



HAL
open science

Entéropathie du nouveau-né prématuré : approche clinique, metagénomique et métabolomique

Camille Brehin

► **To cite this version:**

Camille Brehin. Entéropathie du nouveau-né prématuré : approche clinique, metagénomique et métabolomique. Bactériologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30263 . tel-03738076

HAL Id: tel-03738076

<https://theses.hal.science/tel-03738076>

Submitted on 25 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THESE

En vue de l'obtention du
Docteurat de l'université de Toulouse

Délivré par
Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline Biologie et Santé

Présentée et soutenue publiquement
par
Camille BREHIN

le 11 décembre 2019

Titre :

Entéropathie du nouveau-né prématuré : approche clinique, metagénomique et métabolomique

École doctorale et discipline ou spécialité :

Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse.

Equipe de recherche :

Pathogénie et commensalisme des entérobactéries, UMR 1220. IRSD.

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Matteo SERINO

Pr. Éric OSWALD

JURY

Emmanuel Mas, Professeur, Université de Toulouse. Président du jury. Examineur
Olivier Claris, Professeur, Université de Lyon. Rapporteur
Karine Clément, Professeur, Université de la Sorbonne Paris. Rapporteur
Philippe Lehours, Professeur, Université de Bordeaux. Rapporteur
Eric Oswald, Professeur, Université de Toulouse. Directeur de thèse
Matteo Serino, Chargé de recherche, INSERM. Co-directeur de thèse

Remerciements

A Monsieur le Professeur Emmanuel Mas, président du jury et examinateur

Je te remercie de nous faire l'honneur de présider ce jury et d'avoir accepté d'être examinateur. Je te remercie pour ton soutien tout au long de mon parcours hospitalier et universitaire. Trouve ici la marque de mon plus grand respect.

À Madame la Professeur Karine Clément, rapporteur

Je vous remercie d'avoir aimablement accepté d'être rapporteur de cette thèse, et de me faire l'honneur de participer à ce jury. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Olivier Claris, rapporteur

Je vous remercie d'avoir aimablement accepté d'être rapporteur de cette thèse, et de me faire l'honneur de participer à ce jury. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Philippe Lehours, rapporteur

Je vous remercie d'avoir aimablement accepté d'être rapporteur de cette thèse, et de me faire l'honneur de participer à ce jury. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Matteo Serino, co-directeur de thèse

Je te remercie d'avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse. Pour ta disponibilité sans faille, tes précieux conseils, ta rigueur, ton encadrement au quotidien, ton optimisme, ton humour, un immense merci. Trouve ici toute ma gratitude et mon respect sincère

A Monsieur Eric Oswald, co-directeur de thèse

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche pour réaliser mon Master 2 Recherche puis ma thèse d'Université, et pour avoir accepté de co-diriger cette thèse. Merci pour votre confiance.

A tous les enfants et leurs familles, à tous les patients rencontrés au cours de mon parcours,
A tous les membres de l'équipe IRSD -2, pour m'avoir accueillie dans le monde de la
recherche en 2011, et pour m'avoir accompagnée, soutenue, aidée, conseillée,
A toute l'équipe de Néonatalogie et de Réanimation néonatale, particulièrement les
infirmier(e)s qui ont recueilli les précieux échantillons,
A toute l'équipe de Pédiatrie Générale et des Urgences Pédiatriques. Pour m'avoir guidée et
soutenue, notamment Pascale et sa foulée. Un merci particulier aux secrétaires Anne, Virginie
et Vanessa qui m'ont aidée dans la récupération des dossiers,
A tous les médecins, internes et étudiants que j'ai côtoyés pendant ces années à l'hôpital des
Enfants. Merci pour ces expériences partagées qui m'ont enrichie et guidée,
A toutes les équipes soignantes de l'hôpital des Enfants, au personnel de l'Institut Fédératif de
Biologie du CHU de Toulouse, un merci particulier à Pauline et Damien,
A mes amis,
A ma famille,
A Laurent, Lucie, Abel et Yaël

Table des matières

Table des matières	4
Table des illustrations	5
Figures.....	5
Tableaux.....	7
Liste des abréviations	8
I. Introduction générale	10
II. Définitions	13
III. Revue de la littérature	14
A. Analyse du microbiote intestinal.....	14
B. Mise en place du microbiote intestinal chez le nouveau-né à terme.....	18
C. Mise en place du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré.....	23
D. Prématurité et entéropathie.....	24
E. Approche préventive.....	42
IV. Hypothèses	46
V. Matériel et méthodes	46
A. Description de l'étude.....	46
B. Procédures.....	48
C. Analyses statistiques.....	54
VI. Résultats	55
A. Comparaison des données cliniques et biologiques.....	55
B. Comparaisons des données structurelles, fonctionnelles du microbiote intestinal et des données métabolomiques fécales entre entéropathes et témoins.....	60
VII. Discussion	93
A. Facteurs cliniques et colonisation intestinale associés à l'entéropathie.....	93
B. Signature metagénomique fonctionnelle du microbiote intestinal et entéropathie.....	96
C. Signature métabolomique du microbiote intestinal et entéropathie.....	98
VIII. Conclusion	100
IX. Bibliographie	101

Table des illustrations

Figures

Figure 1. Analyse du metagénome bactérien par séquençage.....	15
Figure 2. Principales méthodes d'analyses du microbiote intestinal.....	17
Figure 3 : Facteurs modulant le microbiote intestinal de l'enfant selon les différents stades de la vie.....	21
Figure 4 : Différents stades de la colonisation bactérienne au cours de l'enfance.....	22
Figure 5 : Présentation clinique (A), radiologique (B) et per-opératoire (C) d'un enfant souffrant d'entérocolite Ulcéronécrosante de stade III.....	26
Figure 6 : Physiopathologie de l'ECUN (Stade II et III).....	28
Figure 7 : Protocole de recueil des échantillons et de leur stockage.....	48
Figure 8 : Bon de transport accompagnant les échantillons et destiné au laboratoire de bactériologie recevant ces échantillons.....	49
Figure 9 : Analyse LfSe.....	51
Figure 10 : Flow chart de la cohorte.....	56
Figure 11 : Données cliniques et biologiques des nouveau-nés à l'admission dans le service.....	60
Figure 12 : Comparaison du microbiote intestinal entre entéropathes (NEC-1) et témoins (H). Analyse structurelle du microbiote intestinal par le score LDA entre les enfants témoins (H) et les enfants atteints d'entérocolite de stade 1 (NEC-1).....	62
Figure 13 : Comparaison du microbiote intestinal entre entéropathes (NEC-1) et témoins (H)..	62
Figure 14 : Comparaison des voies fonctionnelles du microbiote entre entéropathes (NEC-1) et témoins (H).....	63
Figure 15 : Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et analyse en PCA de ces métabolites fécaux (B)..	64
Figure 16 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant les 10 premiers jours de vie.....	66
Figure 17 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal pendant les 10 premiers jours de vie.....	67
Figure 18: Analyse du métabolome fécal pendant les 10 premiers jours de vie.....	68
Figure 19 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant la deuxième décennie de vie.....	69
Figure 20 : Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et de PCA (B) au cours de la deuxième décennie de vie.....	70
Figure 21 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant la troisième décennie de vie.....	71
Figure 22 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant la troisième décennie de vie. Score LDA utilisé pour construire le cladogramme de la Figure 21.....	72
Figure 23 . Indices de diversité du microbiote intestinal de 21 jours à 30 jours de vie (A) et Analyse en composantes principales (PCA) (B) du microbiote intestinal.....	73
Figure 24. Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal de 21 jours à 30 jours de vie.....	73
Figure 25 : A) Maladies et B) variations génétiques de l'hôte liée au microbiote intestinal associé au NEC-1_21-30d.....	75
Figure 26 : Analyse du métabolome fécal pendant la troisième décennie de vie.....	76

Figure 27 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant le deuxième mois de vie par le score de LDA.....	77
Figure 28: Analyse structurelle du microbiote au cours du deuxième mois de vie. Analyse en composantes principales (PCA) du microbiote intestinal (A) ; Indices de diversité du microbiote intestinal (B).....	78
Figure 29 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal pendant le deuxième mois de vie.	78
Figure 30 : Analyse du métabolome fécal au cours du deuxième mois de vie..	79
Figure 31 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal du groupe des entéropathes en fonction des décades de vie.....	81
Figure 32 : Analyse comparative du métabolome intestinal du groupe des entéropathes (NEC-1) en fonction des décades de vie.....	82
Figure 33 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des entéropathes par analyse de l'ensemble des métabolites associés à la voie métabolique..	83
Figure 34 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des entéropathes par analyse de la sérine associée au polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP)..	84
Figure 35 : Analyse comparative du métabolome fécal chez les nouveau-nés témoins (H) en fonction des décades de vie.....	85
Figure 36 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe témoins par analyse de l'ensemble des métabolites associés à la voie métabolique..	86
Figure 37 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des témoins par analyse de la leucine associés au polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP).	87
Figure 38 : Comparaison du microbiote des enfants entéropathes (NEC-1) et des témoins (H) en fonction de leur exposition néonatale aux antibiotiques par le score LDA.....	88
Figure 39 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction de l'exposition néonatale aux antibiotiques.	89
Figure 40 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction de l'exposition maternelle aux antibiotiques (ABx-mother).....	89
Figure 41 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction du mode d'accouchement représentée par le score LDA pour les voies microbiennes prédictives)..	90
Figure 42 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction du poids de naissance (ELBW pour Extremely Low Birth Weight = poids de naissance < 1000g)	90
Figure 43 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction l'âge gestationnel (GA) représentée par le score LDA pour les voies microbiennes prédictives.....	91
Figure 44 : Facteurs maternels et infantiles influençant le métabolome fécal..	92
Figure 45 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des entéropathes nés avant 28 semaines d'aménorrhée par analyse de l'ensemble des métabolites associés à la voie métabolique..	93

Tableaux

Tableau 1: Signes cliniques, biologiques et radiologiques des entérocolites ulcéro-nécrosantes (ECUN) selon la classification de Bell modifiée par Kiegman et Walsh.....	11
Tableau 2: Tableau récapitulatif des études portant sur l'ECUN et le microbiote fécal et métabolome fécal de nouveau-nés prématurés.....	32
Tableau 1: Indices de diversité alpha et leurs particularités.....	52
Tableau 2: Caractéristiques de la cohorte.....	57
Tableau 3: Détails de l'antibiothérapie administrée dans les 2 groupes (entéropathes et témoins) au cours de la première semaine de vie.....	58
Tableau 4: Analyse comparative du microbiote fécal du groupe des entéropathes et du groupe des témoins (analyses structurelle, fonctionnelle et métabolomique fécales).....	79

Liste des abréviations

ABx: antibiotiques

ADN : Acide desoxyriboNucléique

AG: Age Gestationnel

AK: Amikacine

AINS: Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AMX: amoxicilline

ANOVA : ANalysis Of Variance

ARN : Acide RiboNucléique

CFX: Cefotaxime

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire

CPAP: Continue Positive Air Pression

CPP: Comité de Protections des Personnes

CRP: C-Reactive Protein

C3G: Céphalosporines de 3^{ème} génération

E. coli : Escherichia coli

ECUN: Entérocolite Ulcéro-Nécrosante

ELBW: Extremely Low Birth Weight

GA: Gestational Age

GCMS: Gas Chromatography Mass Spectrometry

GN: Gentamicine

H: Healthy

HAS: Haute Autorité de Santé

HMO: Human Milk Oligosaccharides

IgA : Immunoglobulines A

IL-1 β : InterLeukine-1 β

INRA: Institut National de Recherche Agronomique

IQ : Interquartile

LB : Lysogeny Broth

LDA: Linear Discriminant Analysis

LPS: LipoPolySaccharides

LEfSe: Linear discriminant analysis Effect Size

mGWAS: metabolome - Genome Wide Association Studies

mmHg: millimètre de mercure

MSEA: Metabolome Set Enrichment Analysis

NEC: Necrotizing EnteroColitis

NEC-1: Necrotizing EnteroColitis de stade I = entéropathe

NFS: Numération de Formule Sanguine

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

OH : Ohio

PAM: Pression Artérielle Moyenne

Pb : paires de base

PCA: Principal Component Analysis

PCR-DGGE: Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

pH: potentiel hydrogène

PICRUSt: Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States

PN: Poids de Naissance

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

SA: Semaines d'Aménorrhée

SD: Standard Deviation

TLR4: Toll Like Receptor 4

T-RFLP : Terminal restriction fragment length polymorphism

TSEA: Taxon Set Enrichment Analysis

UPLC-MS : Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry

USA: United States of America

VAN: vancomycine

VLBW: Very Low Birth Weight

vs: versus

I. INTRODUCTION GENERALE

Considéré comme un organe à part entière, le microbiote intestinal s'établit et se stabilise dans les trois premières années de vie et impacte la santé de l'individu tout au long de son existence [1]. Il n'y a pas de définition standardisée du microbiote intestinal sain ou « eubiotique » aux différents âges de la vie versus un microbiote intestinal altéré ou « dysbiotique ». La dysbiose est considérée comme une altération de la composition, de la diversité et/ou de la fonctionnalité du microbiote, associée à une pathologie. D'une manière générale, un écosystème fragilisé par un changement fonctionnel est en dysbiose. Il peut s'agir soit d'un excès de pathobiontes (micro-organismes capables d'aggraver l'inflammation intestinale), et/ou d'une diminution de la quantité de micro-organismes bénéfiques, et/ou une restriction de la biodiversité et/ou de la richesse microbienne [2]. Une baisse de la quantité de bactéries et de la diversité microbienne a été observée dans plusieurs maladies, notamment les maladies métaboliques comme le diabète de type 2, l'obésité et les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn [3, 4]. Chaque année, 15 millions d'enfants naissent prématurément dans le monde et ce taux est en constante augmentation [5]. D'après les nouvelles techniques d'identification microbienne par séquençage, les enfants prématurés présentent une diversité du microbiote intestinal moins importante que celle du microbiote d'un enfant né à terme [6]. Les facteurs influençant sa mise en place ne sont pas clairement définis, notamment chez le nouveau-né prématuré, bien que certains facteurs aient déjà été identifiés chez le nouveau-né à terme (facteurs génétiques dans des études sur des jumeaux [7], santé maternelle, âge gestationnel, mode d'accouchement, type d'alimentation ou encore administration périnatale d'une antibiothérapie) [8].

L'entérocolite ulcéronécrosante (ECUN), définie par la classification modifiée de Bell [9-11] (**Tableau 1**) est la pathologie digestive la plus grave du nouveau-né prématuré. Selon l'étude française EPIPAGE 2, la prévalence d'ECUN prouvée (stade II et III) varie entre 1% et 5% chez les nouveau-nés prématurés de moins de 32 semaines d'aménorrhée. Le taux de mortalité des enfants présentant une ECUN de stade II ou III est d'environ 25% et ces enfants ont une morbidité neuro-développementale à long terme [12]. Une altération du microbiote intestinal associée à une réponse hyper-inflammatoire sont impliquées dans le développement de l'ECUN [13] [14].

Tableau 5: Signes cliniques, biologiques et radiologiques des entérocolites ulcéro-nécrosantes (ECUN) selon la classification de Bell modifiée par Kiegman et Walsh [10, 11]

	Stade	Signes généraux	Signes radiologiques	Signes cliniques
ECUN Suspectée	I	Apnées, bradycardie, instabilité thermique	Aération digestive normale ou modéré	Résidus gastriques occulte dans les selles Distension abdominale modérée
	IIa		Iléus radiologique > 1 anse dilatée Pneumatose intestinale localisée	Rectorragies visibles Distension abdominale importante Bruits hydro-aériques absents
ECUN avérée	IIb	Thrombopénie Acidose métabolique	Pneumatose intestinale étendue Ascite, aéroportie	Œdème de la paroi abdominale Anses digestives palpables Sensibilité abdominale
	IIIa	Acidose mixte, oligurie Hypotension Coagulopathie	Anses intestinales proéminentes Aggravation ascite Absence de pneumopéritoine	Œdème de la paroi important Erythème et induration cutanée
ECUN compliquée	IIIb	Choc, détérioration des paramètres vitaux et biologiques	Pneumopéritoine	Perforation digestive

Dans des modèles expérimentaux, l'absence de colonisation microbienne intestinale des animaux exempts de germes les protège contre le développement de l'ECUN [15]. Cette observation soutient l'hypothèse d'un lien entre dysbiose et l'ECUN. D'un point de vue clinique et microbiologique, les études sur l'ECUN s'intéressent seulement aux stades II et III. Les suspicions d'ECUN, identifiées par le stade I (léthargie, bradycardies, instabilité thermique associées à des résidus gastriques bilieux, des vomissements, une distension abdominale avec ou sans rectorragies avec une imagerie radiologique abdominale normale ou montrant une simple dilatation des anses intestinales) ne sont pas étudiées. Cependant, ces enfants, décrits comme «entéropathes» (stade I) par les cliniciens ont des durées de nutrition parentérale et des durées d'hospitalisation prolongées avec un risque d'évolution vers un stade d'ECUN plus sévère. Ce travail de thèse de doctorat porte sur l'analyse des caractéristiques

cliniques des enfants entéropathes et de leur mère associée à celles du microbiote intestinal de ces enfants. Ces données pourraient fournir des informations clefs quant au développement et à l'évolution de l'ECUN, et ainsi ouvrir de nouvelles pistes pour améliorer la prise en charge de ces nouveau-nés prématurés, avec un impact immédiat sur la vie de ces jeunes patients.

II. DEFINITIONS

Microbiote intestinal

Le corps humain enferme en son sein et cohabite avec plusieurs milliers de milliards de micro-organismes. Notre tube digestif n'abrite pas moins de 10^{12} à 10^{14} micro-organismes soit autant que le nombre de cellules qui constituent notre corps [16]. Cet ensemble de bactéries, virus, parasites, champignons constitue notre microbiote intestinal.

Microbiome humain

L'ensemble des gènes portés par les micro-organismes vivant dans ou sur le corps humain, est appelé microbiome humain. Il comprend environ 10 millions de gènes [17].

Metagénome

Le metagénome est l'ensemble de l'ADN microbien contenu dans un écosystème.

Taxonomie en bactériologie

La taxonomie est la science qui étudie la classification des êtres vivants. La classification actuelle comprend le règne, l'embranchement (ou phylum), la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. L'espèce constitue l'unité de base dans la classification du vivant.

III. REVUE DE LA LITTÉRATURE

A. Analyse du microbiote intestinal

Culture microbienne

Les techniques permettant de décrire la composition du microbiote ont beaucoup évolué ces dernières années. Il y a 50 ans, les premières études s'intéressant au microbiote intestinal, utilisaient des techniques de culture *in vitro*. Mais seulement 30% des espèces de notre flore commensale seraient cultivables *in vitro* [18]. Cette approche se base sur la sélection de colonies bactériennes en milieux sélectifs ou non-sélectifs, puis sur la caractérisation phénotypique et moléculaire des isolats. Indépendamment de la culture, des approches génomiques ont transformé notre compréhension du rôle du microbiote humain dans la santé et dans de nombreuses maladies.

Biologie moléculaire

Pour déterminer la composition du microbiote intestinal, le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S bactérien est majoritairement utilisé. L'ARN ribosomal 16S est une macromolécule ubiquitaire, constitutive de la petite sous-unité 30S du ribosome procaryote. Elle présente une structure alternant des régions conservées communes à l'ensemble du domaine *Bacteria*, des régions variables communes aux bactéries d'un groupe bactérien et des régions hypervariables spécifiques d'une espèce. Différentes méthodes d'analyse du microbiote intestinal s'appuient sur les caractéristiques de l'ARN 16S (PCR quantitative, puces phylogénétiques, inventaires moléculaires par séquençage, électrophorèse dénaturante).

Récemment, de nouvelles méthodes appelées les « meta-omiques » permettent une meilleure description de cet écosystème. La métagénomique, initialement appliquée à l'étude des sols et écosystèmes extrêmes, permet l'analyse du potentiel génétique d'un écosystème [19]. Le projet MetaHIT, lancé en 2008 et coordonné par l'INRA, a eu pour objectif d'identifier l'ensemble des génomes microbiens intestinaux (métagénome) par séquençage haut débit. Basée sur un recueil de selles auprès de 124 personnes, elle a ainsi identifié un total de 3,3 millions de gènes différents, appartenant à plus de 1 000 espèces différentes, dont une large majorité est d'origine bactérienne. Au plan individuel, cette étude a montré que chaque individu portait en moyenne 540 000 gènes microbiens, soient plus d'une centaine d'espèces, réparties en sept phyla différents. Ce fut surtout la première étude à démontrer l'extrême richesse du microbiote intestinal, en identifiant des centaines d'espèces bactériennes inconnues jusque-là [20]. Cette méthode métagénomique peut comporter des biais méthodologiques (prélèvement de l'échantillon initial, extraction d'ADN) et des standards ont

été récemment décrits [21]. Ces mêmes auteurs ont mis à jour leurs données et décrit environ 10 millions de gènes microbiens [17]. Il y a donc 300 fois plus de gènes dans le génome du microbiote que dans le génome humain (**Fig. 1**) D'autres approches comme la metatranscriptomique (séquençage de tous les ARN présents dans l'échantillon), la metaprotéomique et métabolomique (caractérisation moléculaire des protéines et des métabolites retrouvés dans l'échantillon) ont révolutionné l'analyse de l'écosystème microbien intestinal [22-24].

