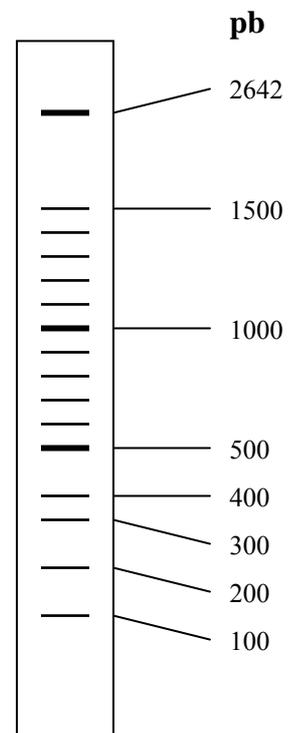
ANNEXE 4

Marqueurs de poids moléculaires :

Marqueur III (120-21200 pb)

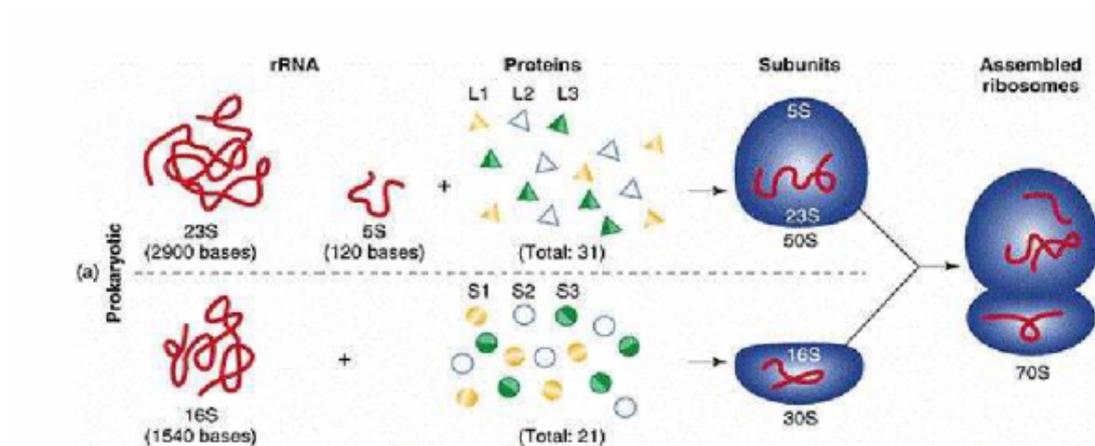


Marqueur XIV (100-1500 pb)



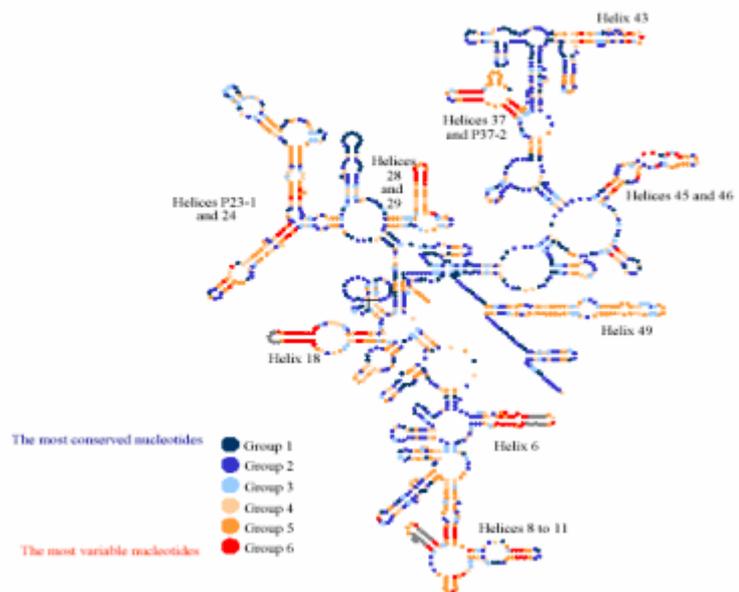
ANNEXE 5

Composition du ribosome procaryote :