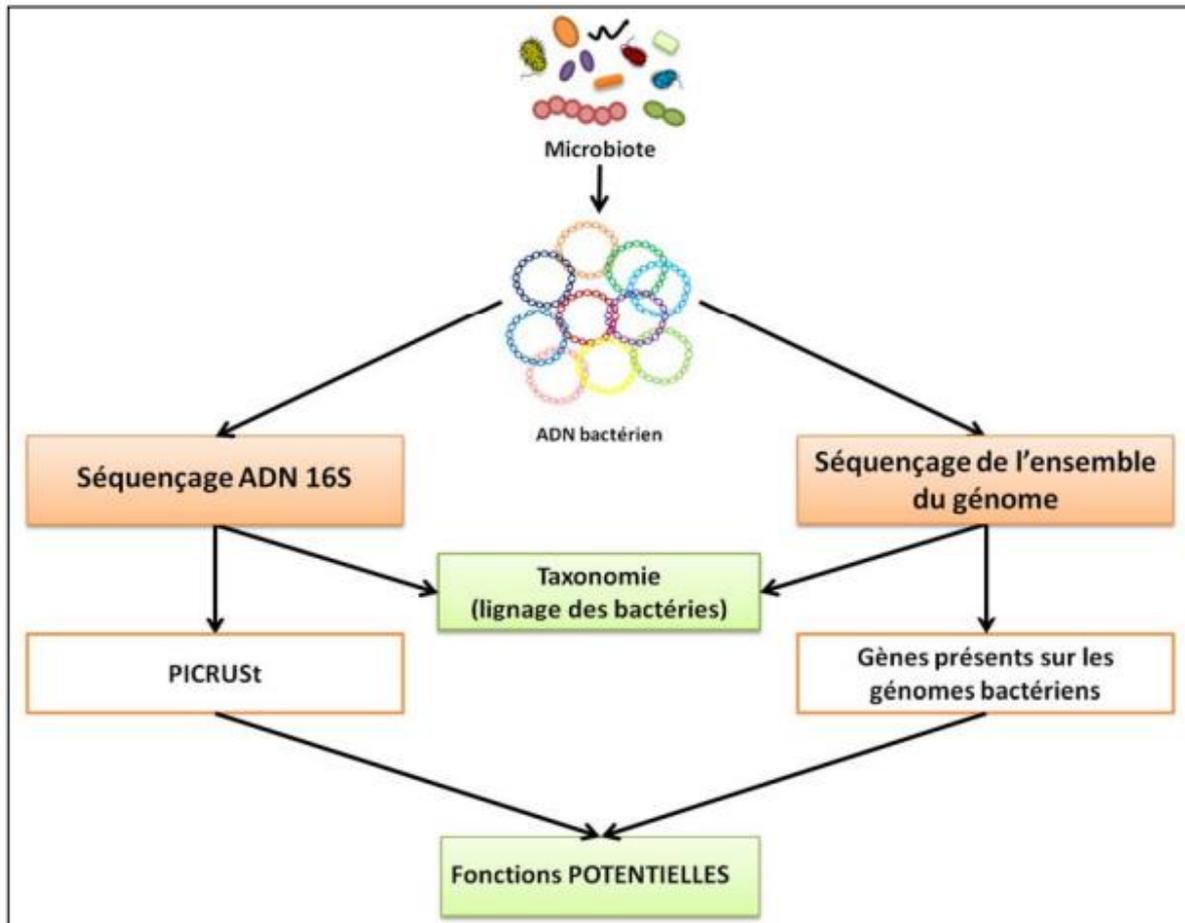


Figure 1 : Analyse du metagénome bactérien par séquençage. L'extraction et l'analyse de l'ADN bactérien sont devenues les méthodes de choix pour caractériser le microbiote intestinal. Chaque espèce bactérienne possède une séquence d'ADN ribosomal 16S spécifique. Le séquençage de cette ADN 16S permet l'identification des bactéries présentes dans l'échantillon. L'analyse PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) permet de prédire les gènes présents dans le génome des bactéries identifiées seulement à partir du séquençage de leur ADN 16S. Il est donc possible d'avoir un aperçu des fonctions potentiellement exercées par le microbiote intestinal en séquençant uniquement l'ADN 16S. Le séquençage de l'ensemble du génome permet l'identification plus précise des espèces bactériennes présentes dans l'échantillon. De plus, cette analyse donne accès aux gènes codés par les bactéries et permet d'étudier les fonctions exercées sans avoir recours à des prédictions informatiques comme le PICRUST. Cependant, quelle que soit la méthode utilisée, le séquençage de l'ADN ne rend pas compte des fonctions actives dans l'échantillon mais seulement des fonctions que les bactéries peuvent exercer.

Culturomique

Cette technique s'est développée ces dernières années. En utilisant un grand nombre de milieux de culture différents (> 200), les bactéries sont d'abord isolées puis identifiées par spectrométrie de masse ou séquençage du gène codant pour l'ARN 16S. Grâce à cette méthode, plus de 1000 espèces procaryotes ont été isolées d'échantillons de fèces humains [25-27].

Biais techniques et standardisation des pratiques

Afin de standardiser et sécuriser les étapes de collecte, d'aliquotage et de stockage des échantillons, des procédures standardisées sont disponibles sur le site du projet européen International Human Microbiome Standards (www.microbiome-standards.org) [28] et actualisées récemment [21]. Les selles ne doivent pas être exposées à l'air au-delà de 4 heures. Elles sont congelées à -80°C. Dans une solution stabilisante, et homogénéisées, les selles peuvent être maintenues jusqu'à plusieurs semaines en air ambiant [21].

Dans notre étude, nous avons fait le choix de recueillir les selles des nouveau-nés à l'aide d'un écouvillon stérile. Ces échantillons étaient directement conservés dans un tube Eppendorf de 5 ml que j'avais préalablement préparé dans notre laboratoire de recherche. Ces tubes contenaient un milieu de culture Lysogeny Broth avec 20% de glycérol et réfrigéré à 4°C. Ces tubes étaient ensuite acheminés au laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse pour congélation à -80°C selon la procédure habituelle mais accompagnés d'un bon spécifique. Ce bon a été préparé avec l'aide des bactériologistes, et permettait le repérage de ces échantillons dans la phase pré-analytique et au laboratoire de bactériologie.

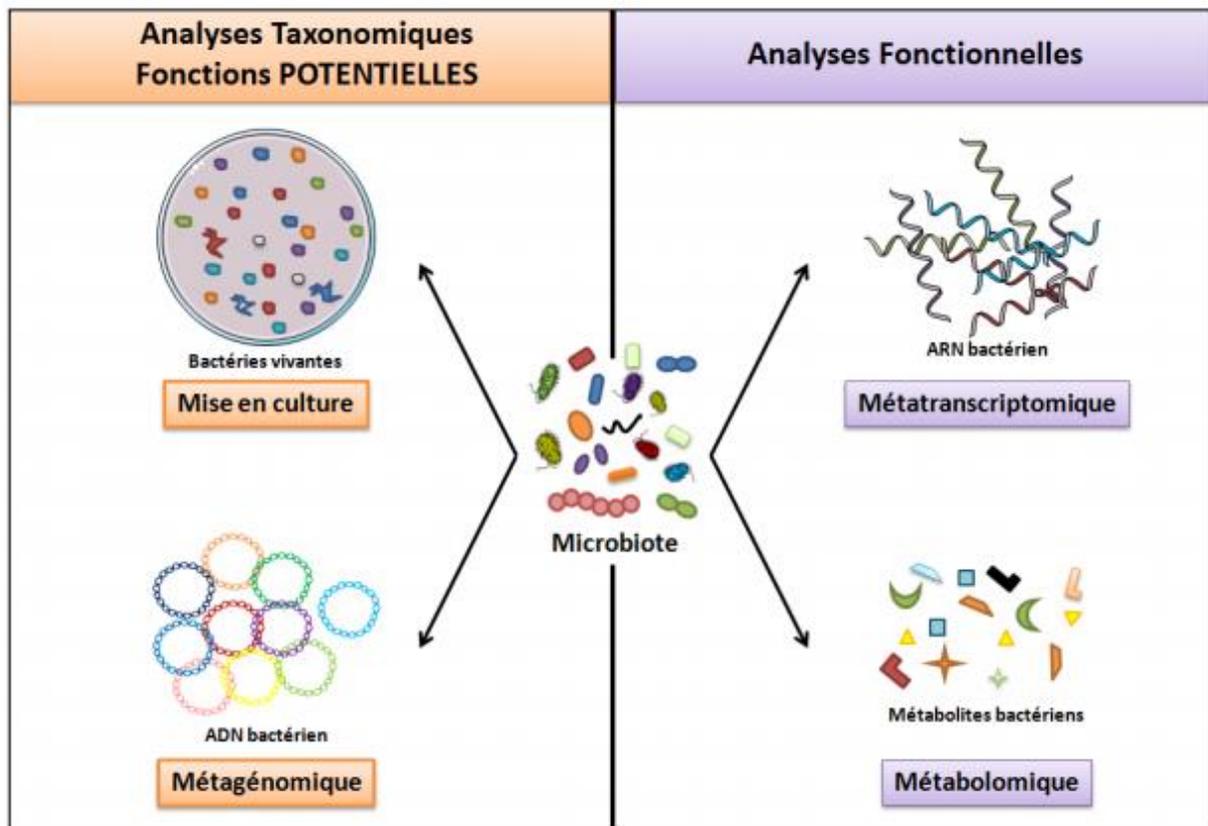


Figure 2 : Principales méthodes d'analyses du microbiote intestinal. La mise en culture des selles a été pendant longtemps la seule méthode d'analyse disponible pour caractériser le microbiote intestinal. Cette méthode permet l'identification des espèces cultivées et l'évaluation in vitro des fonctions exercées par les bactéries intestinales. Néanmoins, cette méthode est limitée car presque 70% des bactéries intestinales ne sont pas cultivables. La metagénomique consiste en l'étude du génome bactérien et fournit une vision globale des populations microbiennes présentes au sein d'un échantillon. La metatranscriptomique s'intéresse aux transcrits bactériens et permet des activités métaboliques exprimées par l'ensemble des microorganismes présents dans l'échantillon. Enfin, la métabolomique consiste en l'étude de l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras...) l'identification présents dans l'échantillon et rend compte des voies métaboliques procaryotes actives.

B. Mise en place du microbiote intestinal chez le nouveau-né à terme

La population microbienne intestinale se développe rapidement de la naissance jusqu'à l'âge de trois ans où sa composition se stabilise pour atteindre sa forme adulte. L'établissement du microbiote dans les premières années de vie impacte à vie la santé de l'individu [29-31]. Les nouvelles techniques d'identification microbienne par séquençage, sans nécessité de mise en culture, ont permis l'identification d'espèces bactériennes pionnières dans la colonisation intestinale du nouveau-né.

In utero, le fœtus se développe dans un environnement stérile; la colonisation microbienne prend toute son expansion à la naissance [32, 33]. Cette colonisation diffère d'un individu à l'autre. Elle est modelée par des facteurs internes et externes : facteurs génétiques [7], santé maternelle, âge gestationnel, mode d'accouchement, type d'alimentation ou encore administration périnatale d'une antibiothérapie [8], [34] (**Fig. 3**).

La grossesse affecte tous les organes, y compris le microbiote maternel. Les changements du microbiote intestinal [35] et vaginal [36, 37] au cours de la grossesse ont une importance particulière puisqu'ils sont responsables de la transmission verticale du microbiote au nouveau-né au cours de l'accouchement par voie basse.

Une colonisation massive du nouveau-né débute à la naissance suite au contact avec les microbiotes vaginal, fécal et cutané de la mère et des personnes environnantes [33].

A la naissance, le microbiote intestinal du nouveau-né ressemble au microbiote vaginal et/ou fécal maternel en cas d'accouchement par voie basse ou de la peau en cas d'accouchement par césarienne. A une semaine de vie, le microbiote d'enfant né par voie basse est caractérisé par de hauts niveaux de *Bifidobacterium* et *Bacteroides* [38, 39] alors que les *Clostridium* seront plus abondants chez les enfants nés par césarienne [32]. Dans le tractus vaginal, l'augmentation des Lactobacilles au cours de la grossesse permet de réduire le pH et prévient ainsi la croissance de microorganismes potentiellement pathogènes pouvant infecter le liquide amniotique, les membranes et le fœtus [40]. A 8 semaines de vie, les profils du microbiote intestinal des enfants nés par césarienne ou par voie basse finissent par se ressembler [32]. De récentes études suggèrent que ces différences associées à une naissance par césarienne versus une naissance par voie basse, seraient en réalité plus liées aux indications médicales sous-tendant ce geste qu'au geste chirurgical lui-même [41, 42].

Après la naissance, le lait maternel favorise la colonisation et la maturation du microbiote intestinal de l'enfant [43]. Le lait de mère contient des bactéries qui varient entre le colostrum et la lactation plus tardive, l'état de santé de la mère et le mode d'accouchement [44]. Le microbiote du lait maternel est dominé par quelques genres : *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* et *Bradyrhizobiaceae*. *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont présents dans le lait de mère. Le transfert de ces bactéries dans le tractus digestif du nouveau-né a été prouvé par des techniques indépendantes de la culture (ARN 16S) impliquant que l'allaitement est une voie post-natale d'échange microbien mère-enfant [45]. Cependant, l'origine de ces bactéries, très probablement intestinale, les dynamiques complexes de transmission et leur site spécifique de colonisation à l'enfant doivent encore être déterminés.

Le lait maternel contient également des prébiotiques tels que les oligosaccharides du lait humain (HMO), des polymères de sucre qui permettent la croissance de communautés microbiennes dont les *Bifidobacterium* [46]. Les bifidobactéries sont importantes pour l'intestin de l'enfant car elles inhibent la croissance d'organismes pathogènes, elles modulent la fonctionnalité de la barrière muqueuse et promeuvent les réponses inflammatoires et immunologiques [47].

Le microbiote « immature » suit une progression depuis les organismes facilitant l'utilisation des lactates pendant la période d'allaitement exclusif jusqu'aux organismes anaérobies impliqués dans l'utilisation de la nourriture solide [48]. A la fin de la première année de vie, le microbiote de l'enfant achève une structuration plus complexe et devient similaire à celui d'un adulte vers l'âge de trois ans [49, 50] (**Fig. 4**).

Tout en facilitant l'utilisation des nutriments, le microbiote de l'enfant éduque le système immunitaire et programme le système métabolique. Un déséquilibre dans cette organisation nommée dysbiose est décrit chez ces patients présentant des maladies métaboliques et auto-immunes [8, 49] [51].

De nombreuses études ont montré que les antibiotiques avant, pendant ou après la naissance déséquilibrent la mise en place naturelle du microbiote [52-54]. L'utilisation d'une antibiothérapie per-partum ou post-partum est associée à une diminution de la diversité microbienne dans les selles des enfants avec une baisse du taux de lactobacilles et de bifidobactéries [55, 56].

L'introduction de lait artificiel perturbe la colonisation et la prolifération du microbiote intestinal néonatal. Le lait artificiel est associé à une augmentation de la prévalence de

Clostridium difficile, de *Bacteroides fragilis* et de *Escherichia coli* et diminue la prévalence des bifidobactéries [57] [58]. Cependant, certaines études récentes ont montré qu'une supplémentation avec du lait artificiel associée à un allaitement maternel ou une alimentation exclusive en lait artificiel complétementée en pré- ou probiotiques n'induisaient pas de modification du microbiote intestinal dans les premiers mois de vie [59, 60].

Une étude finlandaise a montré que les femmes en surpoids ou obèses avant la grossesse avaient un plus grand nombre de *Bacteroides* et de *Staphylococcus aureus* dans leur microbiote fécal pendant le troisième trimestre de la grossesse qu'une femme avec un poids normal [61]. Le suivi des enfants de cette cohorte à 1 mois et à 6 mois a montré que la concentration en *Bacteroides* dans les fèces d'enfant né de mère en surpoids ou obèse était plus importante. De plus, la prise de poids pendant la grossesse a un effet positif sur la croissance des *Bacteroides* et un effet négatif sur la croissance des bifidobactéries [61-63]. Une étude norvégienne plus récente montrait des différences dans la composition du microbiote intestinal maternel au moment de l'accouchement selon le poids avant la grossesse et le gain de poids pendant la grossesse. Cependant, ces changements n'étaient associés qu'à des différences limitées dans la composition du microbiote intestinal de leurs nourrissons en bas âge [64]. D'autres études observationnelles ont décrit que des mères diabétiques ou avec un eczéma pouvaient transmettre à leur enfant les profils microbiens caractéristiques de leur pathologie [63, 65].

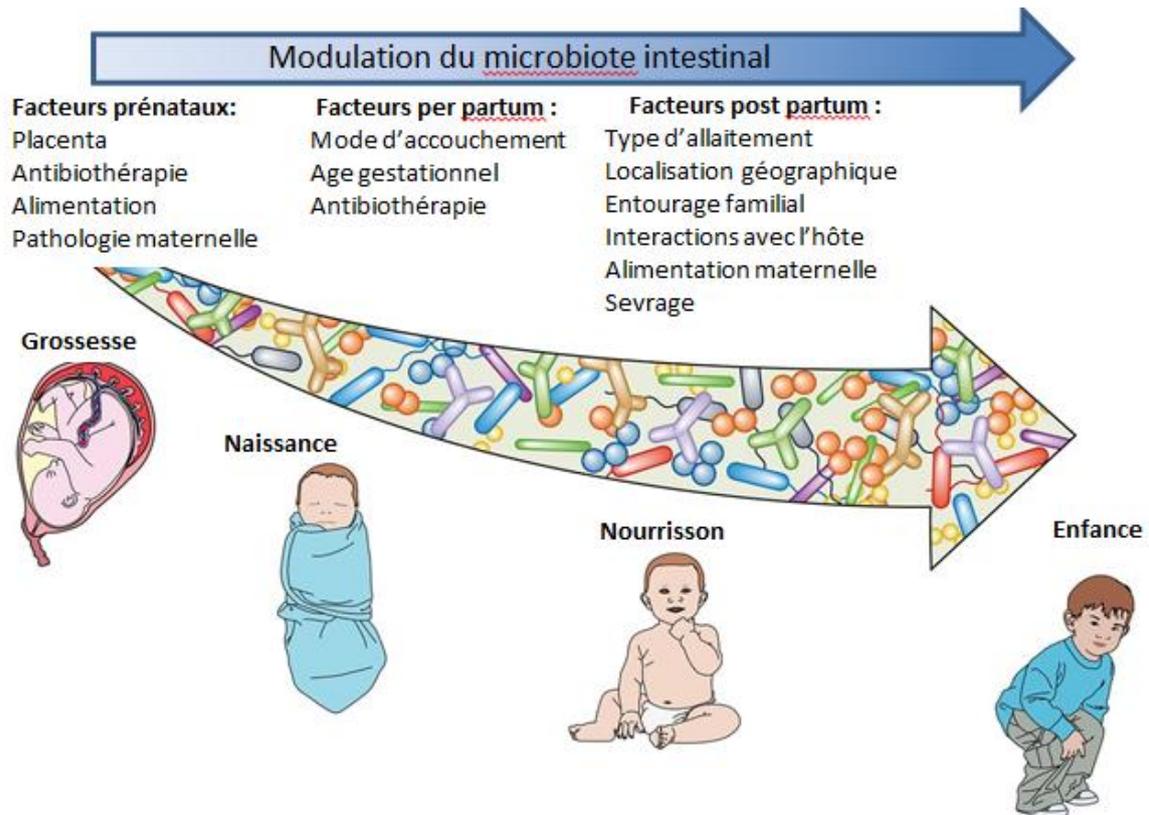


Figure 3 : Facteurs modulant le microbiote intestinal de l'enfant selon les différents stades de la vie (d'après Milani *et al*) [34].

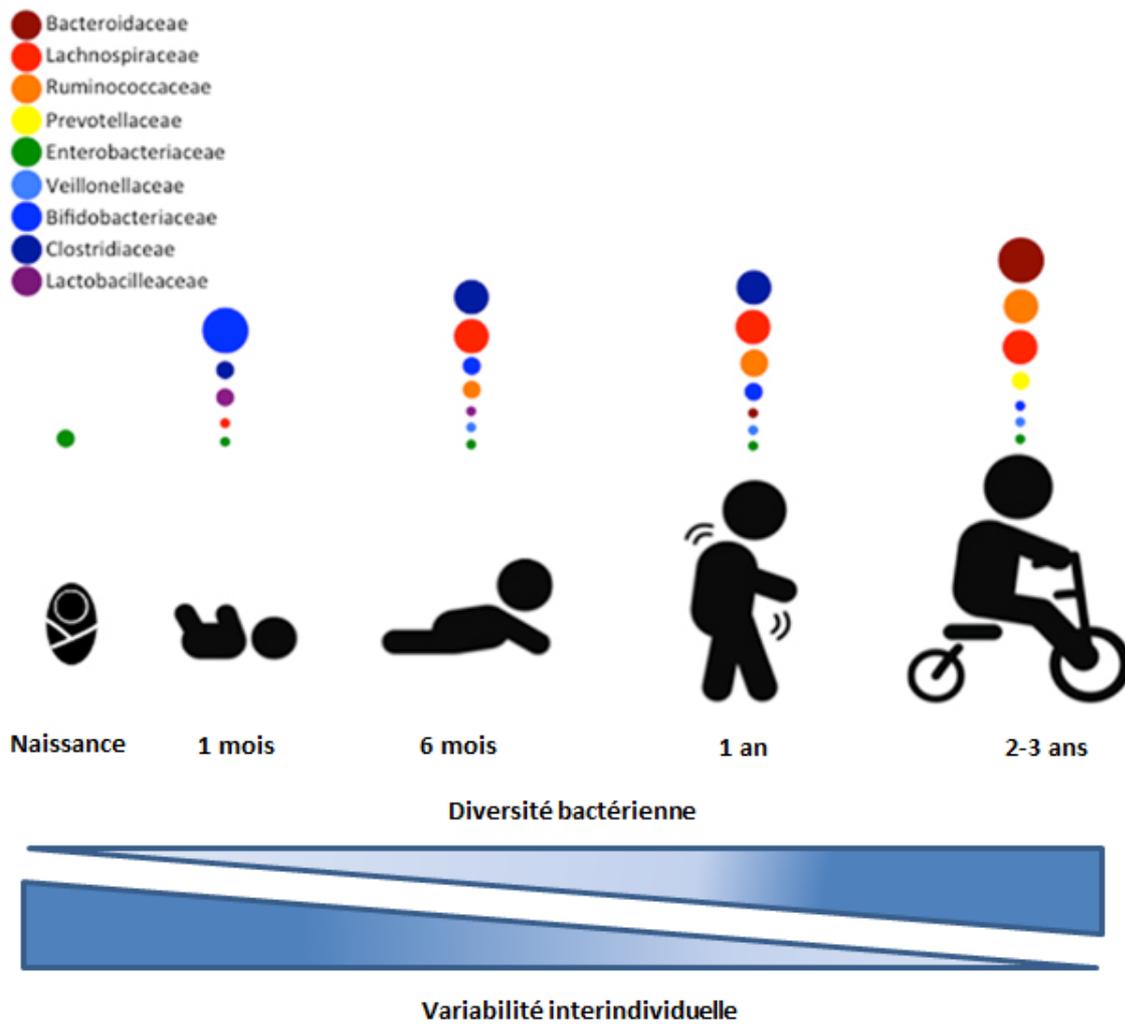


Figure 4 : Différents stades de la colonisation bactérienne au cours de l'enfance. Les plus importantes familles bactériennes sont représentées par des cercles. La taille du cercle est proportionnelle à l'abondance de ces bactéries aux différents âges de la vie (D'après Arrieta *et al*) [66].

C. Mise en place du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré

L'incidence de la prématurité augmente au niveau mondial. En France elle représente environ 7% des naissances [67]. Les nouveau-nés prématurés ont un microbiote intestinal différent des nouveau-nés à terme. L'établissement de ce microbiote est particulier : la quantité d'espèces bactériennes est moins riche, avec un retard de colonisation par les bactéries anaérobies strictes appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides* [6, 68]. Bien qu'il existe une grande variabilité entre les études, un profil de microbiote intestinal chez les nouveau-nés prématurés est décrit comme présentant un déséquilibre entre les espèces anaérobies strictes et celles aérobies. Les bactéries comme les entérocoques et les entérobactéries s'implantent avec retard alors que le genre *Staphylococcus* s'établit précocement. Ces souches de *Staphylococcus* sont surtout des souches à coagulase négative [69]. Alors qu'*E. coli* est considéré comme l'espèce habituellement dominante parmi les Protéobactéries chez le nouveau-né à terme, certaines études ont décrit une colonisation prédominante à d'autres entérobactéries comme *Enterobacter cloacae* ou *Serratia* [70]. Les mères qui menacent d'accoucher prématurément sont souvent hospitalisées pendant de longues périodes et sont traitées par une antibiothérapie qui peut altérer leur microbiote et donc modifier le microbiote du nouveau-né [71]. Les nouveau-nés prématurés peuvent être exposés à de nombreux facteurs in utero (maladie maternelle prénatale, infections telles que vaginose bactérienne et chorioamniotite, le tabagisme et le stress physiologique). Après la naissance, d'autres facteurs semblent jouer un rôle dans la colonisation microbienne : alimentation, procédures invasives, antibiotiques et médicaments qui modifient le pH gastro-intestinal [14]. En effet, les nouveau-nés prématurés ont une durée d'hospitalisation prolongée et cet environnement hospitalier modifie l'implantation de leur microbiote intestinal. Une étude longitudinale récente portant sur deux nouveau-nés prématurés a constaté que le microbiote intestinal était influencé par des microorganismes présents dans l'environnement de l'Unité de soins intensifs de néonatalogie et que des microbes résistants aux antibiotiques colonisaient les intestins de ces nourrissons [45, 72]. Dans une autre étude longitudinale d'un seul nourrisson, né par césarienne, neuf échantillons de selles prélevés au cours de la troisième semaine de vie ont montré une évolution vers un métabolisme basé sur la fermentation (anaérobies obligatoires), *E. coli* n'étant plus l'espèce microbienne la plus abondante [73, 74]. Une autre étude portait sur la cinétique microbienne intestinale de 58 nouveau-nés regroupés en trois âges gestationnels (<26 semaines, 26-28 semaines et >28 semaines) [75]. Les selles (N = 922

échantillons) ont été étudiées dans chaque groupe et par ordre chronologique. Les résultats montrent une progression du microbiote non aléatoire dans le temps, avec une colonisation initiale dominée par les Bacilli puis par les Gammaprotéobactéries et les *Clostridium* jusqu'à une colonisation dominée par les anaérobies de 33 à 36 semaines d'âge corrigé (c'est-à-dire l'âge gestationnel plus le nombre de semaines de vie après la naissance).

La physiologie du tractus digestif du nouveau-né prématuré caractérisée par immaturité de la barrière intestinale, perméabilité accrue, niveau du pH gastrique plus élevée [75], participe à cette implantation particulière du microbiote intestinal.

D. Prématurité et entéropathie

Le nouveau-né prématuré présente une immaturité de son organisme, entraînant une conjonction de dysfonctionnements, à différents niveaux : digestion, motilité intestinale, absorption intestinale et circulation mésentérique [76]. Ces nouveau-nés ont ainsi une augmentation du risque de lésions digestives [76]. Le système immunitaire intestinal est également immature (diminution de la production d'Immunoglobulines A et de défensines) [77]. Grâce à l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés prématurés (corticothérapie anténatale, maintien d'une normothermie, prise en charge ventilatoire adaptée plus ou moins associée à une administration de surfactant à la naissance, alimentation par lait de mère, soins de développement), le taux de mortalité a diminué au cours des dernières années [78]. Cependant, l'incidence de la morbidité dans cette population reste élevée [67]. Les épisodes d'entéropathie sont fréquents dans les premières semaines de vie chez les nouveau-nés prématurés bien qu'il n'y ait pas de chiffres disponibles sur l'incidence du stade le plus précoce (Stade I). Cela entraîne des arrêts alimentaires, une nutrition parentérale prolongée, un retard de la maturation intestinale et de leur croissance staturo-pondérale [79]. Le stade le plus sévère d'entéropathie est l'Entérocolite Ulcéro-Nécrosante (ECUN) de stade II et stade III. Elle touche majoritairement le nouveau-né grand prématuré (né entre 29 et 32 semaines d'aménorrhée) et survient le plus souvent entre J15 et J21 d'âge post-natal. En France, son incidence est de 1 à 5 % alors que dans d'autres pays, elle peut atteindre 20 % [80]. La morbi-mortalité des enfants présentant une ECUN est très élevée : 20 à 30% des enfants décèdent et les survivants ont un taux important de complications à long terme, notamment au niveau neuro-développemental [76]. Les nouveau-nés à terme peuvent aussi développer une ECUN mais de manière plus précoce et les facteurs associés sont différents: anoxo-ischémie, toxicomanie maternelle, anomalies congénitales, allergie aux protéines de lait de vache [81].

1. Présentation clinique de l'entérocolite ulcéro-nécrosante

Les signes digestifs sont initialement aspécifiques : intolérance digestive avec présence de résidus gastriques (alimentaires ou bilieux), distension abdominale avec météorisme abdominal, rectorragies. Ces nouveaux sont très douloureux, notamment à la palpation de la paroi abdominale. A un stade plus évolué, apparaissent une défense abdominale et un aspect anormal de la paroi abdominale (érythème ou ecchymoses, voussures constituant un signe de dilatation des anses abdominales, circulation veineuse collatérale abdominale). Les signes généraux peuvent apparaître (instabilité thermique, bradycardies, apnées, détresse respiratoire, hypotonie) allant même jusqu'à des troubles hémodynamiques (choc septique). Les signes biologiques sont également aspécifiques: acidose métabolique avec hyperlactacidémie, hyperglycémie, hyper ou hypoleucocytose, thrombocytopenie. Les signes radiologiques au niveau abdominal sont une aide au diagnostic (pneumatose intestinale voire pneumopéritoine). La classification de Bell *et al.* modifiée par Kliegman et Walsh regroupe des signes cliniques, biologiques et radiologiques et permet de stratifier la gravité de cette pathologie et de sa prise en charge [10, 11] (**Tableau 1**).

L'analyse anatomopathologique du tube digestif d'un nouveau-né présentant une ECUN montre une atteinte multifocale et extensive du grêle et/ou du côlon associant des plages de nécroses ischémiques et hémorragiques, à point de départ muqueux, entraînant des ulcérations puis une perforation digestive. Une pneumatose intestinale caractérisée par une infiltration gazeuse dans la sous-muqueuse et/ou la sous-séreuse et/ou les vaisseaux portes, est également décrite [10] (**Fig. 5**).



Figure 5 : Présentation clinique (A), radiologique (B) et per-opératoire (C) d'un enfant souffrant d'entérocolite Ulcéronécrosante de stade III [76]

2. Traitement de l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN)

La prise en charge de l'ECUN associe un traitement médical et parfois chirurgical. L'enfant est mis à jeun avec une antibiothérapie à large spectre ciblant les entérobactéries et les germes anaérobies. Le chirurgien est rapidement prévenu afin de définir avec les néonatalogues l'indication chirurgicale (perforation intestinale). Les complications aiguës sont le choc septique, les complications de stomie (prolapsus, sténose), abcès de paroi abdominale, éviscération, éventration. La résection intestinale étendue est responsable du syndrome de grêle court avec comme conséquence une nutrition parentérale au long cours [82, 83].

3. Physiopathologie de l'entérocolite ulcéro-nécrosante

La physiopathologie de l'ECUN n'a pas encore été complètement élucidée. Son développement est multifactoriel, associant des prédispositions génétiques, une instabilité hémodynamique, une colonisation microbienne intestinale particulière, l'absence de sédation [76] (**Fig. 6**).

L'entérocolite ulcéro-nécrosante survient généralement dans les deux premiers mois de vie mais pas dans les premiers jours de vie. Le concept de l'ECUN associée à une colonisation inappropriée de l'intestin prématuré a été introduit par Claude et Walker [84]. Cela s'explique par le fait que des "épidémies" d'ECUN se sont produites dans des services de néonatalogie, mais qu'aucun agent pathogène n'est apparu comme associé à l'ECUN. Les auteurs postulent que, plutôt qu'une infection directe, l'ECUN peut être le résultat d'une inflammation secondaire à la colonisation ou à l'infection microbienne. Les sections histologiques de nourrissons atteints d'ECUN présentaient souvent des signes de nécrose et d'inflammation de l'intestin en plus de la prolifération bactérienne. Ces auteurs ont suggéré une activation des neutrophiles induite par les micro-organismes, conduisant à une inflammation par la libération de médiateurs pro-inflammatoires, à une vasoconstriction et à une atteinte de la barrière intestinale. Cette dernière serait causée par l'interaction entre un microbiote intestinal dysbiotique et un intestin immature. Ils ont également suggéré que divers facteurs tels que l'allaitement maternel pourraient réduire la colonisation par ces organismes pathogènes et induire ainsi une colonisation par des organismes commensaux, qui à leur tour modulent les réactions inflammatoires et diminuent les lésions intestinales. Le grand prématuré est un être « immature », ce qui entraîne des dysfonctionnements au niveau immunitaire. De nombreuses études ont analysé le niveau d'inflammation des nouveau-nés prématurés. Un dérèglement immunitaire, en association avec une dysbiose microbienne ont été décrits comme étant impliqués dans la pathogenèse de l'ECUN, notamment par une signalisation excessive du

récepteur Toll de type 4 (TLR4) en réponse aux lipopolysaccharides (LPS) induisant une réponse inflammatoire exagérée chez les enfants prématurés [85].

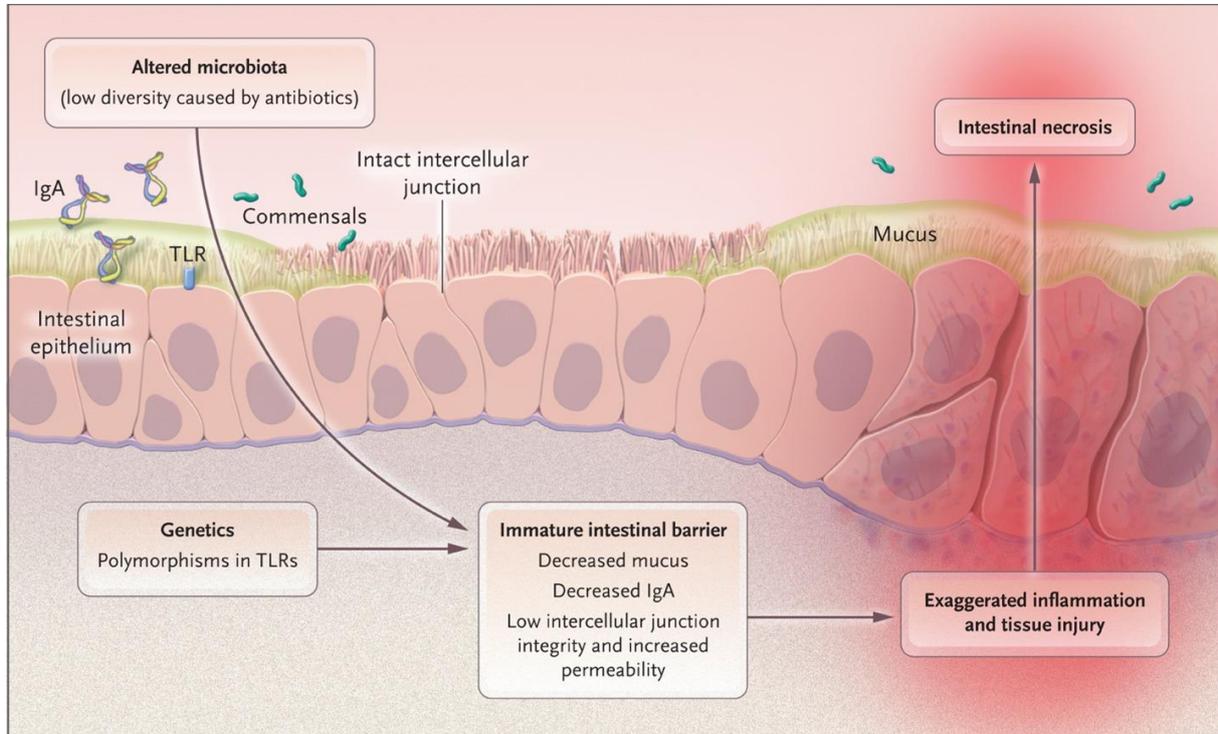


Figure 6 : Physiopathologie de l'ECUN (Stade II et III). Un dérèglement immunitaire en lien avec l'immaturation intestinale des nouveau-nés prématurés (diminution de la production d'Immunoglobulines A et de défensines, diminution du mucus, augmentation de la perméabilité intestinale), en association avec une dysbiose microbienne ont été décrits comme étant impliqués dans la pathogenèse de l'ECUN, notamment par une signalisation excessive du récepteur Toll de type 4 (TLR4) en réponse aux lipopolysaccharides (LPS), induisant une réponse inflammatoire exagérée chez les enfants prématurés [76]

a) Microbiote du prématuré et ECUN

Plusieurs études ont cherché à établir un lien spécifique entre une dysbiose et la survenue de l'ECUN à l'aide de techniques de culture. Récemment, des techniques indépendantes de la culture (ARN16S), mais qui peuvent y être associées afin de compléter les informations fournies par la culture, ont été utilisées pour analyser le microbiote intestinal de ces nouveau-nés. Ces études ont fait état de dysbiose microbienne plutôt que l'implication d'un seul pathogène responsable de l'ECUN. Par rapport à des nourrissons à terme, le microbiote intestinal des nourrissons prématurés est moins riche en espèces bactériennes, et comporte une proportion accrue d'espèces potentiellement pathogènes [6]. L'importance de la dysbiose microbienne dans le développement de l'ECUN est soutenue par le fait que l'ECUN ne peut

pas être produite chez des animaux exempts de germes [15, 86]. Elle est également suggérée par une association entre la dysbiose microbienne induite par l'utilisation précoce d'antibiotiques et le développement de l'ECUN [87, 88].

Les premières études utilisant les gènes codant pour l'ARN 16S pour l'analyse du microbiote ont suggéré que l'augmentation relative des Protéobactéries (notamment des *Enterobacteriaceae*) par rapport à d'autres phyla tels que les Firmicutes (notamment les *Clostridia*), les Bactéroidetes (*Bacteroides*) et les Negativicutes (*Veillonella*, *Negativicoccus*) étaient associées au développement de l'ECUN [89]. Dans une autre étude metagénomique du microbiote intestinal de 144 prématurés et de 22 nourrissons à terme, l'ECUN et la mortalité étaient associées à la colonisation par des souches de *E. coli* uropathogène [90]. D'autres études comparant le microbiote intestinal de nourrissons ayant une ECUN et de témoins ont montré qu'une augmentation des Protéobactéries (*Enterobacteriaceae*) et une diminution des anaérobies (en particulier les Negativicutes (*Veillonella*)) précédaient la survenue d'une ECUN chez des nouveau-nés avec un très petit poids de naissance (< 1500 grammes) [89, 91]. Dans une méta-analyse d'études sur le microbiote de prématurés ayant une ECUN par rapport à des témoins prématurés qui n'ont pas développé d'ECUN, des changements dans l'abondance de divers phyla à environ 27 semaines d'âge corrigé ont été observés, avec une diminution de l'abondance des Firmicutes (*Staphylococcus*) et des Bactéroidetes (*Bacteroides*) et l'augmentation de l'abondance des Protéobactéries (*Klebsiella*) précédant le diagnostic de l'ECUN [14]. L'ensemble des études portant sur le microbiote des prématurés et l'ECUN est résumé dans le **tableau 2**.

b) Facteurs qui modifient le microbiote et peuvent prédisposer à l'ECUN

Plusieurs études évaluant l'utilisation d'antibiotiques (notamment l'Ampicilline, le Céfotaxime et les aminosides) chez les prématurés suggèrent qu'un risque plus élevé de développer une ECUN est directement lié à la durée de l'antibiothérapie [87, 88, 92]. Les études de La Rosa *et al.* et de Murgas *et al.* suggèrent qu'il existe une relation entre l'utilisation d'antibiotiques chez les prématurés, la composition microbienne du tractus gastro-intestinal, et le développement ultérieur de l'ECUN [75, 93].

D'autres études suggèrent que l'environnement acido-basique du tractus gastro-intestinal pourrait également jouer un rôle important dans le développement de l'ECUN [94]. Cela concerne également le microbiote du tractus gastro-intestinal puisque les bactéries réagissent

différemment à l'environnement acido-basique en termes de croissance. Les bloqueurs H₂ favorisent la prolifération des Protéobactéries par rapport aux Firmicutes dans le tractus gastro-intestinal [95]. Cette relation est intéressante puisque ces quantités bactériennes sont également modifiées chez les nourrissons qui développent par la suite une ECUN [14]. Des études chez des lapins ayant reçu du lait acidifié ont montré une diminution de la colonisation intestinale et de la translocation, mettant l'accent sur l'effet de l'acidité gastrique sur la colonisation microbienne intestinale des lapins [96, 97]. Les études chez des enfants ayant reçu un lait acidifié ont montré à une incidence plus faible de l'ECUN [98]. Les méta-analyses de grandes études multicentriques montrent que l'utilisation d'antiacides, qu'il s'agisse d'inhibiteurs de l'H₂ et inhibiteurs de la pompe à protons, augmente le risque de développement de l'ECUN [99, 100]. La supplémentation en lactoferrine bovine atténue cet effet [99]. La fréquence de l'ECUN est diminuée chez les enfants recevant le lait de leur propre mère. Cela semble être lié à de nombreux éléments présents dans le lait, comme les macronutriments, les acides gras polyinsaturés, la lactoferrine, les immunoglobulines et des micro-organismes. Le fait que le lait maternel humain contienne des micro-organismes qui semblent être spécifiques pour chaque mère est un phénomène fascinant qui pourrait aussi être lié à la diminution du risque d'ECUN chez les bébés alimentés avec le lait de leur propre mère [45, 101]. Certains services de néonatalogie alimentent les nouveau-nés avec du lait de lactarium pasteurisé et donc dépourvu de matériel cellulaire ainsi que de micro-organismes vivants. Les études comparant l'utilisation du lait de lactarium par rapport à un lait artificiel pour prématuré n'ont pas montré de rôle préventif du lait de lactarium dans le développement de l'ECUN. Certaines de ces études sur le lait de lactarium versus le lait artificiel ont près de 30 ans et il est difficile de discerner les critères diagnostiques d'ECUN [102].

c) Métabolome dans l'entérocolite nécrosante

Très peu d'études ont été réalisées sur les schémas métabolomiques chez les enfants prématurés présentant une ECUN comparativement aux témoins ou aux prématurés en bonne santé [103-106]. Bien qu'il n'y ait pas de signature métabolomique dans l'ECUN, ces études ont fait état de résultats intéressants. Morrow et al. ont évalué le métabolome urinaire en association avec la dysbiose intestinale précédant l'ECUN. Trois métabolites urinaires différaient chez les malades comparativement aux prématurés en bonne santé. L'alanine dans l'urine a été directement corrélée avec l'abondance des Firmicutes et était inversement corrélée avec l'abondance des Protéobactéries et de *Propionibacterium* [104]. L'histidine n'était pas indépendamment associé aux caractéristiques de la communauté microbienne, mais

le rapport entre l'alanine et l'histidine était associé à l'ECUN et était inversement associé à l'abondance de *Propionibacterium*. Wilcock *et al.* ont décrit des différences métaboliques dans le sérum entre les prématurés qui ont développé une ECUN (cinq prématurés de moins de 28 semaines) et ceux qui ne l'ont pas développé (sept enfants de moins de 28 semaines et huit nourrissons nés à terme) [106]. Les échantillons de sérum dans la première semaine de vie de ces prématurés ne permettaient pas de prédire qui allait, plus tard, développer une ECUN. Cependant, lorsque les nourrissons étaient en nutrition entérale complète, les analyses ont révélé des différences dans 12 métabolites liés aux carbohydrates, au métabolisme lipidique et à la signalisation intracellulaire, entre le groupe ECUN et le groupe contrôle. D'après les métabolites identifiés, une inhibition de la pro-insuline et une régulation à la hausse de l'IL-1 β ont été corrélées au développement de l'ECUN. Stewart *et al.* ont étudié une importante cohorte de prématurés (641 échantillons de 35 nourrissons et une cohorte de plus de 300 nourrissons) et ont comparé les cas de prématurés présentant une ECUN (n = 10) à ceux qui n'ont pas présenté d'ECUN (n = 9) par analyse de l'ARN 16S et analyse métabolomique du sérum de ces patients [103]. Un sous-ensemble de 37 échantillons de sérum a été soumis à une analyse métabolomique par spectrométrie de masse par chromatographie liquide ultra-performante. Au moment du diagnostic de l'ECUN, cinq métabolites étaient significativement différents dans le groupe des nouveau-nés prématurés présentant une ECUN : deux métabolites de la biosynthèse de l'hormone stéroïde C21 et des voies du métabolisme du linoléate, deux métabolites de la voie métabolique du linoléate et un métabolite du métabolisme des leucotriènes et de la formation de prostaglandines à partir d'arachidonate. Stewart *et al.* ont également réalisé une étude protéomique et métabolomique du sérum chez les prématurés qui ont développé une ECUN versus un groupe contrôle mais n'ont identifié aucune protéine ou métabolite associés au développement de l'ECUN [103].