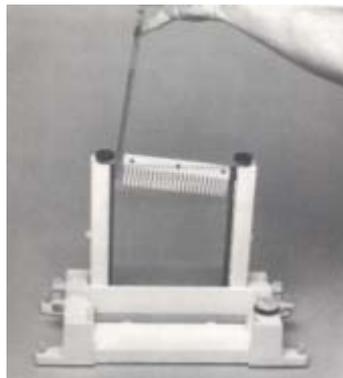
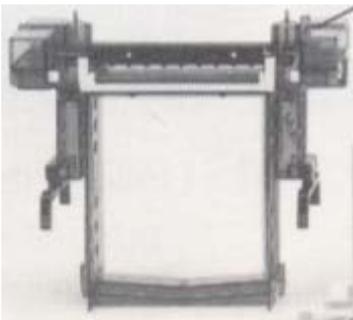
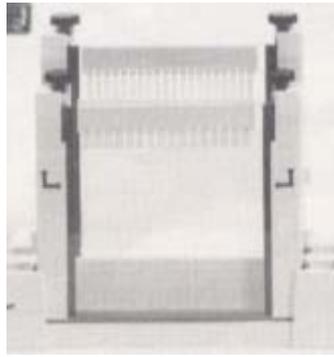
ADNr 16S:

Secondary structure and variability of the 16S rRNA



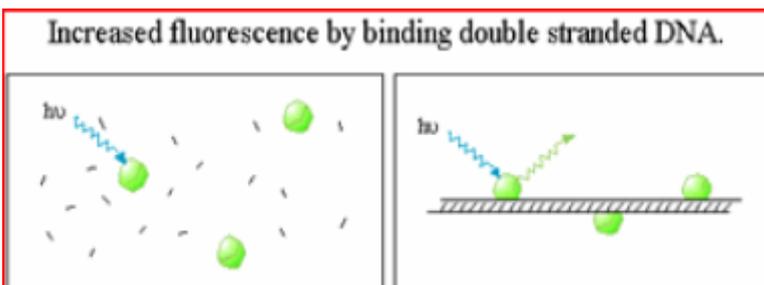
ANNEXE 6

Appareillage de TTGE :



ANNEXE 7

Document 10 : SYBR green



BIBLIOGRAPHIE

1. **ADLEBERTH I.** Establishment of a normal microflora in the newborn infant. Hanson LA, Yolken RH, editors. Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora. Nestlé Nutrition Workshop Series n° 42. Philadelphia : Lippin-cott-Raven; 1999 : 63-78.
2. **AFSSA** : Rapport du groupe de travail «Alimentation infantile et modification de la flore intestinale », juin 2003.
3. **BALMER SE, WHARTON BA.** Diet and faecal flora in the newborn : breast milk and infant formula. Arch Dis Child. 1989; 64 (12): 1672-1677.
4. **BENNET R, ERIKSSON C, NORD E, ZETTERSTROM R.** Suppression of aerobic and anaerobic faecal flora in newborns receiving parenteral gentamicin and ampicillin. Acta Paediatr Scand. 1982; 71: 559-562.
5. **BENNET R, ERIKSSON M, NORD CE, ZETTERSTROM R.** Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotics regimens. Pediatr Infect Dis. 1986 ; 5: 533-539.
6. **BENNET R, NORD CE.** Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section ant treatment with antibiotics in newborn infants. Infection.1987; 15: 332-336.
7. **BENNO Y, SAWADA K, MITSUOKA T.** The intestinal microflora of infants: composition of faecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. Microbiol Immunol. 1984; 28 (9): 975-986.
8. **BEZIRTOGLOU E, ROMOND C.** Effect of the feeding practices on the establishment of bacterial interactions in the intestine of the newborn delivered by cesarian section. J Perinat Med. 1989; 17 : 139-143.
9. **BEZIRTOGLOU E.**The intestinal microflora during the first weeks of life. Anaerobe. 1997; 3: 173-177.
10. **BEZIRTOGLOU E, ROMOND C.** Apparition of *Clostridium sp* and *Bacteroides* in the intestine of the newborn delivered by cesarian section. Comparative Immunology Microbiology and Infectious diseases. 1990;Vol 13, Issue 4: 217-221.
11. **BLAKEY JL, LUBITZ, BARNES GL, BISHOP RF, CAMPBELL NT, GILLIAM GL.** Development of gut colonisation in pre-term neonates. J Med Microbiol. 1982; 15(4): 519-529.
12. **BLAUT M, COLLINS MD, WELLING GW, DORE J, VAN LOO J, DE VOS W.** Molecular biological methods for studying the gut microbiota : the EU human gut flora project. British Journal of Nutrition. 2002; 87 : S203-S211.
13. **BOGARD M, LAMORIL J.** Biologie moléculaire en biologie clinique : méthodes. Option Bio. 2002.