Seulement deux études se sont intéressées au métabolome fécal des nouveau-nés prématurés. La première a inclus des enfants de moins de 32SA et de moins de 1000g présentant une ECUN (3 cas) comparé au métabome fécal de nouveau-nés prématurés témoins appariés (21 témoins). Aucune différence métabolomique a été identifiée dans les fécès entre cas et témoins [105]. La deuxième a inclus 7 enfants prématurés de moins de 32 SA dont le profil métabolomique fécal a été comparé au métabolome fécal de 27 enfants témoins. Le profil métabolomique fécal a permis d'identifier des voies associées à l'apparition de la NEC, avec des métabolites impliqués dans le métabolisme du linoléate [107].

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des études portant sur l'ECUN et le microbiote fécal et métabolome fécal de nouveau-nés prématurés

Etudes	Lieu et période de l'étude	Participants/design de l'étude	Methode	paramètres d'alpha diversité	paramètre de beta diversité	Profils microbiens
Millar 1996 [108]	Lieu: 3 hôpitaux au Royaume-uni Période: Sept 1991 à Jan 1992	Cas: 10 enfants avec ECUN stade II et III, 24 à 34 SA. 9 enfants ont eu un recueil de selles au moment de l'ECUN (9 jours avant à 7 jours après). Un enfant a eu une biopsie intestinale post-mortem, 14 jours après le début de l'ECUN Témoins: 22 enfants prématurés. Les selles ont été recueillies une fois par semaine pendant une durée médiane de 5 semaines	1. Cultures Conventionnelles 2.PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)	pas clairement détaillé	Les types d'organismes non cultivés par PCR-DGGE étaient semblables dans les cas d'ECUN par rapport aux témoins.	7 nourrissons présentaient des séquences DGGE semblables à celles de <i>Streptococcus salivarius</i> . Tous ces nourrissons ont reçu un supplément de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG. Le fragment de 193 pb de la région V3 de l'ADNr 16S était insuffisant pour construire des arbres phylogénétiques. Une bande correspondant à <i>Klebsiella oxytoca</i> a été isolée au 14e jour chez un nourrisson témoin. Une amplification de 500 pb a permis une meilleure identification des espèces.
De la Cochetiere 2004 [109]	Lieu: Nantes, France, Monocentrique Période: pas clair	Cas: 3 prématurés avec ECUN stade II et III. Médianes d'AG(SD) 28.5 SA (2.1) et de poids (SD) 880 (170)g Témoins: 9 prématurés. Médianes d'AG(SD) 27,7 SA (2) et de poids (SD) 940 (320)g Recueil de selles X 1/semaine	1. Cultures Conventionnelles 2.PCR-DGGE	pas clairement détaillé	Une bande correspondant au sous-groupe <i>Clostridium perfringens</i> dans 3 cas d'ECUN a été observée dans des échantillons de selles précoces avant le diagnostic d'ECUN mais pas dans les témoins.	<i>Clostridium perfringens</i> dans 3 cas de NEC a été observé dans des échantillons de selles précoces avant le diagnostic de NEC.

Wang 2009 [110]	Lieu: Chicago, IL, USA, Monocentrique Période: pas clair	Cas: 10 prématurés avec ECUN stade II et III. AG 25-32 SA. Un échantillon a été prélevé 3 jours avant l'ECUN, les autres après l'ECUN Témoins: 10 prématurés appariés pour l'AG et le moment de survenue de l'ECUN. Recueil de selles x 1/semaine	1. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 2. Séquençage de clones aléatoires et comparaison avec des bibliothèques en ligne pour trouver l'espèce la plus proche	La richesse absolue était plus faible chez les nourrissons du groupe ECUN ($12,8 \pm 7,3$ vs $25,2 \pm 9,8$, $p < 0,05$). Les indices de diversité de Shannon étaient significativement plus faibles pour les patients ECUN ($1,13$ vs. $1,88$, $p = 0,035$) par RFLP et par bibliothèques de clones ($1,19 \pm 0,62$ vs. $1,99 \pm 0,55$, $p = 0,005$).	Les échantillons de selles des patients atteints d'ECUN se séparaient des témoins par l'analyse des composantes principales.	Des échantillons de selles provenant de patients atteints d'ECUN ont montré une abondance d'espèces de la classe Gammaprotéobactéries et une diminution chez d'autres espèces bactériennes. Les nourrissons témoins avaient quatre phyla : Protéobactéries, Firmicutes, Bactéroïdes et Fusobactéries. Les nourrissons ECUN n'avaient que 2 phyla : Protéobactéries et Firmicutes.
Mshvildadze 2010 [111]	Lieu: Gainesville, Florida, USA, Monocentrique Période: pas clair	Cas: 4 prématurés avec ECUN stade II et III et 2 enfants avec des signes d'inflammation généralisée. AG 23-32 SA. Témoins: 6 enfants appariés pour l'AG, le poids de naissance et le jour de vie du début de la collection Recueil des selles x 1/semaine	1. Amplification de l'ARN 16S et 454 pyroséquençage 2. profil DGGE des échantillons de selles	Pas de comparaison de diversité entre les cas et les témoins	Les cas et les témoins n'ont pas été regroupés en groupes distincts à l'aide d'une analyse pondérée de l'UniFrac et d'une analyse des composantes principales.	Au niveau du genre, une plus grande abondance d' <i>Enterococcus</i> a été observée dans des cas et des séquences de type <i>Citrobacter</i> seulement dans 3 des 4 cas de NEC. <i>Klebsiella</i> et des OTU ayant une correspondance étroite avec <i>Enterobacteriaceae</i> étaient plus souvent associés aux témoins.

Mai 2011 [112]	Lieu: 3 hôpitaux affiliés à l'Université de Floride, USA. Période: pas clair	Cas: 9 prématurés avec ECUN stade II et III. AG 23-30 SA, Poids de Naissance 570-1269 g. Recueil de selles X 1/semaine, les échantillons collectés 1 semaine avant le diagnostic d'ECUN et 3 jours après ont été analysés. Témoins: 9 enfants appariés pour l'AG, le poids de naissance, le lieu et la date de l'accouchement, le type prédominant d'alimentation (allaitement maternel vs lait artificiel). Les échantillons de selles des témoins émises au même jour de vie que le jour de vie de l'ECUN pour les cas ont été analysés	1. Amplification de l'ARN 16S et 454 pyroséquençage 2. Analyse DGGE de la région V6-V8 utilisé pour les contrôles de qualité initiale initiaux.	Les profils de diversité basés sur l'index de Chao-1 étaient similaires dans les cas et les témoins	Les échantillons ECUN et les échantillons témoins ont été regroupés séparément une semaine avant le diagnostic d' ECUN à l'aide d'une analyse non pondérée UniFrac.	Les profils microbiens étaient différents une semaine avant le diagnostic d'ECUN entre les cas et les témoins, mais pas dans les 72 heures suivant le diagnostic. Une augmentation de 34 % des protéobactéries et une diminution de 32 % des firmicutes ont été observées dans les cas d'ECUN entre une semaine et 72 heures du diagnostic d'ECUN. Des OTU bactériennes uniques appartenant à la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> ont été détectées plus fréquemment dans les cas.
Smith 2012 [113]	Lieu: Copenhague, Danemark. Monocentrique Période: Septembre 2006 à Janvier 2009.	Cas: 21 prématurés avec ECUN de stade II et III. AG médian 183 (intervalle 166-201) jours. Les échantillons de selles ont été obtenus entre J0 et J5, J10 et J30. Témoins: 142 témoins, AG médian 191 (intervalle 161-209) jours. Les échantillons pour les témoins ont été recueillis au même jour de vie que pour les ECUN	1. Cultures Conventionnelles 2.PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)	Pas détaillé	Les profils PCR-DGGE ne faisaient pas de distinction entre les cas et les témoins.	Les espèces à Gram positif dominaient les cultures fécales dans le groupe ECUN. Le groupe témoin avait une flore mixte d'espèces Gram positives et Gram négatives.

Stewart 2012 [114]	Lieu: Newcastle, Royaume-Uni. Monocentrique Période: pas clair	38 enfants prématurés, médiane AG 27 SA (23-31 SA) et PN 895 g (520-1850 g) ont eu des prélèvements de selles. Seulement 27 enfants ont eu une analyse par PCR-DGGE. 8 enfants ont présentés une ECUN de stade II ou III	1. Cultures conventionnelles 2. PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) utilisant des amorces ciblant la région V3 de l'ARN 16S	Pas détaillé	Le profil DGGE a montré des différences significatives chez les nourrissons ECUN par rapport aux témoins.	Les cultures ont montré que les nourrissons qui ont développé une ECUN étaient plus susceptibles d'être colonisés par des Staphylocoques à coagulase négative (45 vs 30 %) et moins d' <i>Enterococcus faecalis</i> (31 vs 57 %) que les témoins.
Normann 2013 [115]	Lieu: Uppsala, Suède. Monocentrique Période: Juin 2009 à Juin 2010.	Cas: 10 nouveau-nés prématurés avec stade II et III d'ECUN. médiane AG 23 (de 22 à 25 SA) et PN 582 g (487-965) g. Témoins: 10 témoins appariés par le sexe, l'AG et le mode d'accouchement. Médiane d'AG 23 SA (de 22 à 25 SA) et PN 570 g (440-892) g. Les échantillons de fécès ont été obtenus de manière hebdomadaire pendant 7 semaines ou jusqu'au diagnostic d'ECUN.	Amplification de l'ARN 16S utilisant des amorces ciblant la région V3-V4 et 454 pyroséquençage	L'indice de diversité de Shannon n'a révélé aucune différence entre les cas et les témoins.	Aucune différence significative dans les communautés microbiennes n'a été détectée entre les cas et les témoins.	Une abondance relative élevée de <i>Bacillales</i> et d' <i>Enterobacteriaceae</i> a été détectée aux premiers moments d'ECUN (non statistiquement significative). Les témoins présentaient un microbiote dominé par <i>Enterococcus</i> .

Torraza 2013 [116]	Lieu: 3 hôpitaux affiliés à l'Université de Floride, USA. Période: pas clair.	Cas: 18 prématurés avec stade II et III d'ECUN. AG 23-30 SA, PN 570-1269 g. Les échantillons ont été obtenus depuis la naissance, une fois par semaine et jusqu'à la sortie. Les échantillons obtenus 1 à 2 semaines avant le diagnostic d'ECUN et proche du diagnostic ont été analysés. Témoins: 35 témoins, 2 témoins pour chaque cas d'ECUN (excepté pour un) appariés à l'AG, PN, date de naissance. Les échantillons émis à des jours de vie équivalent aux cas ont été analysés.	1. Amplification de l'ARN 16S et 454 pyroséquençage 2. profil DGGE des échantillons de selles	L'indice de diversité Chao-1 n'était pas différent entre les cas et les témoins, 2 semaines avant, 1 semaine avant ou pendant la semaine du diagnostic de l'ECUN.	Les analyses UniFrac pour la diversité bêta ont montré un regroupement distinct des cas et des témoins 2 semaines avant le diagnostic d'ECUN et non plus tard.	Chez les prématurés atteints d'ECUN, on a observé une proportion plus élevée de protéobactéries 2 semaines avant le diagnostic et d'actinobactéries 1 semaine avant le diagnostic, ainsi qu'une diminution du nombre de bifidobactéries et de bacteroidetes par rapport aux témoins. Dans les premiers échantillons de selles, la présence d'une nouvelle séquence la plus proche de <i>K. pneumoniae</i> a été fortement associée au développement d'ECUN.
Morrow 2013 [104, 116]	Lieu: 2 unités de néonatalogie de niveaux III à Cincinnati, OH, USA. Période: Oct 2009 à Août 2010.	Cas: 11 prématurés avec stade II et III d'ECUN. AG 25.5 (1.8) SA et PN 791 g (212) en médiane (SD). Témoins: 21 témoins, AG 25.9 (1.9) SA et PN 839 (187) en médiane (SD). Le microbiome fécal des enfants a été analysé dans 2 périodes (J4 à J9 de vie) et J10-J16 de vie) avec 2 échantillons de selles pour chaque période	1. Amplification de l'ARN16S et 454 pyroséquençage ciblant les régions V3-V5. 2. Le métabolome urinaire a été analysés par analyse NMR (nuclear magnetic resonance).	Dans les échantillons obtenus entre les jours 4 à 9, l'indice de diversité Chao-1 et l'indice de diversité de Simpson ont montré une tendance inférieure (non statistiquement significative) par rapport aux témoins. La tendance à la baisse s'est poursuivie après le jour 9 dans les cas.	Les analyses UniFrac ont révélé 2 groupes ECUN distincts des témoins. Pendant les jours 10 à 16, un groupe ECUN s'est dispersé, mais l'autre groupe était toujours ensemble. Un rapport élevé entre l'alanine urinaire et l'histidine a été associé à une dysbiose microbienne intestinale et à une ECUN (valeur prédictive de 78 %).	Deux types de dysbiose intestinale ont été trouvés associés à l'ECUN. Dans le premier type, dans 4 cas d'ECUN précoce (apparition 7-21 jours), dans les jours 4-9, le microbiote fécal était dominé par les firmicutes. Dans les 7 autres cas d'ECUN tardive (19-39 jours), dans les 10-16 jours, le microbiote des selles était dominé par les protéobactéries, en particulier les <i>Enterobacteriaceae</i> . Tous les cas d'ECUN manquaient de <i>Propionibacterium</i> .

Zhou 2015 [117]	Lieu: Boston, Massachusetts, USA Monocentrique Période: pas clair	Cas: 12 prématurés avec stade II et III d'ECUN. AG 27.8 (24-31) SA et PN 1048 g (940-1860) en médiane (intervalle). Témoins: 26 témoins, AG 27.9 (24-31) SA et PN 1092 (520-1800) en médiane (intervalle). Le microbiome fécal des enfants a été analysé avec en moyenne 7 échantillons par patient et avec un intervalle médian d'échantillonnage de 7 jours.	Amplification de l'ARN16S et 454 pyroséquençage ciblant les régions V3-V5.	L'indice de diversité de Shannon des échantillons de matières fécales provenant de cas d'ECUN était inférieur à celui des témoins.	Les courbes d'échelle multidimensionnelle non paramétrique (NMDS) n'ont pas révélé de différences claires entre les cas et les témoins au début de la maladie. Dans le sous-groupe d'ECUN d'apparition précoce (≤ 22 jours de vie), ce groupe s'est séparé des témoins à la deuxième semaine de vie au niveau du genre. Aucune séparation n'a été notée dans les cas d'ECUN tardive (> 22 jours de vie).	La progression microbienne différait dans les groupes ECUN à début précoce et à début tardif. Au début de l'ECUN, près de l'apparition de la maladie, les abondances de <i>Clostridium sensu stricto</i> de la classe des <i>Clostridia</i> étaient significativement plus élevées que chez les témoins. Dans l'ECUN tardive, <i>Escherichia/Shigella</i> parmi les gammaprotéobactéries, a montré une tendance à la hausse, six jours avant l'apparition de la maladie. <i>Cronobacter</i> dans les gammaproteobactéries était également significativement plus élevé dans les cas d'ECUN à apparition tardive que les témoins 1-3 jours avant l'apparition de l'ECUN.
------------------------	---	---	--	--	---	---

<p>McMurtry 2015 [118]</p>	<p>Lieu: Louisiane et New Orleans, USA. Multi-centrique Période: 2007-2011</p>	<p>Cas: 21 prématurés avec ECUN de stade II et III. AG 27.8 (24-31) SA et PN 1048 g (940-1860) en moyenne (intervalle). L'ECUN a été classifiée comme modérée (évolution favorable après 10-14 jours de repos digestif, n=8), sévère (prise en charge prolongée > 14 jours ou intervention chirurgicale, n=7) et mortelle (n=6). Témoins: 74 témoins (appariement à l'âge, l'AG et le PN), AG 27.9 (24-31) SA et PN 1092 (520-1800) en médiane (intervalle). Tous les enfants < 1500 g et/ou < 34 SA. Le microbiote fécal a été analysé avec un seul échantillon pour chaque enfant. pour les cas d'ECUN, les selles été collectées 1 à 5 jours avant la survenue de l'ECUN.</p>	<p>1. Amplification de l'ARN16S et 454 pyroséquençage ciblant les régions V3-V5.</p>	<p>La richesse Chao-1 et les indices de diversité de Shannon étaient significativement plus faibles dans les cas de NEC par rapport aux témoins et dans les cas de NEC, ils augmentaient entre les stades mortel et modéré</p>	<p>Les analyses de l'UniFrac pour la diversité bêta n'ont révélé aucun regroupement distinct des cas et des témoins</p>	<p>L'abondance des bactéries dans la classe <i>Actinobacteria</i> et la classe <i>Clostridia</i> était significativement plus faible dans les spécimens ECUN que dans les témoins. Aucune différence dans les bacilles ou les gammaprotéobactéries n'a été notée. La prévalence et l'abondance relative de <i>Clostridia</i> ainsi que les indices de diversité de Chao1 et de Shannon ont diminué au fur et à mesure que la gravité de l'ECUN augmentait.</p>
---	--	---	--	--	---	--

Sim 2015 [119]	Lieu: Londres, Royaume-Uni Multicentrique Période: Jan 2010 – Déc 2012	Cas: 12 prématurés avec stade II et III d'ECUN. AG 27 (Interquartile 25+5 – 28+3) SA et PN 845.4 g (IQ 685-898.8) en médiane (IQ). L'ECUN a été classifiée stades I, II and III de la classification de Bell. Témoins: 36 témoins (si possible appariés par le mode d'accouchement, le lieu d'admission et l'utilisation d'antibiothérapie), AG 27+3 (IQ 25+3-29) SA and PN 1005.9 (IQ) (755-1239.5) en médiane (IQ). Le microbiome fécal a été analysé avec un échantillon par semaine pour les témoins; pour les cas d'ECUN, 8 selles collectées 2 semaines avant la maladie ont été analysées.	1. Amplification de l'ARN16S et 454 pyroséquençage ciblant les régions V3-V5.	non détaillé	non détaillé	Les cas d'ECUN étaient associés à une abondance de <i>Clostridium</i> ou de <i>Klebsiella</i> dans les jours précédant le diagnostic.
-----------------------	--	---	---	--------------	--------------	---

Warner 2016 [89]	Lieu: St Louis et Université de Oklahoma, USA Multicentrique Période : Juillet 2009- Mai 2013	Cas: 46 Nourrissons avec une ECUN stade II et III et un PN < 1500g (VLBW-Very Low Birth Weight) Environ 1000 échantillons pré-ECUN récupérés Témoins; appariement à l'AG, PN, âge de vie Environ 2600 échantillons. 120 enfants VLBW inclus dans chaque cohorte	1. Amplification de l'ARN16S et 454 pyroséquençage ciblant les régions V3-V5.	L'âge gestationnel à la naissance, la voie d'accouchement et le poids à la naissance selon l'indice de diversité de Shannon étaient différents chez les cas par rapport aux témoins. La différence est liée à l'augmentation de la diversité (maturation de la population) dans les témoins par rapport à la diversité constante dans les cas.	non détaillé	Une abondance relative de gammaprotéobactéries (bacilles facultatifs Gram-négatifs) et une rareté relative de bactéries anaérobies strictes (en particulier des <i>Negativicutes</i>) précèdent l'ECUN chez les nourrissons VLBW.
Stewart 2016 [107]	Lieu : Période	Cas : 7 prématurés de < 32 SA avec une ECUN de stade II et III Témoins : 28 avec appariement à AG, PN, voie d'accouchement 75 échantillons	1. Amplification de l'ARN16S avec MiSeq 2. Profil métabolomique par UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry)	L'indice de diversité de Shannon était plus bas chez les cas par rapport aux témoins. Dans le temps, l'indice de Shannon augmentait chez les nourrissons témoins, mais il diminuait chez les nourrissons du groupe ECUN.	Non détaillé	Aucune signature microbienne spécifique n'a été décelée avant le diagnostic d'ECUN, par rapport aux témoins appariés. L'analyse métabolomique a montré les cinq métabolites les plus discriminant dans les échantillons d'ECUN au moment du diagnostic était significativement plus élevé que dans les échantillons témoins (2 métabolites provenant de la biosynthèse de l'hormone stéroïde C21 et des voies métaboliques linoléiques, 2 métabolites provenant de la voie métabolique du linoléate, et d'un métabolite de la voie du métabolisme des leucotriènes et la formation de prostaglandines.

Roze 2017 [120]	Lieu: 62 services de néonatalogie en France Multicentrique Période : 2011	Cas : 14 ECUN stade II et III AG <32 SA Témoins : 57 appariés à l'AG et au risque de développer une ECUN (troubles hémodynamiques, absence de sédation, transit irrégulier pendant la première semaine de vie)	1. Cultures conventionnelles 2. 454 pyroséquençage ciblant les régions V3-V5.	Non détaillé	Non détaillé	Par les méthodes de culture, au niveau du genre, <i>Clostridium</i> étaient associés à l'ECUN. Au niveau de l'espèce, <i>C. neonatale</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> étaient associés à l'ECUN. Par l'analyse de l'ARNs 16S, l'abondance des <i>Clostridium neonatale</i> et <i>butyricum</i> étaient augmentés chez les nouveau-nés avec une ECUN et <i>Klebsiella</i> et <i>Citrobacter</i> étaient moins abondants chez les cas d'ECUN
Dobler 2017 [121]	Lieu: Porto Alegre, Brésil Monocentrique Période non détaillée	Cas : 11 ECUN stade II et III < 32 SA Témoins : 29 (appariement AG, PN, mode d'accouchement, utilisation d'antibiotique)	Amplification de la région V4 de l'ARN 16S, et séquençage par le PGM Ion Torrent	La diversité microbienne calculée par l'index de Shannon est moindre dans les 3 premières semaines de vie chez les cas d'ECUN par rapport aux témoins même si la différence entre les traitements n'a été observée qu'à partir de la 3 ^{ème} semaine de vie	Non détaillé	Une abondance relative de gammaproteobactéries comme <i>Citrobacter koseri</i> et/ou <i>Klebsiella pneumoniae</i> ainsi qu'une diminution de l'abondance de <i>Lactobacillus</i> était associée au risque de développer une ECUN chez les nouveau-nés prématurés
Wandro 2018 [105]	Lieu : Orange, Californie, USA Monocentrique Période : 2011-2014	Cas : 3 cas d'ECUN stade II et III <32 SA, < 1000g Témoins : 21 enfants appariés à l'AG et au PN	1. Amplification de l'ARNs 16S, région non précisée, par qPCR 2. Analyse métabomique des selles par GCMS (Gas Chromatography-Mass spectrometry)	La diversité microbienne calculée par l'index de Shannon augmentait mais de manière non significative en fonction de l'âge des enfants. Il n'y avait pas de différence entre les cas et les témoins. L'utilisation d'antibiotique diminuait la diversité microbienne des enfants traités.	Les analyses UniFrac en composantes principales montraient une variance intergroupe très importante	L'analyse n'a pas mis en évidence de différence entre les cas et les témoins en termes de profils microbiens ou de profils métabolomiques.

Itani 2019 [122]	Lieu : 3 hôpitaux au Liban Muticentrique Période : Jan 2013-Mars 2015	Cas : 11 prématurés ECUN stade II et III < 36SA Témoins : 11 prématurés < 36 SA	1. Culture conventionnelle 2. Amplification de la région V3-V4 de l'ARN16S	L'index de Chao1 était plus élevé chez les témoins que chez les cas	L'analyse UniFrac a montré une séparation significative entre les cas et les témoins	Les enfants avec un ECUN étaient plus souvent colonisés par <i>Staphylococcaceae</i> avant et pendant l'ECUN. Il n'y avait pas de différence de colonisation par les <i>Enterobacteriaceae</i> entre les cas et les témoins.
Feng 2019 [123]	Lieu : Shenzhen, China Monocentrique Période : Mai à février 2018	Cas : 16 patients ECUN stade II et III > 28SA Témoins : 16 patients appariés à l'AG, sexe, PN, mode d'accouchement, alimentation	1. Amplification de la région V3-V4 de l'ARN16S et séquençage MiSeq 2. Analyse fonctionnelle par PICRUSt	Pas de différence de diversité microbienne selon l'index Chao1	L'analyse Unifrac n'a pas permis de séparer les cas des témoins	Il n'y avait de différence de colonisation par les proteobactéries ou les Firmicutes. Avec l'analyse LEfSE, les <i>Propionibacterium</i> étaient plus abondants dans le groupe ECUN et les lactobacillus, <i>Phascolarctobacterium</i> et <i>Streptococcus salivarius</i> étaient plus abondants dans le groupe des témoins

E. Approche préventive de l'ECUN

Les approches préventives de l'ECUN se déploient autour de différents axes : modulation du microbiote intestinal par supplémentation en pré- et/ou pro-biotiques, axe nutritionnel ou adjonction de molécules aux propriétés anti-inflammatoires.

1. Modulation du microbiote

Plusieurs essais cliniques, en particulier au cours de la dernière décennie, ont permis d'établir l'utilité d'agents conçus pour manipuler ces voies clés dans l'espoir de prévenir l'ECUN. Probiotiques, lait maternel, protocole d'alimentation standardisée et la lactoferrine bovine ont démontré leur capacité à réduire le risque d'ECUN dans des méta-analyses [124, 125]. Les probiotiques, en particulier, ont suscité beaucoup d'attention, mais aussi des controverses en raison de divers rapports sur leur efficacité et leur sécurité. Les probiotiques sont définis par l'Organisation mondiale de la santé comme des "micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, peuvent conférer un bénéfice pour la santé de l'hôte"[126] ». Bien que les essais cliniques comparatifs et randomisés aient donné des résultats contradictoires, plusieurs méta-analyses ont démontré de façon constante un effet bénéfique statistiquement significatif des probiotiques, notamment l'association de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus*, dans la prévention de l'ECUN et la réduction de la mortalité néonatale, toutes causes confondues [124, 127-132]. Cela a conduit certains experts à préconiser l'introduction systématique des probiotiques dans toutes les unités de néonatalogie [133]. Cependant, il reste encore beaucoup de questions sans réponse, y compris celle de l'agent probiotique optimal, la dose et la durée de la supplémentation, l'impact de biais potentiels de l'efficacité du traitement, comme l'allaitement maternel, ainsi que des effets néfastes à court et à long terme [83, 134].

2. Approche nutritionnelle

Cette approche a été développée suite à la constatation que l'incidence de l'ECUN était diminuée lorsque le nouveau-né recevait du lait de sa propre mère [135]. D'autre part, dans l'étude multicentrique française EPIFLORE, des vitesses de progression lentes à intermédiaires pour les stratégies d'alimentation entérale (volume d'alimentation entérale reçu à 7 jours de vie) étaient associées à un risque plus élevé d'ECUN comparativement à la stratégie plus rapide ; après ajustement pour les facteurs de risque individuels et les politiques d'allaitement direct (nombre de nouveau-nés prématurés dans chaque unité partiellement alimentés au sein) [120]. Les unités de néonatalogie avec une politique d'allaitement direct

moins favorable ou classée « intermédiaire » étaient associées à un risque plus élevé d'ECUN comparativement des unités de néonatalogie ayant une politique d'allaitement direct plus favorable ; après ajustement pour les facteurs de risque individuels et la progression des stratégies d'alimentation [120].

Selon les recommandations de 2018 de la Haute Autorité de Santé, concernant la nutrition parentérale en néonatalogie, il est recommandé d'arrêter la nutrition parentérale dès qu'un passage à une nutrition entérale suffisante est possible afin de minimiser le risque de sepsis secondaire associé au nombre de jours d'utilisation d'un cathéter central. Afin d'obtenir plus rapidement une nutrition entérale suffisante, il est recommandé :

- de débiter précocement la nutrition entérale, idéalement dans les 24 heures après la naissance (à J0) (grade B) ;
- d'augmenter la nutrition entérale rapidement, jusqu'à 30 à 40 ml/kg chaque jour chez les nouveau-nés stables de poids de naissance > 1 000 g (grade B) ;
- de suivre un protocole de nutrition entérale (grade C). Du fait du risque de sepsis associé à la durée d'utilisation du cathéter, il est recommandé d'arrêter la nutrition parentérale lorsque la nutrition entérale est bien tolérée et atteint 100-120 ml/kg/j (accord d'experts) (https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-06/argu_np_neonat_2018-06-28_11-18-23_280.pdf).

Le lait maternel renforce la barrière intestinale. Il permet la maturation du système immunitaire digestive grâce à des facteurs bioactifs (facteurs de croissances, oligopolysaccharides, lysozymes, cytokines, IgA sécrétoires, macrophages, lymphocytes) [136]. Les oligosaccharides spécifiques HMO contenus dans le lait maternel permettent de rétablir un microbiote protecteur contre la survenue de l'ECUN [137]. Le lait de lactarium a donc été proposé comme alternative lorsque la mère n'allait pas, afin de réduire la survenue d'ECUN dans les services de néonatalogie français.

D'autres suppléments avec des acides aminés, de la lactoferrine bovine ou des prébiotiques ont également été proposés en prévention de l'ECUN [138]

3. Utilisation de molécules anti-inflammatoires

L'implication de TLR4 dans le développement de l'ECUN ouvre de nouvelles voies de recherche thérapeutiques [139]. Le liquide amniotique et les cellules souches sont aussi de nouvelles stratégies de prévention dans le développement de l'ECUN [138]. Dans un modèle

néonatal chez le rat, l'administration intra-péritonéale de cellules souches du liquide amniotique diminuait le risque de survenue de l'ECUN et la gravité de l'ECUN, en augmentant la prolifération d'entérocytes et en diminuant l'apoptose par un mécanisme dépendant de la cyclooxygénase 2 [140]. Dans ce modèle chez le rat, l'ECUN a été induite à l'aide d'un protocole bien établi basé sur l'alimentation par gavage avec formule hyperosmolaire, hypoxie et administration orale de LPS [141]. Dans une autre étude chez le cochon, l'administration de liquide amniotique par voie entérale aboutissait à des différences dans la composition du microbiote intestinal et à une diminution de la perméabilité intestinale comparé à un groupe contrôle [142].

IV. HYPOTHESES du travail de Thèse

D'un point de vue clinique et microbiologique, les études sur l'ECUN s'intéressent seulement aux stades II et III. Les suspicions d'ECUN, identifiées par le stade I (léthargie, bradycardies, instabilité thermique associées à des résidus gastriques bilieux, des vomissements, une distension abdominale et parfois à des rectorragies avec une imagerie radiologique abdominale normale ou montrant une simple dilatation) ne sont pas étudiées. Cependant, ces enfants, bien connus des cliniciens et décrits comme « entéropathes » (stade I de l'ECUN) ont des durées de nutrition parentérale et des durées d'hospitalisation prolongées avec un risque d'évolution vers un stade plus sévère. L'analyse des caractéristiques cliniques des enfants et de leur mère associées à celles du microbiote et métabolome intestinal de ces enfants pourraient fournir des informations clefs quant au développement et à l'évolution de cette pathologie, et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives pour améliorer la prise en charge de ces nouveau-nés vulnérables.

L'absence de connaissance de déterminants spécifiques qui déclenchent l'entéropathie du nouveau-né participe à l'absence de consensus dans les stratégies de prévention, notamment la prise de pré/pro-biotiques pendant la grossesse.

C'est pour cela que nous nous sommes focalisés sur le premier stade de l'ECUN afin de tenter d'identifier un lien précoce entre une colonisation néonatale particulière et la survenue de cette pathologie. La physiopathologie de l'ECUN étant différente chez le nouveau-né à terme, notre étude s'est centrée sur le nouveau-né prématuré.

V. Matériel et méthodes

A. Description de l'étude

Nous avons réalisé une étude de cohorte prospective, au sein de laquelle nous avons niché une étude cas-témoin. Notre étude était mono-centrique. Les services de Réanimation néonatale et de néonatalogie du CHU de Toulouse ont approuvé cette étude. Cette étude a été validée par le Comité de Protections des Personnes (CPP). Après avoir dispensé aux familles une information orale et écrite, le consentement oral des parents a été obtenu avant l'inclusion. Nous avons inclus tous les nouveau-nés âgés de moins de 34 semaines d'aménorrhée et qui ont été hospitalisés en réanimation néonatale ou dans le service de néonatalogie du CHU de Toulouse. Nous avons exclu les nourrissons présentant une cardiopathie congénitale complexe ou une perforation intestinale spontanée sans preuve radiologique d'ECUN ou septicémique à J0 de vie.

Les critères d'inclusion des cas étaient :

- Nouveau-né d'âge gestationnel ≤ 34 SA,
- Diagnostic d'ECUN suspectée (Stade I),
- Recueil oral de la non opposition parentale / du représentant légal.

Consécutivement à l'inclusion de chaque cas, une recherche de 2 témoins a été réalisée en parallèle, selon les critères d'appariement suivants, par ordre de priorité :

- âge gestationnel (+/- 1SA, en priorisant le même âge)
- poids
- antibiothérapie néonatale
- modalité d'accouchement
- antibiothérapie maternelle.

Les critères d'inclusion des témoins :

- Nouveau-né d'âge gestationnel de ≤ 34 SA,
- Hospitalisation dans le service de provenance du cas apparié,
- Absence de complication digestive
- Respect de l'appariement selon l'ordre de priorité défini pour les critères établis,
- Recueil oral de la non opposition parentale / du représentant légal.

Les données cliniques et biologiques de la mère et de l'enfant ont été recueillies de manière prospective et sont détaillées ci-dessous:

Concernant la mère

- Age
- Parité
- Exposition au tabac, autres toxiques, alcool
- Habitat (milieu rural/milieu urbain)
- Profession
- Index de Masse Corporelle
- Infection pendant la grossesse
- Exposition aux antibiotiques pendant la grossesse et type d'antibiothérapie
- Corticothérapie anténatale
- Antibiothérapie *per partum* et type d'antibiothérapie
- Durée de rupture de la poche des eaux
- taux de CRP
- Documentation bactériologique

Concernant l'enfant:

- Age gestationnel
- Poids, taille et Périmètre crânien de naissance
- Score d'adaptation à la vie extra-utérine (score d'Apgar) à 1 minute et 5 minutes
- Ventilation à la naissance (intubation, Néopuff, CPAP)
- Durée et type de ventilation
- Durée de l'oxygénothérapie
- pH au cordon
- Lactates au cordon
- Pression artérielle moyenne à l'entrée dans le service
- Température corporelle (°C) à l'entrée dans le service
- Glycémie capillaire à l'entrée dans le service
- Exposition aux inotropes durant l'hospitalisation
- Divers bilans sanguins prélevés au cours de l'hospitalisation (NFS, ionogramme sanguin, bilan hépatique, CRP)
- Données microbiologiques (hémocultures, urines, prélèvement virologiques, etc...)

- Transfusions sanguines
- Autres thérapeutiques (supplémentation ferrique, AINS, ...)
- Type d'alimentation, volume d'alimentation entérale à J7 de vie, enrichissement du lait

B. Procédures

Les selles produites par ces nourrissons ont été recueillies par les infirmières de chaque service dans la première semaine de vie puis une fois par semaine jusqu'à la fin de l'hospitalisation. Les selles étaient recueillies à l'aide d'un écouvillon stérile puis directement stockées dans un tube Eppendorf de 5 ml que j'avais préalablement préparé dans notre laboratoire de recherche. Ces tubes contenaient un milieu de culture Lysogeny Broth avec 20% de glycérol et ont été réfrigérés à 4°C. Ces tubes étaient ensuite acheminés au laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse pour congélation à -80°C selon la procédure habituelle mais accompagnés d'un bon spécifique (**Fig. 7**). Ce bon a été préparé avec l'aide des bactériologistes, et permettait le repérage de ces échantillons par les laborantins (**Fig. 8**).

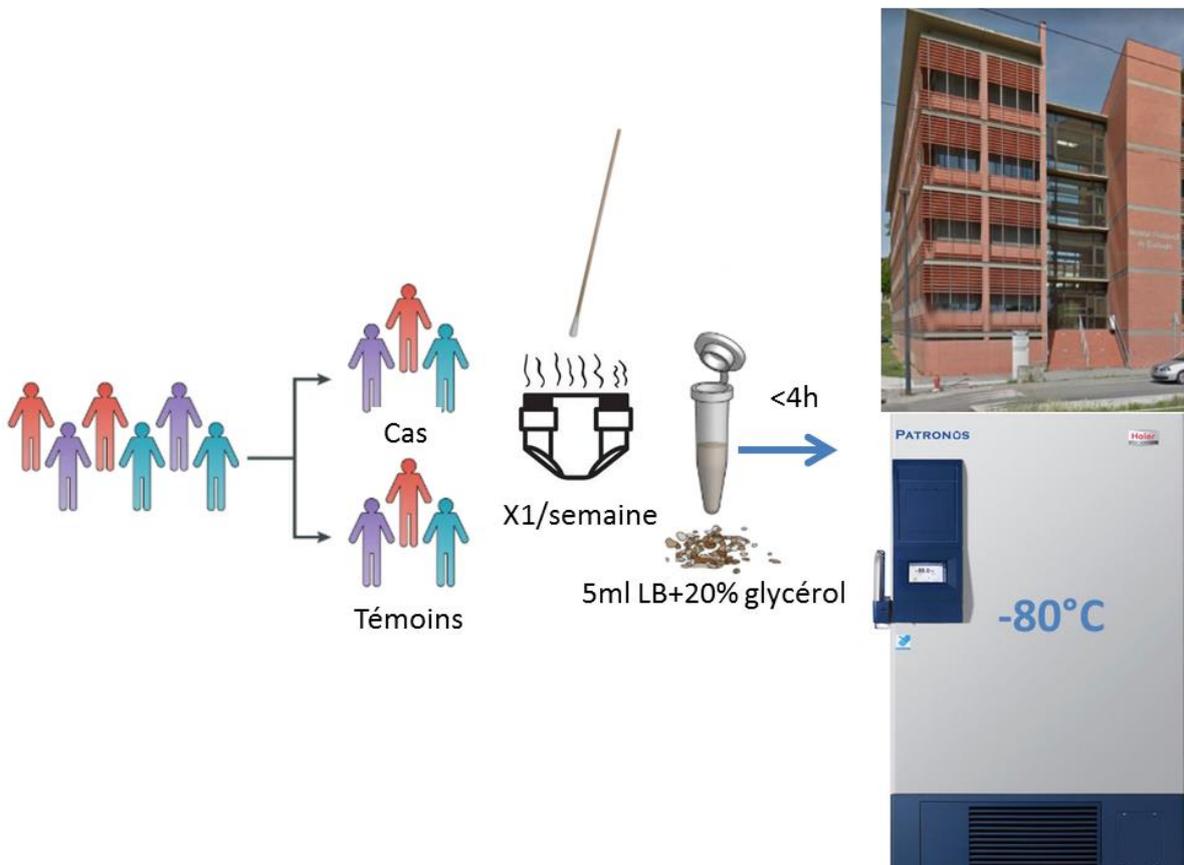


Figure 7 : Protocole de recueil des échantillons et de leur stockage

(réservé labo)

Etiquette
Patient

Etiquette
Service demandeur
UA

Protocole PrémicEs

Entéropathie du nouveau-né prématuré : approche clinique, métagénomique et métabolomique

Contacts Etude : Dr Camille BREHIN ☎ 76053

Contact Laboratoire : D. DUBOIS

NéoNat UA 1106-1129 Dr Isabelle GLORIEUX ☎ 71363

Réanimation néonatale UA1107 Dr MO. Marcoux ☎ 78756

Date de prélèvement			Heure de prélèvement		
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Jour		Mois	Année		Minute
Prescripteur (Nom, Prénom, Fonction)			Préleveur (Nom, Prénom, Fonction)		
Ecrire en majuscules			Ecrire en majuscules		

Selles pour congélation à -80°C en bactériologie



Recueil de selles dans tube stérile de 5ml
pré-rempli avec LB +20% glycérol
Etiquette patient sur le tube + date de
prélèvement

Au laboratoire : congélation à -80°C dans la boîte PrémicEs

Renseignements cliniques :

--

Figure 8: Bon de transport accompagnant les échantillons et destiné au laboratoire de bactériologie recevant ces échantillons

1. Extraction d'ADN

Ma contribution au niveau expérimental a été l'extraction d'ADN de tous les échantillons sélectionnés. Nous avons analysé l'ADN extrait des selles congelées des nouveau-nés inclus. L'ADN bactérien a été extrait d'échantillons de selles de nourrissons en utilisant le QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD). Les échantillons ont été décongelés dans la glace puis centrifugés pendant 30 minutes et 0,6 g de selles ont été transférés dans un tube à billes, et 1,4 ml de tampon ASL a été ajouté. Le battage a été effectué pendant 3 minutes sur l'homogénéisateur. La suspension a ensuite été chauffée à 70°C pendant 5 minutes, et les instructions du fabricant ont été suivies.

Nous avons été rapidement confrontés à une quantité d'ADN très faible dans certains échantillons. Pour remédier à ce problème, nous avons centrifugé les selles dans des tubes Eppendorf de 50ml à 20°C pendant 30 minutes, ce qui a permis de récupérer suffisamment de selles et d'améliorer la quantité d'ADN présent dans les échantillons.

2. L'analyse du gène de l'ARNr 16S

Les régions de l'ADN bactérien 16S analysées par MiSeq sont les V3-V4 avec les amorces 357wf-785R par le laboratoire RTLGenomics (<http://rtlgenomics.com/>, Texas, USA), comme indiqué auparavant [143]. En moyenne, 68,669 séquences ont été générées par échantillon. La description complète des filtres bio-informatiques appliqués est disponible au lien http://www.rtlgenomics.com/docs/Data_Analysis_Methodology.pdf. Le cladogram dans la Figure 21 et ainsi que les LDA (Linear Discriminant Analysis) scores dans les Figures 12,13,16,17,19,22,24,27,29,31,39-43 ont été générés avec l'application web Huttenhower Galaxy (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/>) avec l'algorithme LefSe (LDA Effect Size). Cet algorithme permet la recherche de biomarqueurs afin d'identifier des caractéristiques génomiques (taxonomique, voie métaboliques, gène) qui définissent des différences entre au moins deux conditions différentes. Il identifie d'abord les caractéristiques qui sont statistiquement différentes entre les conditions testées grâce au test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Le module applique ensuite une analyse discriminante linéaire pour estimer l'importance de l'effet de chaque caractéristique. Cette méthode permet donc de prédire avec robustesse l'appartenance d'une caractéristique génomique à une condition prédéfinie. L'intérêt majeur de LefSE est la visualisation claire des marqueurs découverts sous la forme d'un arbre taxonomique ou phylogénétique (**Fig. 9**).