14. **CLAUD EC, WALKER WA.** Hypothesis : inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J.* 2001; 15(8): 1398-1403 .
15. **CONWAY P.** Development of intestinal microbiota. In Mackie R.I, White B.A, Isaacson RE (eds), *Gastrointestinal Microbiology.* 1997; 2: 3-38. Chapman & Hall. New York.
16. **DAI D, WALKER WA.** Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. *Adv Pediatr.* 1999; 46: 353-382.
17. **DE LA COCHETIERE MF, MICHEL C, CHERBUT C, GALMICHE JP, DORE J.** Molecular monitoring of bacterial populations during unduced colitis in rats reveals changes in dominant faecal microbiota. *Microecology and Therapy.* 2002; 29: 23- 25.
18. **DE LA COCHETIERE MF, PILOQUET H, DES ROBERT C , DARMAUN D , GALMICHE JP, ROZE JC.** Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants : the putative role of Clostridium. *Pediatric Research.* 2002; 56: 366-370.
19. **DORE J, CORTHIER G.** Etude de l'écosystème digestif à l'aide de nouveaux outils. Congrès « anaérobies » de la Société française de Microbiologie. 1997; Lille 19-21 mars.
20. **DORE J, RIGOTTIER-GOIS L.** Analyse moléculaire de la flore colique. *Gastroenterol Clin Biol* 2001, 25 : C74-C78.
21. **DUCLUZEAU R.** Installation, équilibre et rôle de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Ann Pédiatr.* 1993; 40(1) : 13-22.
22. **EL-MOHANDES AE, KEISER JF, JOHNSON LA, REFAT M, JACKSON BJ.** Aerobes isolated in fecal microflora of infants in the intensive care nursery : relationship to human milk use and systemic sepsis. *Am J Infect Control.* 1993; 21: 231-234.
23. **FANARO S, CHERICI R, GUERRINI P, VIGI V.** Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl.* 2003; 91(441): 48-55.
24. **FAVIER CF, DE VOS WM, AKKERMANS ADL.** Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe.* 2003(9) : 219-229.
25. **FAVIER F C, VAUGHAN EE, DE VOS WM, AKKERMANS DL.** Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002; 68(1): 219-226.
26. **FINEGOLD SM, SUTTER VL, MATHISEN GE.** Normal indigenous intestinal flora. In : Hentges DJ, editor. *Human intestinal microflora in health and disease.* New York Academic Press: 1983: 3-31.

27. **FRENEY J, RENAUD F, HANSEN W, BOLLET C.** Précis de bactériologie clinique. 2000. Editions ESKA.
28. **GEWOLB IH, SCHWALBE SS, TACIAK LT, HARRISON TS, PANIGRANI P.** Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*; 1999 ; 80: 167-173.
29. **GODON JJ, ZUMSTEIN E, DABERT P, HABOUZIT F, MOLETTA R.** Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63(7) : 2802-2813.
30. **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. *Journal Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999; 28(1) : 19-25.
31. **GRONLUND MM, ARVILOMMI H, KERO P, LEHTONEN OP, ISOLAURI E.** Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy : a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Neonatal*. 2000; 83: 186-192.
32. **HAGIAGE M.** La flore intestinale: de l'équilibre au déséquilibre. 1994. Editions Vigot.
33. **HALL MA, COLE CB, SMITH SL, FULLER R, ROLLES CJ.** Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child*. 1990; 65: 185-188.
34. **HARMSSEN HJ, WILDEBOER-VELOO AC, RAANGS GC, WAGENDORP AA, KLIJN N, BINDELS JG, WELLING GW.** Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30(1): 61-67.
35. **HOY MC, WOOD CM, HAWKEY MP, JOHN W, PUNTIS L.** Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 4539-4547.
36. **LANGHENDRIES JP, PAQUAY T, HANNON M, DARIMONT J.** Acquisition de la flore intestinale néonatale: rôle sur la morbidité et perspectives thérapeutiques. *Arch Pédiatr*. 1998; 5: 644-653.
37. **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(1): 45-51.
38. **MACKIE RI, SGHIR A, GASKINS HR.** Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999; 69(5) : 1035S-1045S.

39. **MANGIN I, SUAOU A, MAGNE F, GARRIDO D, GOTTELAND M, NEUT C, POCHART P.** Characterization of human intestinal bifidobacteria using competitive PCR and PCR-TTGE. *FEMS Microbiology Ecology*. 2005.
40. **MC CRACKEN VJ, LORENZ RG.** The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*. 2001; 3(1) : 1-11.
41. **MURONO K, FUJITA K, YOSHIKAWA M, SAIJO M, INKAYU F, KAYEHASHI H, TSUKAMOTO T.** Acquisition of nonmaternal Enterobacteriaceae by infants delivered in hospitals. *J Pediatr*. 1993; 122: 120-125 .
42. **MUYZER G, SMALLA K.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998; 73: 127-141.
43. **NAVARRO J, SCHMITZ J.** Gastroentérologie pédiatrique. 2000. Edition Médecine sciences-Flamarion.
44. **NEUT C, BEZIRTOGLOU E, ROMOND C, BEERENS H, DELCROIX M, NOEL AM.** Bacterial colonization of the large intestine in newborns delivered by cesarean section. *Zbl Bakt Hyg A*. 1987; 266: 330-337.
45. **ORRHAGE K, NORD CE.** Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl*. 1999; 88(430): 47-57 .
46. **PENG HC, CHEN HC.** Colonization of intestinal bacteria in ill neonates. *Pediatr Surg Int*. 1998; 13: 572-575.
47. **PITCHER DG, SAUNDERS NA, OWEN RJ.** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*. 1989; 8: 151-156
48. **RAMBAUD JC, BUTS JP, CORTIER G, FLOURIE B.** Flore microbienne intestinale: physiologie et pathologie digestives. 2004. Editions John Libbey Eurotext.
49. **ROBERTS AK, CHIERICI R, SAWATZKI G, HILL MJ, VOLPATO S, VIGI V.** Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr*. 1992; 81:119-124.
50. **ROTIMI VO, DUERDEN BI.** The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol*. 1981; 14: 51-62 .
51. **ROTIMI VO, OLOWE SA, AHMED I.** The development of bacterial flora of premature neonates. *J Hyg*. 1985; 94(3): 309-318.
52. **SAKATA H, YOSHIOKA H, FUJITA K.** Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985; 144(2): 186-190.