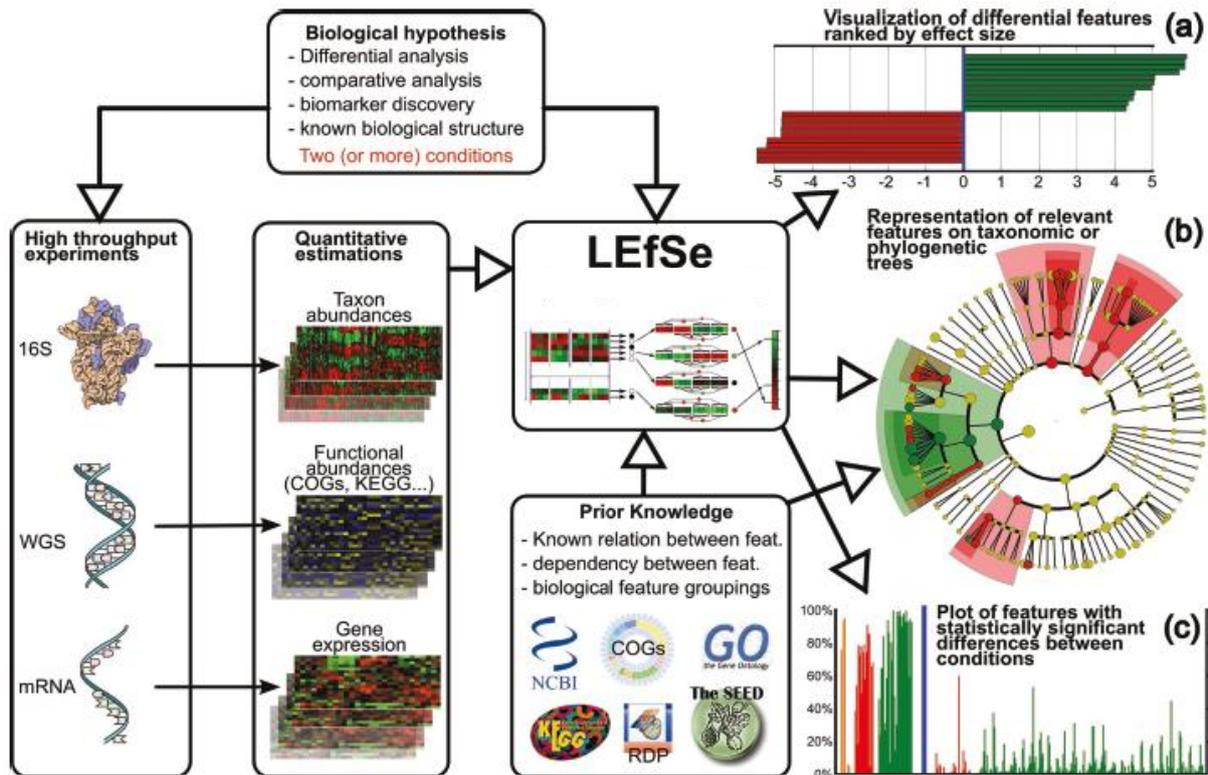


Figure 9 : Analyse LfSe. LfSe exploite un large éventail de données génétiques à haut débit pour trouver des différences biologiquement pertinentes entre au moins deux conditions expérimentales. Les apports de ce système sont les spécifications de l'hypothèse biologique à l'étude (conditions et interconditions), les données de haute dimension obtenues expérimentalement et, facultativement, les connaissances préalables tirées de la littérature ou des bases de données utilisées pour définir les relations connues entre les caractéristiques ou les échantillons. LfSe est un algorithme en trois étapes. (a) LfSe fournit d'abord la liste des caractéristiques différentielles entre les conditions d'intérêt ayant une signification statistique et biologique, en les classant en fonction de l'effet taille. (b) Pour les problèmes de structure hiérarchique connue, qu'elle soit phylogénétique ou fonctionnelle, est fournie une cartographie des différences avec des arbres taxonomiques ou fonctionnels. c) Enfin, le système produit un histogramme visualisant les données brutes à l'intérieur de la structure pour chaque caractéristique pertinente. Bien que LfSe ait été développé principalement pour les données métagénomiques contenant des abondances de taxa ou de gènes, il peut être utilisé pour la découverte de biomarqueurs dans n'importe quel contexte où les connaissances biologiques préalables concernant la structure d'une comparaison sont couplées à des données statistiques dans les caractéristiques génomiques de haute dimension. KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ; WGS, whole genome shotgun [144].

Les index de diversité ont été calculés avec le logiciel Past 3.23 (Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp). Les analyses de la diversité des communautés microbiennes reposent sur des mesures écologiques descriptives, classiquement l'alpha et la bêta-diversité. L'alpha diversité, ou richesse d'un échantillon, est quantifiée directement, par le nombre de taxa (du phylum aux espèces), ou indirectement, par

des index comme le Chao-1 ou l'index de Shannon. L'alpha-diversité est utilisée pour quantifier la perte de diversité, par exemple après une antibiothérapie ou en association avec une pathologie donnée. Cependant, l'alpha diversité est limitée par le fait qu'elle ne permet pas d'identifier les taxa impliqués dans le gain ou la perte de biodiversité.

Les différents indices utilisés pour mesurer l'alpha diversité sont résumés dans le **tableau 4**.

Tableau 7 : Indices de diversité alpha et leurs particularités

Indices de diversité alpha	Particularités
Chao1	Estime le nombre réel d'espèces rares dans l'environnement à partir du nombre d'espèces dans l'échantillon
Shannon	Permet de quantifier l'hétérogénéité de la biodiversité d'un milieu; il est maximal quand les espèces sont nombreuses et que tous les individus sont répartis d'une façon égale entre toutes ces espèces.
Simpson_1-Diversité	Mesure la probabilité que deux individus choisis au hasard dans un échantillon appartiennent à la même espèce
Fisher	Décrit mathématiquement la relation entre le nombre d'espèces et le nombre d'individus dans chaque espèce
Brillouin - Margalef	Cet indice augmente lorsque le nombre d'espèces augmente. Mais, à nombres d'espèces égaux, il prend des valeurs maximales lorsque toutes les probabilités sont égales, c'est-à-dire lorsque toutes les espèces ont la même abondance. Il synthétise donc richesse spécifique et équitabilité. Cet indice est une mesure exacte qui ne souffre pas du biais de la formule de Shannon
Berger-Parker	Correspond à la fréquence relative maximale de l'espèce la plus abondante dans les différents relevés.
Équitabilité (Evenness)	Mesure la régularité de la distribution des espèces
Menhinick	Renseigne sur la diversité des communautés en termes de nombre d'espèces différentes identifiées dans un échantillon en tenant compte de l'abondance totale de toutes les espèces de l'échantillon
Dominance	Calcule la fréquence des espèces. Ils accordent plus d'importance aux espèces les plus fréquentes qu'à la richesse spécifique totale

La bêta-diversité permet de comparer des régions entre elles, elles-mêmes composées de plusieurs échantillons qui caractérisent la région. Elle définit le degré dans lequel les taxa sont communs aux échantillons. La mesure de la bêta-diversité permet donc de répondre à la question suivante « Quel est le degré de similarité entre le microbiote fécal du patient A et le microbiote fécal du patient B ? ». Les analyses de bêta-diversité ont été visualisées par une

analyse en coordonnées principales (PCA). Cette analyse permet d'explorer des jeux de données multidimensionnels constitués de variables quantitatives. Elle a pour but de représenter graphiquement une matrice de ressemblance entre plusieurs individus.

L'analyse fonctionnelle du microbiote intestinal a été effectuée par PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) [145]. Les données générées ont été représentées en analyse en composantes principales (PCA) à l'aide du logiciel STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) [146].

3. Analyse métabolomique

Ma contribution expérimentale a été la préparation des échantillons avant l'analyse métabolomique. Les échantillons de selles ont été décongelés sur de la glace immédiatement avant l'analyse. 100 µl de fèces ont été dilués avec 600 µl d'oxyde de deutérium (D₂O) et centrifugés à 5 000 g pendant 10 minutes avant d'être placés dans des tubes RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) de 5 mm. L'analyse du métabolome (métabolites totaux) des fèces a été effectuée comme décrit précédemment [143]. L'analyse a été effectuée par la technique de spectroscopie RMN (RMN pour Résonance Magnétique Nucléaire) en collaboration avec la plateforme de métabolomique de Toulouse (MetaToul-AXIOM - Plateforme de Métabolomique et de Chimie Analytique en Toxicologie basée sur le site TOXALIM, centre INRA de Toulouse). Les analyses ont été obtenues sur un spectromètre RMN Bruker DRX-600 Avance, fonctionnant à 600,13 MHz pour une fréquence de résonance de ¹H en utilisant une cryosonde de détection inverse de 5 mm, ¹H-¹³C-¹⁵N, fixée à une CryoPlatform (unité de refroidissement du préamplificateur). Les spectres RMN ¹H ont été acquis à 300 K en utilisant la séquence d'impulsions Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) avec présaturation, avec un retard total d'écho de spin (2 nt) de 64 ms pour atténuer les signaux larges des protéines et lipoprotéines. Au total, 128 transitoires ont été recueillis en 32 k points de données à l'aide d'une largeur spectrale de 12 ppm, d'un délai de relaxation de 5 s et d'un temps d'acquisition de 2,28 s. Avant la transformation de Fourier, on a appliqué au FID une fonction d'élargissement exponentiel de 0,3 Hz des lignes. Les spectres de RMN ont été échelonnés et corrigés à la ligne de base, puis les signaux des métabolites ont été intégrés et normalisés à la surface spectrale totale.

Les métabolites associés à la voie métabolique et les métabolites associés au SNP (single nucleotide polymorphism) (**Fig. 33, 34, 36,37, 45**) ont été analysés via MetaboAnalyst 4.0, avec le module Enrichment Analysis [147].

C. Méthodes statistiques

Les différences dans les caractéristiques cliniques des cas et des témoins ont été analysées en effectuant un test exact de Fisher pour les variables qualitatives et un test de Mann-Whitney pour les variables quantitatives, le cas échéant. Les PCAs ont été générées avec le logiciel Past 3.23 indiqué en haut et la p a été corrigée par la méthode de Bonferroni. Pour les histogrammes, une approche par ANOVA bidirectionnelle a été réalisée, suivie d'une procédure de correction type FDR (False Discovery Rate) en utilisant les méthodes de Benjamini, Krieger et Yekutieli.

VI. RESULTATS

A. Comparaison des données cliniques et biologiques

Nous avons inclus 72 nouveau-nés prématurés sur une période de 6 mois. Les premiers patients ont été inclus en juin 2017 et les derniers ont été inclus en novembre 2017. Chaque cas d'entéropathie a ensuite été apparié à 2 patients témoins (**Fig. 10**), comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes.

Aout 2017 à novembre 2017

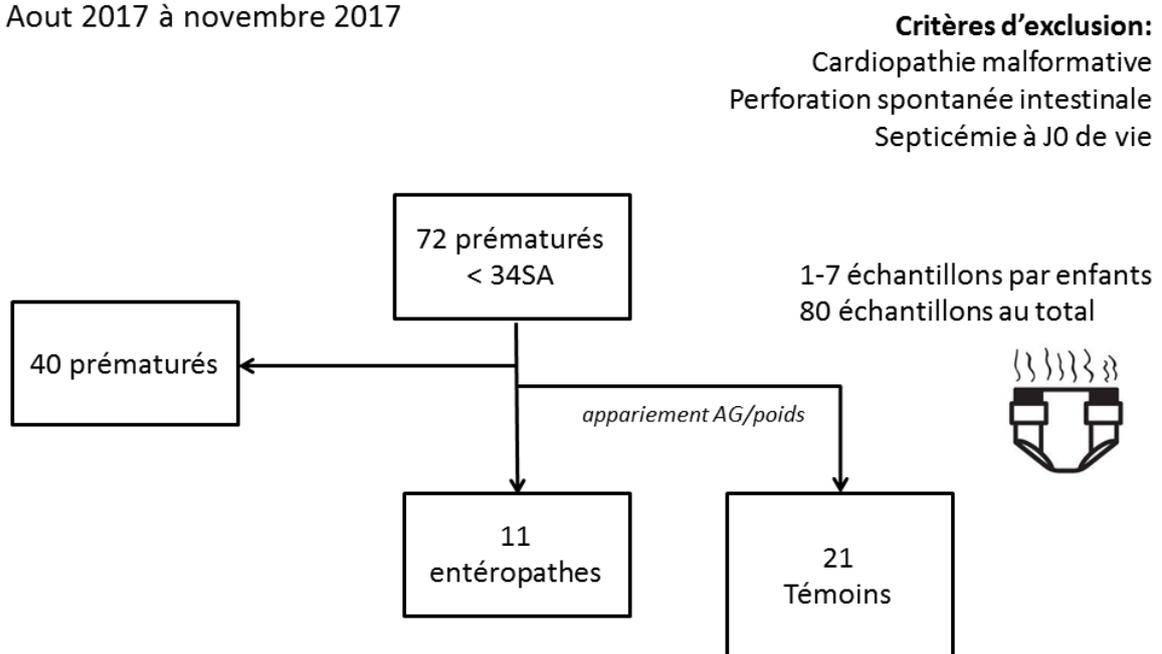


Figure 10 : Flow chart de la cohorte.

Les caractéristiques des cas d'entéropathie par rapport aux témoins sont présentées ci-dessous dans le **tableau 4**. Les contrôles étaient bien appariés aux patients entéropathes sur les facteurs cliniques (poids de naissance, âge gestationnel, sexe, mode d'accouchement, antibiothérapie *per-partum*, ou antibiothérapie chez le nouveau-né au cours de la première semaine). Tous les nourrissons de l'étude ont été nourris avec le lait de la mère ou du lait de lactarium. Les prématurés souffrant d'entéropathie étaient alimentés par nutrition entérale complète plus tardivement que les témoins (respectivement 23 jours de vie versus 11 jours de vie) ($p < 0,01$) (**Tableau 4**). De même, chez les nouveau-nés présentant une entéropathie, le volume d'alimentation entérale à J7 de vie, exprimé en ml/kg/jour, étaient significativement inférieur comparativement aux témoins (respectivement 35 ml/kg/jour versus 78 ml/kg/jour) ($p=0,0007$). L'âge médian de survenue de l'entéropathie était de 12 jours de vie (3-60). Pour

trois nouveau-nés, l'entéropathie s'est déclarée dans la première semaine de vie (J3, J4 et J6 de vie) et le premier échantillon pour ces enfants a été recueilli respectivement à J9, J6 et J10 de vie, soit après le début de l'entéropathie.

Cinq nouveau-nés entéropathes ont développé une bactériémie contre un seul dans le groupe des témoins ($p < 0,01$) dont 3 bactériémies à *Staphylococcus haemolyticus*, une bactériémie à *Staphylococcus warnerii* et une bactériémie à *Staphylococcus epidermidis*. Pour un cas, cette bactériémie correspondait au jour du début de l'entéropathie.

L'antibiothérapie dans la première semaine de vie dans les deux groupes est détaillée dans le **tableau 5**. La durée médiane d'antibiothérapie débutée dans la première semaine de vie était de 3 jours (2-7) dans le groupe « entéropathes » et également de 3 jours (2-10) dans le groupe « témoins ». Aucune infection néonatale précoce n'a été documentée. Pour un seul enfant, dans le groupe témoin, une souche d'*Escherichia coli* a été identifiée dans le liquide gastrique.

Alors que le dosage du pH au cordon ombilical n'est pas significativement différent entre les entéropathes et les témoins, le dosage des lactates au cordon était plus élevé chez les entéropathes que chez les témoins.

Les données biologiques des nouveau-nés inclus (hémoglobine, leucocytes, plaquettes, lactates) ne montraient pas de différence significative entre les cas et les témoins (**Fig. 11**).

Tableau 8: Caractéristiques de la cohorte

Variables, description	Entéropathe n=11	Contrôle n= 21	P (test exact de Fisher)
Poids de naissance, médiane g, (IQ)	1150 (845-1815)	1360 (700-2105)	0.09
Age gestationnel, médiane semaines (IQ)	28,4 (26-31)	30 (26,4-32)	0.2
Sexe			0.43
Fille, nombre (%)	2 (18)	8 (38)	
Garçon, nombre	9	13	
Canal artériel, nombre (%)*	3 (27)	6 (28)	1
Parité, nombre(%)	3 (27)	3 (10)	0.39
Corticothérapie anténatale, nombre (%)	11 (100)	19 (90)	0.53
Hypertension, pré-éclampsie, nombre (%)	2 (18)	3 (14)	1
Naissances multiples, nombre (%)	2 (18)	4 (19)	1
Antibiothérapie anténatale, nombre (%)	4 (36)	5 (24)	0.68
Chorioamniotite, nombre (%)	2 (18)	1 (5)	0.27
Score Apgar			
1 min, médiane (IQ)	8 (1-10)	7(1-10)	0.07
5min, médiane (IQ)	10 (4-10)	8(1-10)	0.3
pH Cordon, médiane (IQ)	7,23(6,78-7,4)	7,31(7,04-7,43)	0.27
Lactates au cordon, médiane (IQ)	5,7 (2,9-9,6)	3(1-7,2)	0.04
PAM à l'admission, médiane mmHg (IQ)	29 (20-47)	29,5 (17-43)	0.7
Température corporelle à l'admission, médiane °C (IQ)	36,5 (35,1-37,8)	36,8 (35,8-37,5)	0.23
Antibiothérapie dans la première semaine de vie, nombre (%)	10 (90)	18 (85)	1
Nombre de jours sous antibiotique, médiane jours, IQ	7,5 (2-17)	3 (0-18)	0.052
Nombre de jours sous antibiotiques dans la première semaine de vie†, médiane jours (IQ)	3 (0-7)	3 (0-7)	0.39
Nombre d'enfants sous glycopeptides (%)	8 (72)	3(14)	0.0018
Durée d'hospitalisation, médiane jours (IQ)	66 (48-88)	58 (15-109)	0.22
Durée d'oxygénothérapie, médiane jours (IQ)	6,9 (0-24)	2 (0-72)	0,58
Nombre de bactériémie	5	1	0,01
Exposition au lait de mère	11	21	1
Age de l'entéropathie médiane, jours (IQ)	12 (3-60)	-	-
Exposition aux inotropes	1	0	0,34
Transfusion sanguine	2	4	1
Volume d'alimentation entérale à 7 jours de vie, médiane ml/kg/jour (IQ)	35 (9,5-90)	78 (16-165)	0,0007
Alimentation entérale complète, médiane jours, (IQ)	23 (14-39)	11(3-29)	0,0002

* Canal artériel persistant : retentissement clinique du canal artériel persistant avec nécessité d'utilisation de l'ibuprofène

† Amoxicilline, Aminosides, Céphalosporines de 3ème génération

Tableau 9 : Détails de l'antibiothérapie administrée dans les 2 groupes (entéropathes et témoins) au cours de la première semaine de vie.

Enfants	N° Enfant	Type d'antibiotiques administrés*	Début de l'antibiothérapie	Durée max de l'antibiothérapie (j)
Cas	1	CTX, AMX, AK	J0	7
	2	CTX, MTZ, VAN, AK	J6	2
	3	-	-	-
	4	AMX, AK	J0	3
	5	AMX, AK	J0	3
	6	CTX, AK	J0	2
	7	AMX, CTX, AK	J0	6
	8	AMX, CTX, AK	J0	4
	9	AMX, AK	J0	2
	10	AMX, AK	J0	3
	11	AMX, AK	J0	2
Témoins	12	-	-	-
	13	AMX, AK	J0	2
	14	AMX, CTX, AK	J0	2
	15	AMX, CTX, GN	J0	3
	16	AMX, AK	J0	2
	17	AMX, AK	J0	3
	18	AMX, CTX, AK	J0	5
	19	AMX, CTX, GN	J0	3
	20	AMX, CTX, AK	J0	10
	21	CTX, AK	J0	5
	22	AMX, CTX, AK	J0	3
	23	AMX, CTX, AK	J0	8
	24	AMX, AK	J0	2
	25	AMX, AK	J0	2
	26	VAN, AK	J2	6
	27	AMX, AK	J0	3
	28	AMX, AK	J0	3
	29	AMX, AK	J0	2
	30	-	-	-
	31	-	-	-
	32	AMX, AK	J0	3

*AMX, amoxicilline ; AK, amikacine ;

CTX, cefotaxime ; GN, gentamicine ;MTZ, métronidazole ;VAN, vancomycine

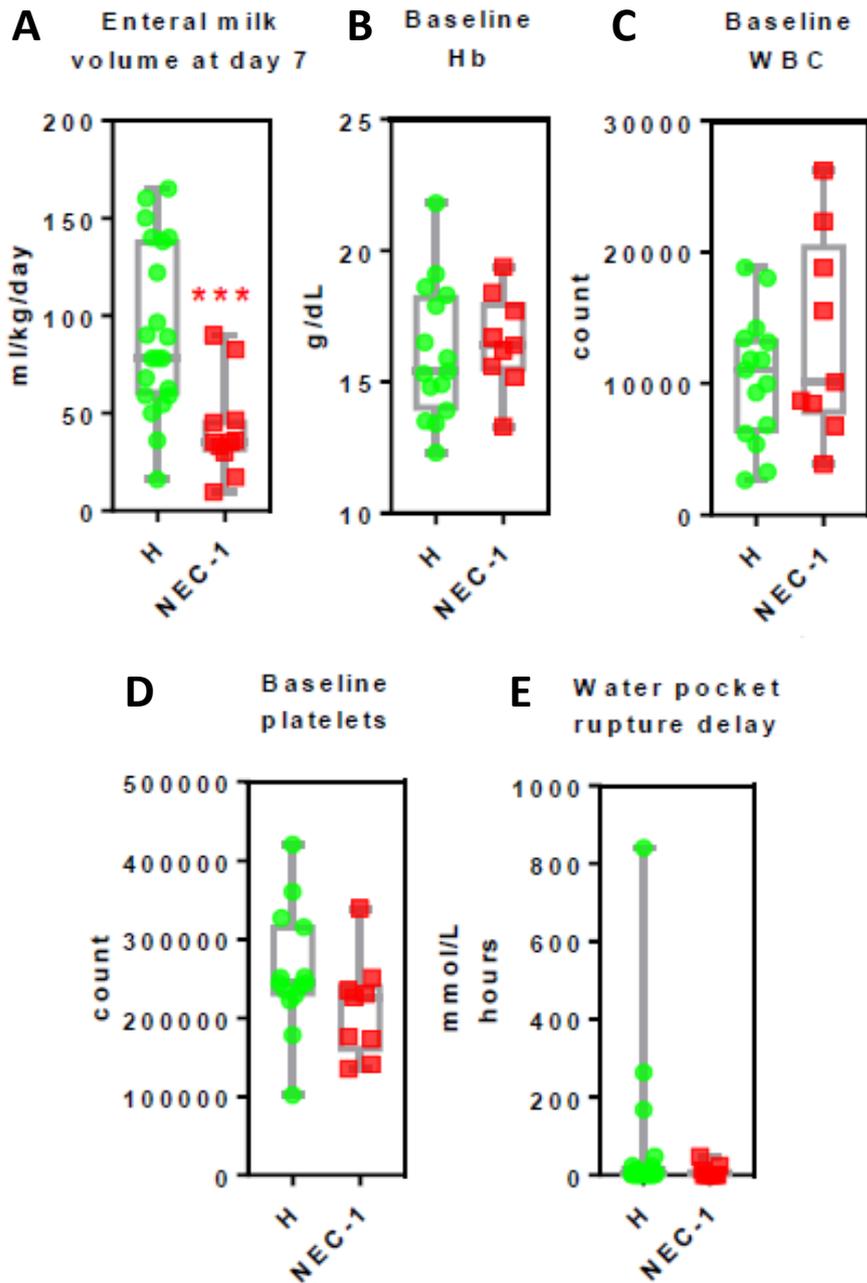


Figure 11 : Données cliniques (délai de rupture de la poche des eaux (E), volume d'alimentation entérale à 7 jours de vie (A)) et biologiques (taux d'hémoglobine (Hb (B)), de leucocytes (C) (WBC = White blood cells), de plaquettes (platelets)(D)), des nouveau-nés à l'admission dans le service. Les témoins (H) sont représentés par des points verts et les enfants entéropathes (NEC-1) par des points rouges.

B. Comparaisons des données structurelles, fonctionnelles du microbiote intestinal et des données métabolomiques fécales entre entéropathes et témoins

Un total de 80 échantillons a été analysé. Nous avons réparti les échantillons en 4 groupes. Le premier groupe correspondait à des échantillons de selles prélevées entre J1 et J10 de vie (n=19) (J signifie "jours"), le deuxième groupe correspondait à des échantillons prélevés entre J11 et J20 de vie (n= 24), le troisième groupe correspondait à des échantillons prélevés entre J21 et J30 de vie (n=20) et le quatrième groupe correspondait à des échantillons prélevés au-delà de 30 jours de vie (n=17).

Dans la première décade de vie, l'âge médian du recueil du premier échantillon de selles pour le groupe « entéropathes » était de 7 jours de vie (5-10) versus 5 jours de vie (1-10) dans le groupe « témoins ».

1. Comparaison des données structurelles, fonctionnelles du microbiote intestinal et des données métabolomiques fécales entre entéropathes et témoins

Pour comprendre la contribution de la dysbiose microbienne à l'apparition précoce de l'ECUN, nous avons analysé les profils microbiens intestinaux aux niveaux structurel et fonctionnel ainsi que le métabolome fécal chez les enfants pour lesquels une ECUN était soupçonnée (ECUN-1) comparativement aux témoins. Les enfants entéropathes présentaient une plus grande abondance d'espèces de *Streptococcus* et *Enterococcus* (**Fig.12**) que les témoins. Les deux populations présentaient une variance intragroupe élevée en termes de microbiote intestinal (**Fig.13**). Le microbiome ECUN-1 montrait une augmentation de l'activité de la voie liée à la transcription, à la dégradation des glycosaminoglycanes et au lysosome par rapport aux enfants témoins (**Fig.14**). Ensuite, nous avons analysé le métabolome fécal pour apprécier les changements induits par l'entéropathie dans l'activité métabolique microbienne intestinale. Malgré la forte variance intragroupe, les nouveau-nés entéropathes présentaient des niveaux inférieurs d'éthanol (**Fig.15**).

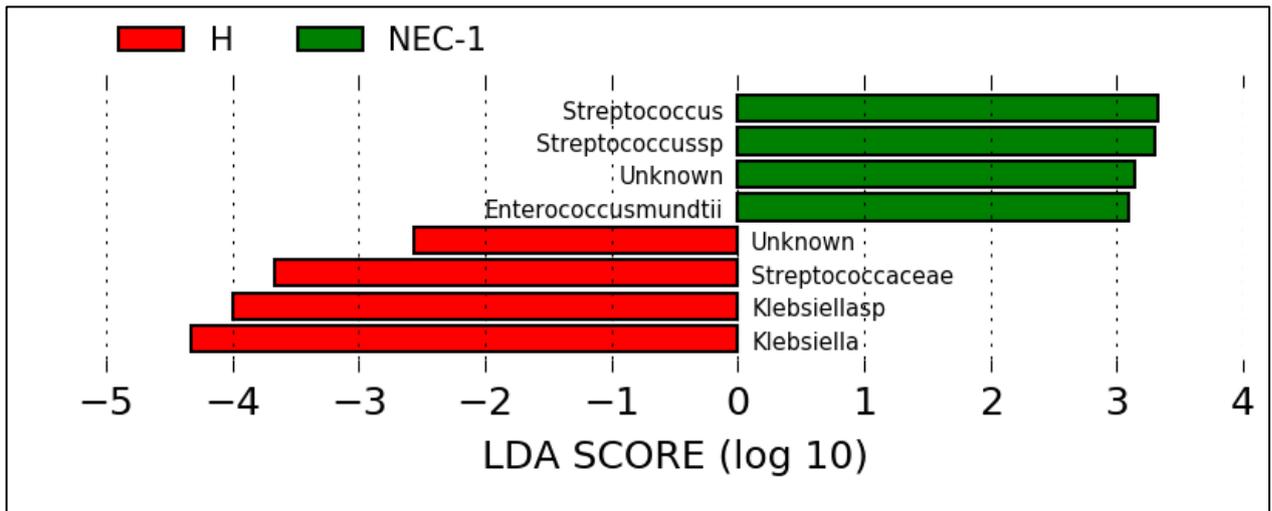


Figure 12 : Comparaison du microbiote intestinal entre entéropathes (NEC-1) et témoins (H). Analyse structurale du microbiote intestinal par le score LDA entre les enfants témoins (H) et les enfants atteints d'entérocolite de stade 1 (NEC-1). En rouge sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe témoin comparativement au groupe des entéropathes; en vert sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes comparativement au groupe des témoins. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

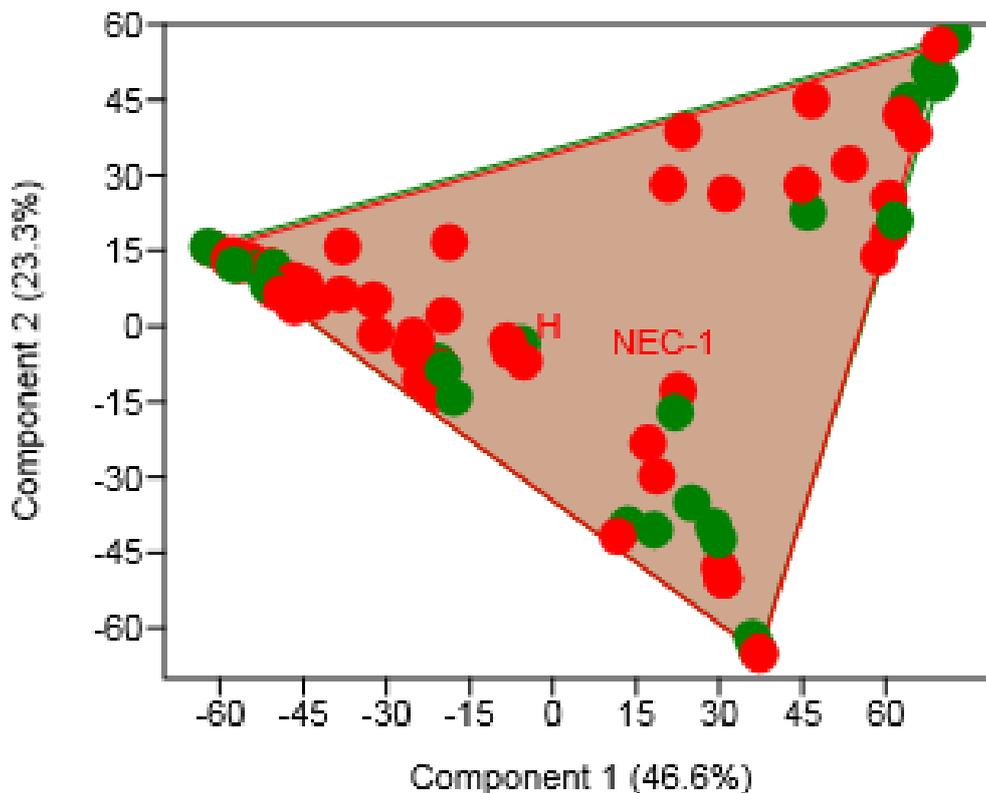


Figure 13 : Comparaison du microbiote intestinal entre entéropathes (NEC-1) et témoins (H). Analyse en composantes principales (PCA) du microbiote intestinal. Chaque point représente un échantillon, les points rouges correspondant à un échantillon du groupe des témoins et les points verts correspondant à un échantillon du groupe des entéropathes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

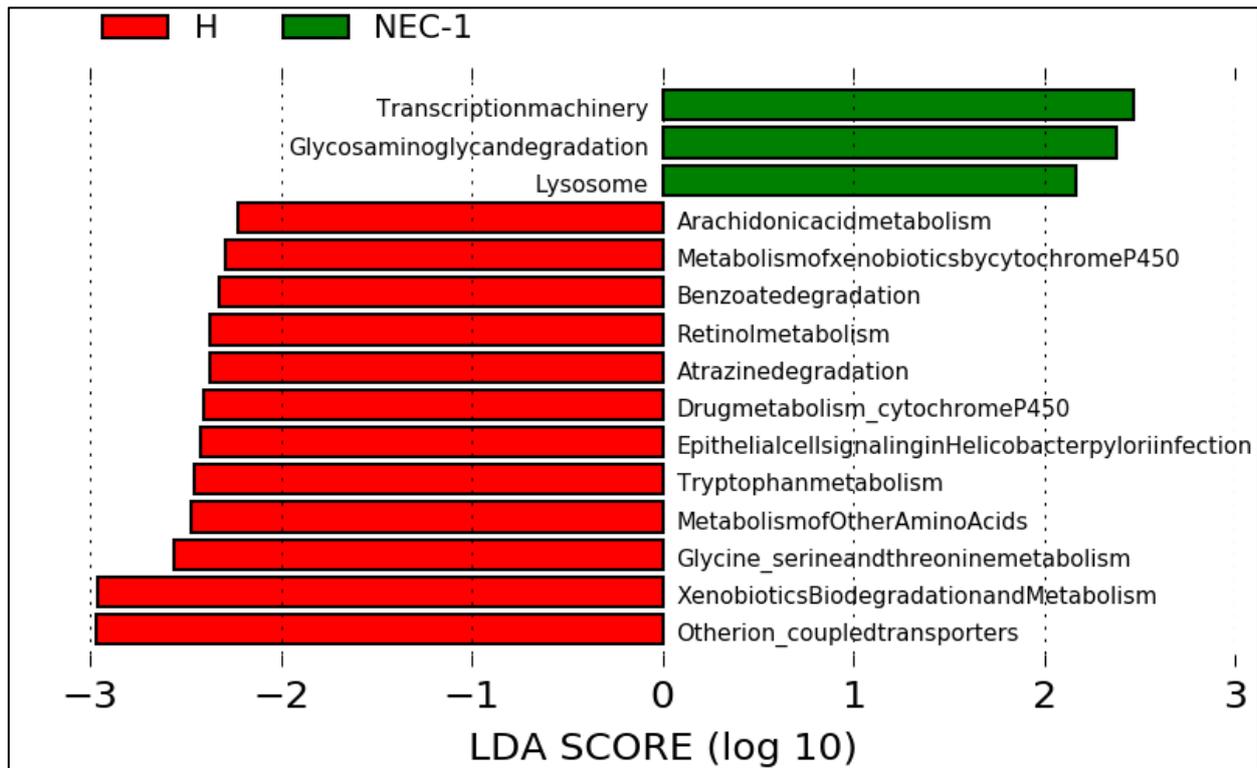


Figure 14 : Comparaison des voies fonctionnelles du microbiote entre entéropathes (NEC-1) et témoins (H). Score LDA pour les voies microbiennes prédictives. En rouge sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des témoins par rapport au groupe des entéropathes et en vert sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des entéropathes par rapport aux témoins. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

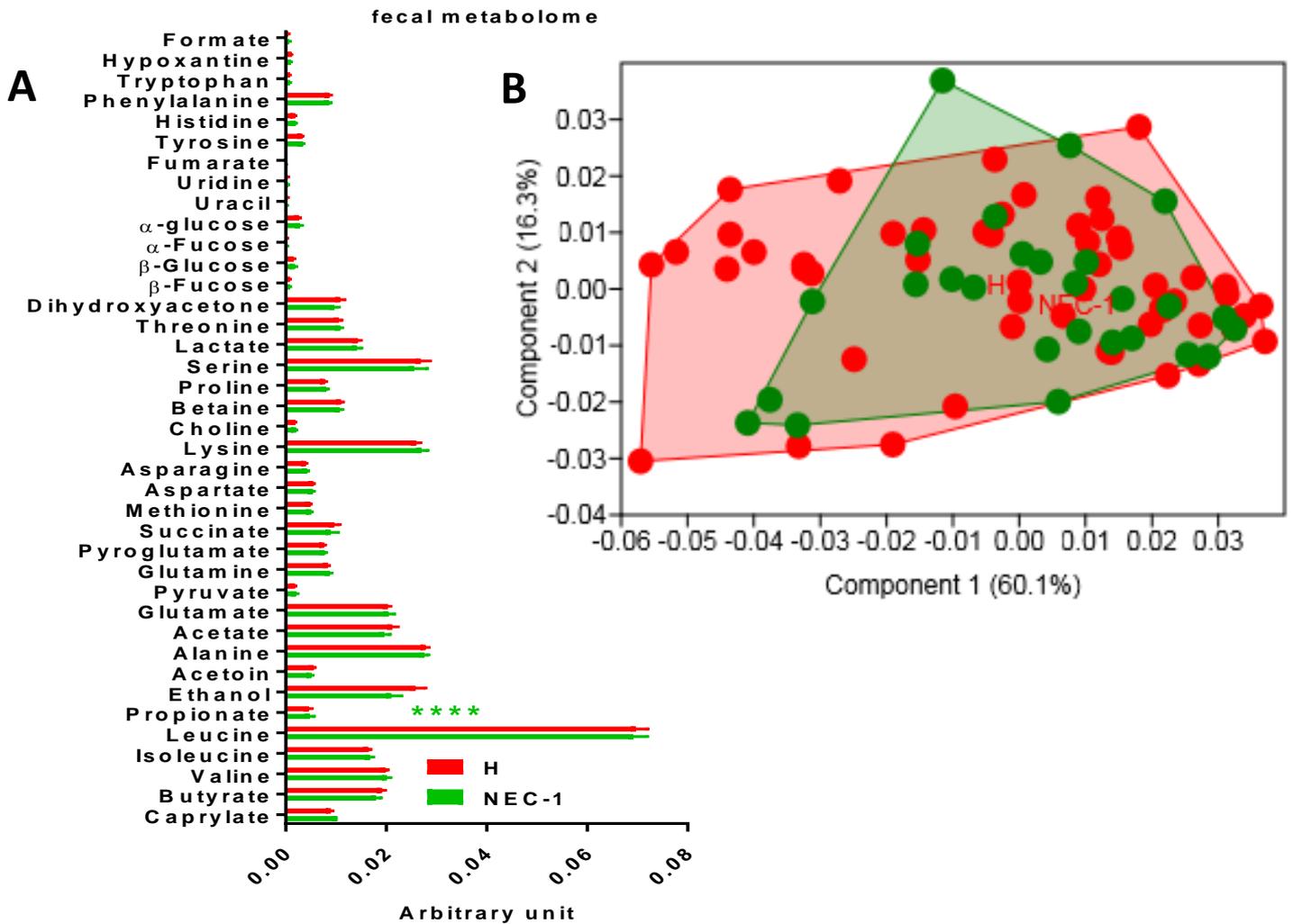


Figure 15 : Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et analyse en PCA de ces métabolites fécaux (B). Chaque point représente un échantillon, les points rouges correspondant à un échantillon du groupe des témoins et les points verts correspondant à un échantillon du groupe des entéropathes. **ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini. Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes ($<0,05$) ; N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.**

Dans l'ensemble, ces données montrent que l'établissement de l'entéropathie est caractérisé par un profil particulier du microbiote intestinal et du microbiome et peut également affecter la production de métabolites de l'intestin.

2. Analyse des données structurales, fonctionnelles du microbiote intestinal et des données métabolomiques fécales depuis la naissance jusqu'au deuxième mois de vie

Étant donné la présence d'un profil microbien intestinal structurel et fonctionnel spécifique à l'entéropathie, nous avons cherché à identifier à quel moment ces différences de profils s'établissent. Pour cela, nous avons divisé les populations d'enfants entéropathes et d'enfants témoins en sous-groupes en fonction des décades de jours de vie, comme suit : de J1-J10, J11-J20, J21-J30, pour le premier mois de vie ; et >30j pour le second.

Au cours de la première décade, les entéropathes présentaient un microbiote intestinal divergent et plus homogène que celui des enfants témoins, ces derniers étant caractérisés par une plus grande abondance d'espèces de *Klebsiella* (**Fig. 16A-B**). À ce stade de la vie, le microbiote intestinal du nouveau-né entéropathe présentait également une diversité plus faible d'après l'indice Chao-1 (**Fig. 16C**) et une activité microbienne différente liée au lysosome (**Fig. 17**). Aucun changement significatif n'a été observé dans les métabolites fécaux (**Fig. 18**). Dans l'ensemble, ces données montrent que le microbiome intestinal, mais pas le microbiote ni le métabolome fécal, commence à diverger dès le début du NEC-1.

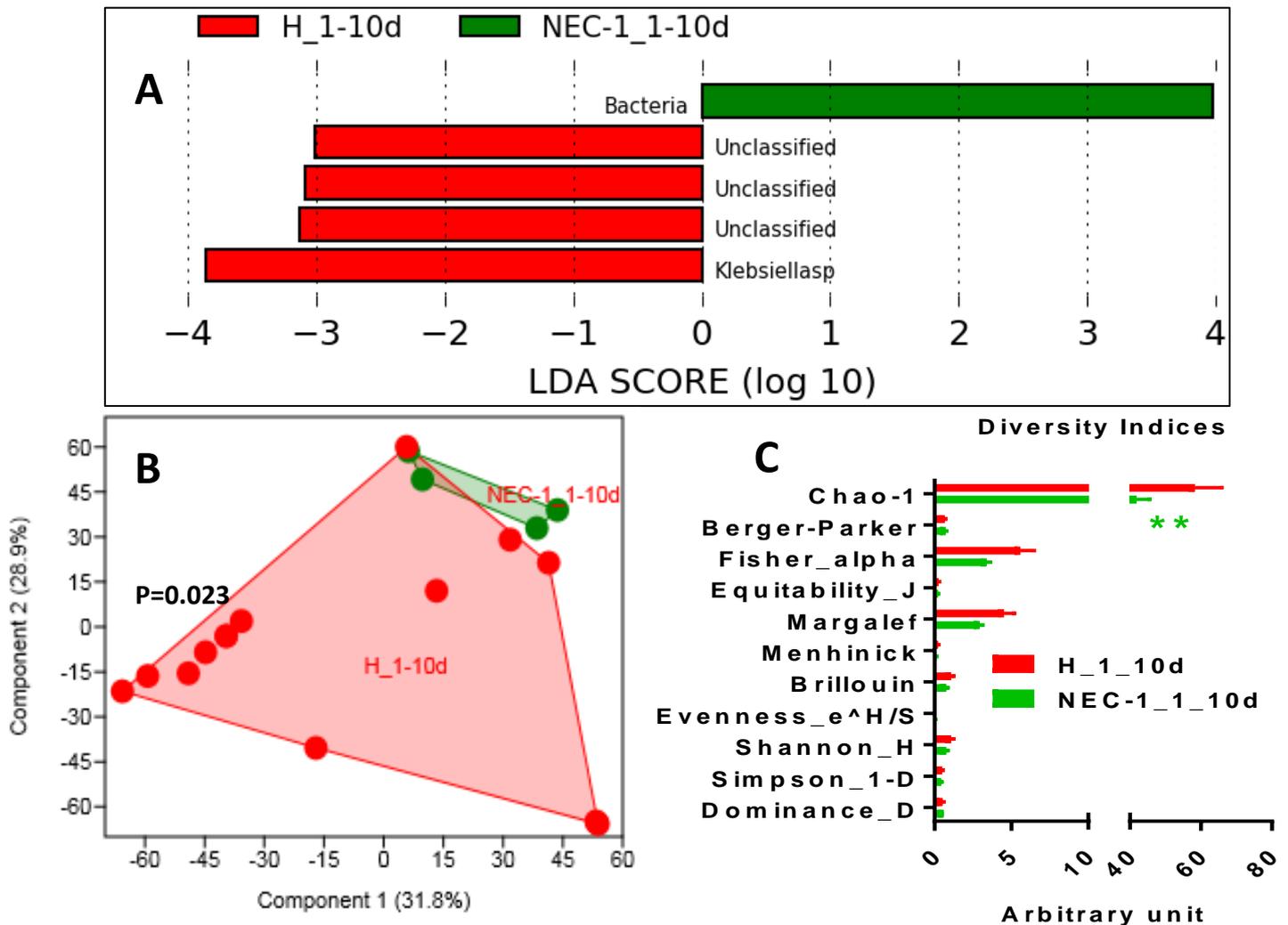


Figure 16 : Analyse du microbiote intestinal pendant les 10 premiers jours de vie. A) Analyse structurale du microbiote intestinal par le score LDA entre les enfants témoins (H) et les enfants atteints d'entérocolite de stade 1(NEC-1) au cours de la première décennie de vie, de 1 à 10 jours (d). En rouge sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des témoins comparativement au groupe des entéropathes ; en vert sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes comparativement au groupe des témoins. B) Analyse en composantes principales (PCA) du microbiote intestinal ; C) Indices de diversité du microbiote intestinal. N=15 pour H et N=4 pour NEC-1.