- 53. SATOKARI RM, VAUGHAN EE, AKKERMANS ADL, SAARELA M, DE VOS WM.** Bifidobacterial diversity in Human feces detected by genus-specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67(2): 504-513.
- 54. SCHWIERTZ A, GRUHL B, LOBNITZ M, MICHEL P, RADKE M, BLAUT M.** Development of the intestinal bacterial composition in hospitalised preterm infants in comparison with breast-fed , full-term infants . *Pediatric Research*. 2003; 54: 393-399.
- 55. STARK PL, LEE A.** The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J Med Microbiol*. 1982; 15: 189-203.
- 56. TANNOCK GW.** Molecular assessment of intestinal microflora. *American Journal of clinical nutrition*. 2001; 73(2): 410-414.
- 57. TOIVANEN P, VAAHTOVUO J, EEROLA E.** Influence of major Histocompatibility Complex on bacterial composition of fecal flora.*Infection and Immunity*. 2001; 69(4) : 2372-2377.
- 58. TORUN MM, BAHAR H, GUR E , TASTAN Y, ALIKASIFOGLU M, ARVAS A.** Anaerobic fecal flora in healthy breast-fed turkish babies born by different methods. *Anaerobe*. 2002; 8: 63-67.
- 59. VASQUEZ A, AHRNE S, PETTERSSON B, MOLIN G.** Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for identification of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zae* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Letters in Applied Microbiology*. 2001; 32: 215-219.
- 60. 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: 317-321.
- 61. YOSHIOKA H, FUJITA K, SAKATA H, MURONO K, ISAEKI K.** Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. *Bifidobact Microflora*. 1991; 10: 11-17.
- 62. ZOETENDAL EG, AKKERMANS ADL, AKKERMANS-VAN VLIET WM, DE VISSER JAGM, DE VOS WM.**The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2001; 13 (3): 129-134.
- 63. ZOETENDAL EG, COLLIER CT, KOIKE S, MACKIE RI, GASKINS HR.** Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota : a review. *J Nutr*. 2004; 134: 465-472.
- 64. ZOETENDAL EG, AKKERMANS ADL, DE VOS WM.** Temperature Gradient Gel Electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64(10): 3854-3859.

65. **ZOETENDAL EG, BEN-AMOR K, AKKERMANS ADL, ABEE T, DE VOS WM.** DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *System Appl Microbiol.* 2001; 24: 405-410.

Nom – Prénom : LECOMTE Claire

Titre de la thèse :

Epidémiologie bactérienne du tube digestif en période néonatale : étude préliminaire

Résumé de la Thèse :

La flore digestive des nouveau-nés en période néonatale étant mal connue, il n'existe pas de recommandation concernant l'antibioprophylaxie en cas de chirurgie digestive.

Nous avons étudié la flore digestive de 11 nouveau-nés, âgés de moins d'un mois et hospitalisés à l'Hôpital Mère-Enfant de Nantes pour chirurgie digestive.

Cette étude a consisté en l'analyse du prélèvement réalisé lors de leur chirurgie digestive et des prélèvements de selles, par deux techniques :

la culture traditionnelle et la biologie moléculaire en utilisant la PCR V6-V8 suivie d'une électrophorèse en gradient de température dénaturant (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis).

Il ressort que :

Les profils obtenus sont extrêmement simples, constitués d'un nombre réduit d'espèces.

Les staphylocoques à coagulase négative étant largement représentés.

L'autre fait important est l'absence quasi totale de bactéries anaérobies (un seul prélèvement est positif à anaérobies). Enfin, la biologie moléculaire n'a pas mis en évidence d'espèces non identifiées à la culture.

MOTS CLES :

Flore digestive – Nouveau-nés – ADNr 16S – TTGE

JURY

PRESIDENT : Mme Françoise BALLEREAU, Professeur de Santé Publique et Pharmacie Clinique
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mme Jocelyne CAILLON, Maître de Conférences de Bactériologie
Faculté de Médecine de Nantes

**M. Jean Christophe ROZE, Professeur de Réanimation Pédiatrique
Hôpital Mère-Enfant de Nantes**

**Mme Marie France DE LA COCHETIERE, chercheur INSERM
Faculté de Médecine de Nantes**

**Mme Christèle GRAS-LE GUEN, Praticien Hospitalier
Hôpital Mère-Enfant de Nantes**

Adresse de l'auteur : 12 rue Francis Merlant - 44000 NANTES