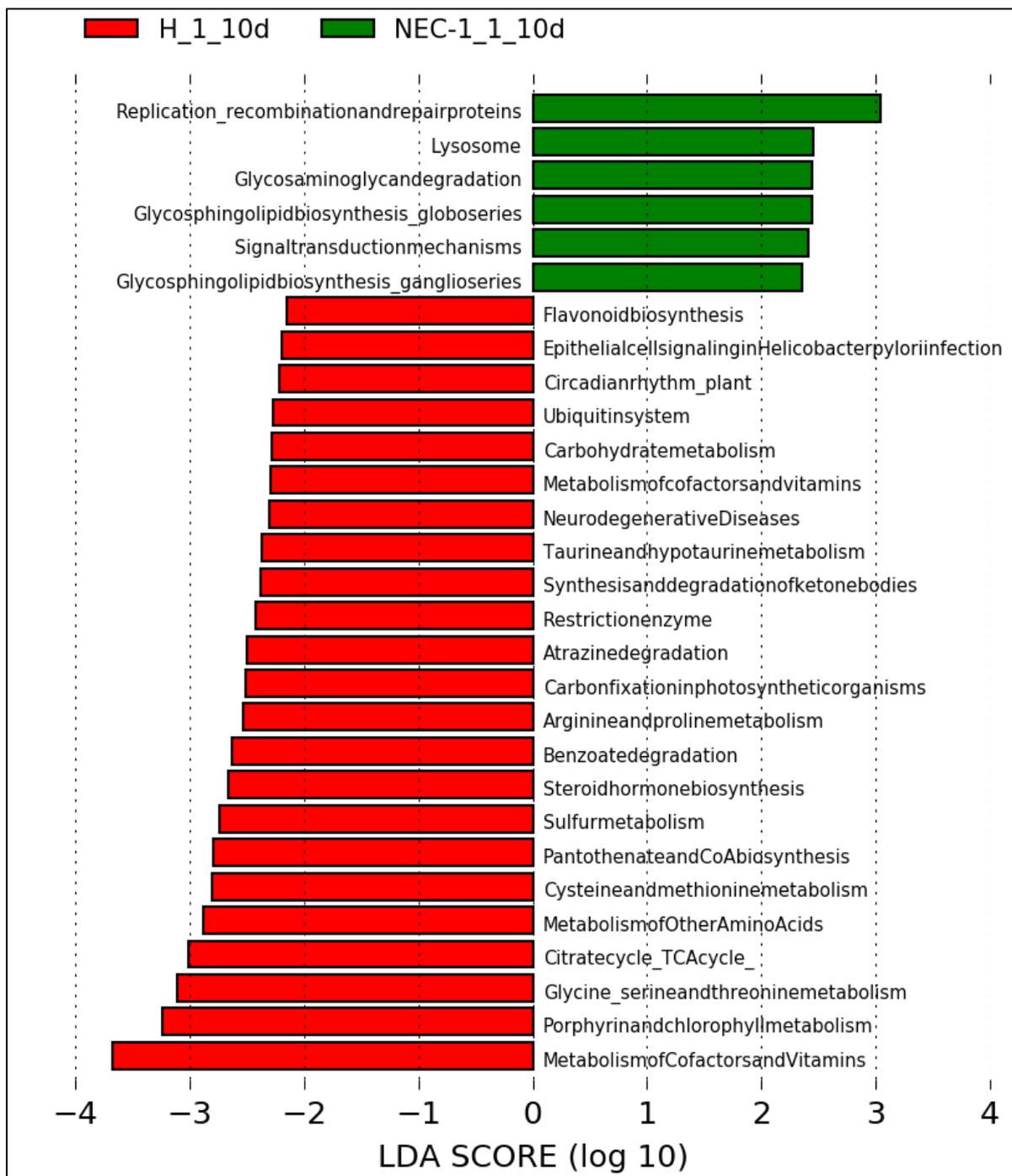


Figure 17 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal pendant les 10 premiers jours de vie représentée par le score LDA pour les voies fonctionnelles microbiennes prédictives. En rouge sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des témoins (H) par rapport au groupe des entéropathes (NEC-1) et en vert sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des entéropathes (NEC-1) par rapport aux témoins (H). N=15 pour H et N=4 pour NEC-1.

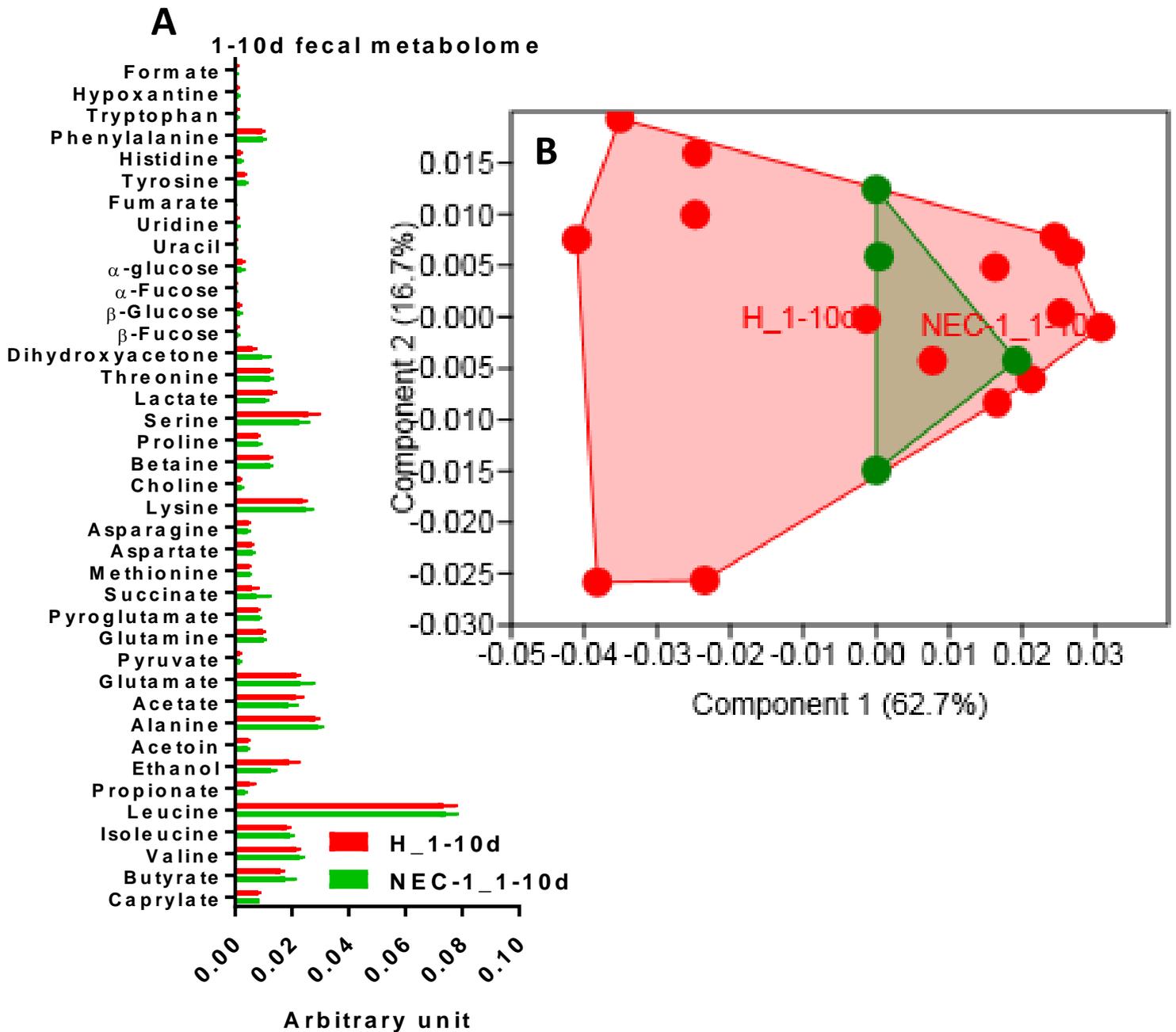


Figure 18: Analyse du métabolome fécal pendant les 10 premiers jours de vie. A) Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux B) Analyse en PCA. Chaque point représente un échantillon, les points rouges correspondant à un échantillon du groupe des témoins et les points verts correspondant à un échantillon du groupe des entéropathes. ** $P < 0,01$. ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini. Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes ($< 0,05$) ; $N=15$ pour H et $N=4$ pour NEC-1.

Au cours de la deuxième décade de vie, le microbiote intestinal ECUN-1 était caractérisé par une plus grande abondance d'espèces de *Streptococcus* et de bactéries de l'ordre des *Micrococcales* (**Fig.19A**), malgré une énorme variance intragroupe (**Fig.19C**). A ce stade de la vie, le microbiote intestinal ECUN-1 présentait également une plus grande diversité basée sur l'indice Chao-1 (**Fig.19B**). Aucune voie microbienne n'était régulée différemment. Quant au métabolome fécal, les enfants ECUN-1 présentaient des taux de sérine plus faibles, mais avec une grande variance générale (**Fig.20**). Ces données montrent donc une plus forte modification du microbiote intestinal que du microbiome intestinal au cours de la deuxième décade de vie entre les enfants entéropathes et les enfants témoins.

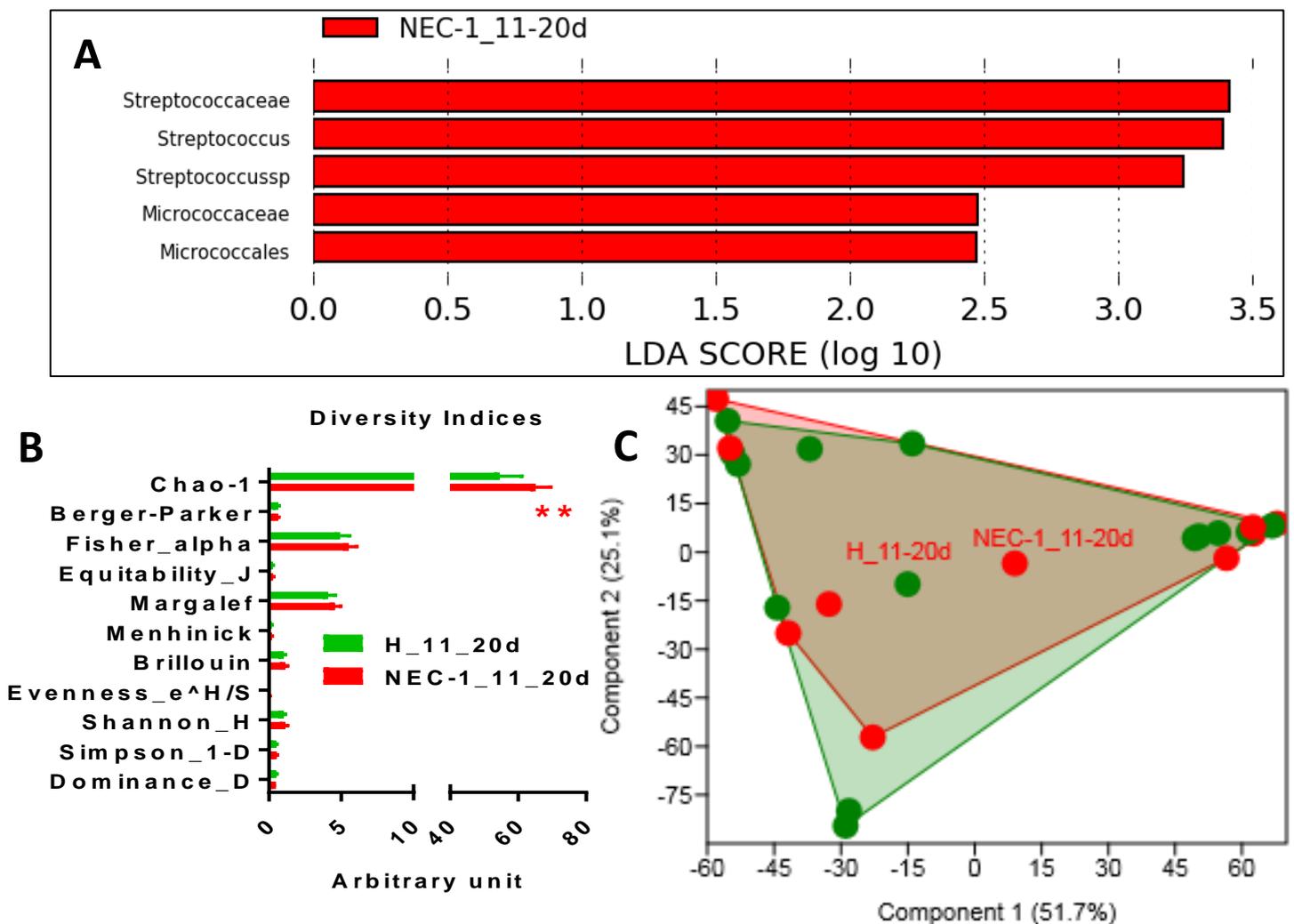


Figure 19: Analyse structurale du microbiote intestinal pendant la deuxième décade de vie. A) Analyse structurale du microbiote intestinal par le score LDA entre des enfants témoins (H) et des enfants atteints d'entérocolite de stade 1 (NEC-1) au cours de la deuxième décade de vie, de 11 à 20 jours (d). En rouge sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes comparativement au groupe des témoins. B) Indices de diversité du microbiote intestinal C) Analyse en composantes principales (PCA) du microbiote intestinal. N=14 pour H et N=10 pour NEC-1.

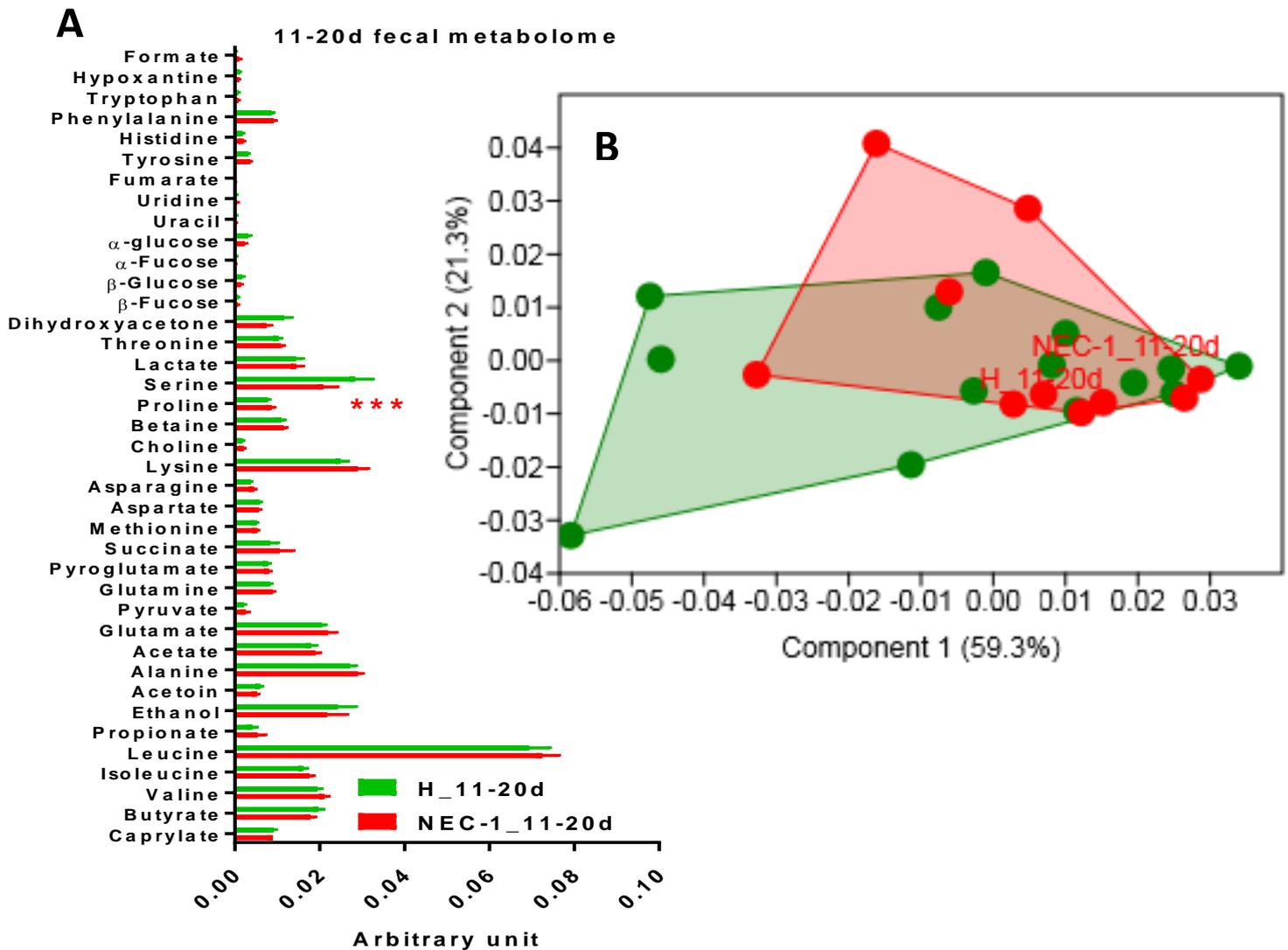


Figure 20 : Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et de PCA (B) au cours de la deuxième décennie de vie. Chaque point représente un échantillon, les points rouges correspondant à un échantillon du groupe témoin et les points verts correspondant à un échantillon du groupe des entéropathes. $P<0.01$. $***$ ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes ($<0,05$) ; $N=14$ pour H et $N=10$ pour NEC-1.**

Au cours de la troisième décennie de vie, nous avons observé les plus grands changements dans le microbiote intestinal ECUN-1 par rapport aux enfants témoins (Fig.21 et 22), malgré une variance intragroupe importante (Fig.23B). Il n'y avait aucune différence dans les indices de diversité microbienne (Fig.23A). De plus, nous avons également observé un autre profil du microbiome, différent de ceux rapportés ci-dessus, basé principalement sur le métabolisme de la thiamine et des composés du sélénium (Fig.24).

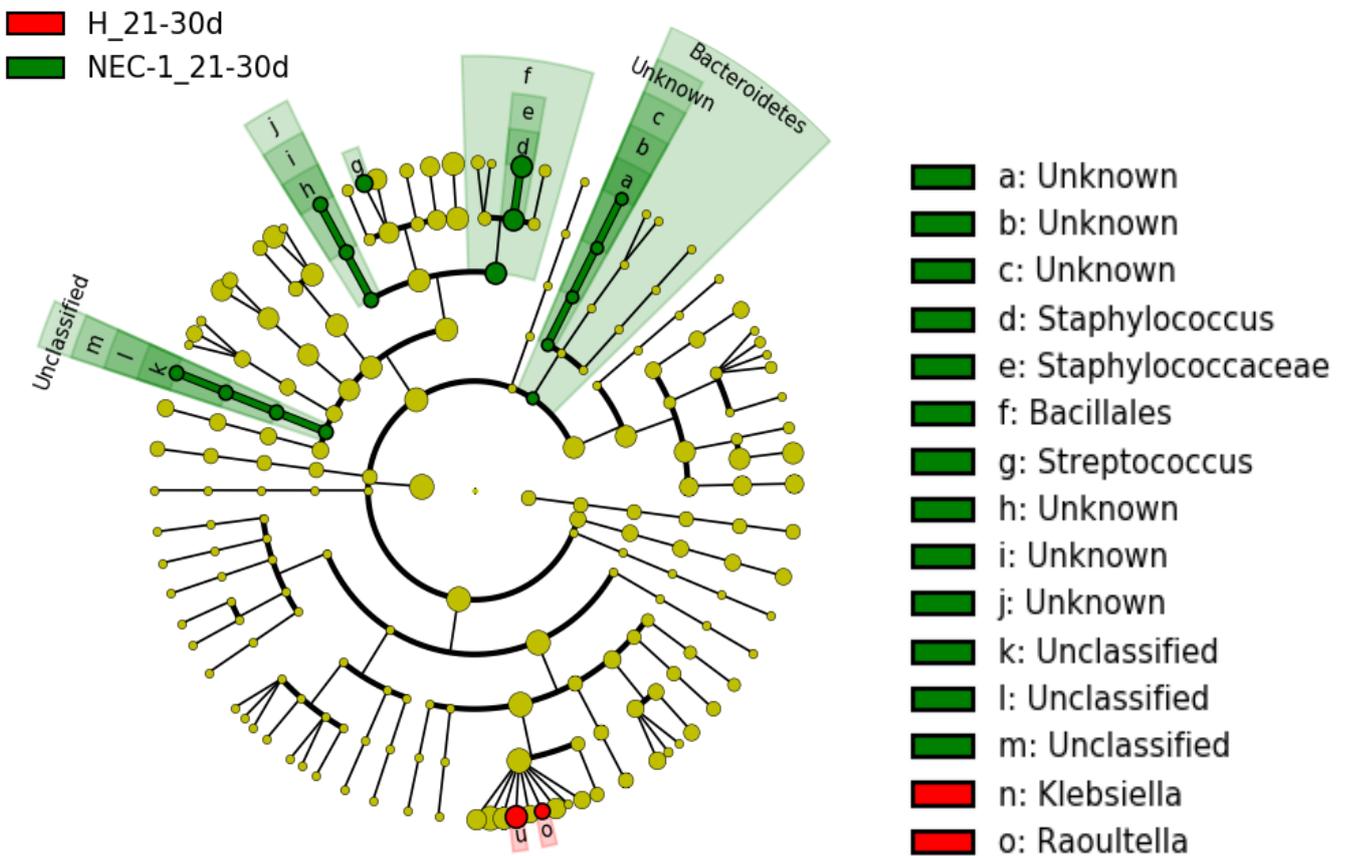


Figure 21 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant la troisième décennie de vie. A) Analyse comparative du microbiote intestinal par analyse discriminante linéaire (LDA) de l'effet de taille (LEfSe : Linear discriminant analysis Effect Size): le cladogramme montre des taxa bactériens significativement plus élevés dans le groupe d'enfants de la même couleur : dans le microbiote fécal entre enfants sains (H) et entérocolite de stade 1 (NEC-1) pendant la troisième décennie de vie de 21 à 30 jours (d). Représentation en Cladogramme générée à partir des données obtenues par pyroséquençage sur le logiciel LEfSe. Le rond jaune au centre du graphique représente le règne des bactéries. Ensuite ce graphique est constitué de 5 cercles excentriques successifs sur lesquels sont disposés des ronds. Chaque cercle représente un niveau de classification taxonomique (du centre vers l'extrémité : phylum, classe, ordre, famille et genre) et chaque rond représente soit un phylum, une classe, un ordre, une famille ou un genre différent en fonction du cercle sur lequel il se trouve. Par exemple, chaque rond disposé sur le cercle des phyla représente un phylum différent. Les ronds surlignés en rouge correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe témoins comparativement au groupe ECUN. Les ronds surlignés en vert correspondent à des groupes bactériens dont la proportion relative est significativement augmentée dans le groupe ECUN comparativement au groupe témoin. N=13 pour H et N=7 pour NEC-1.

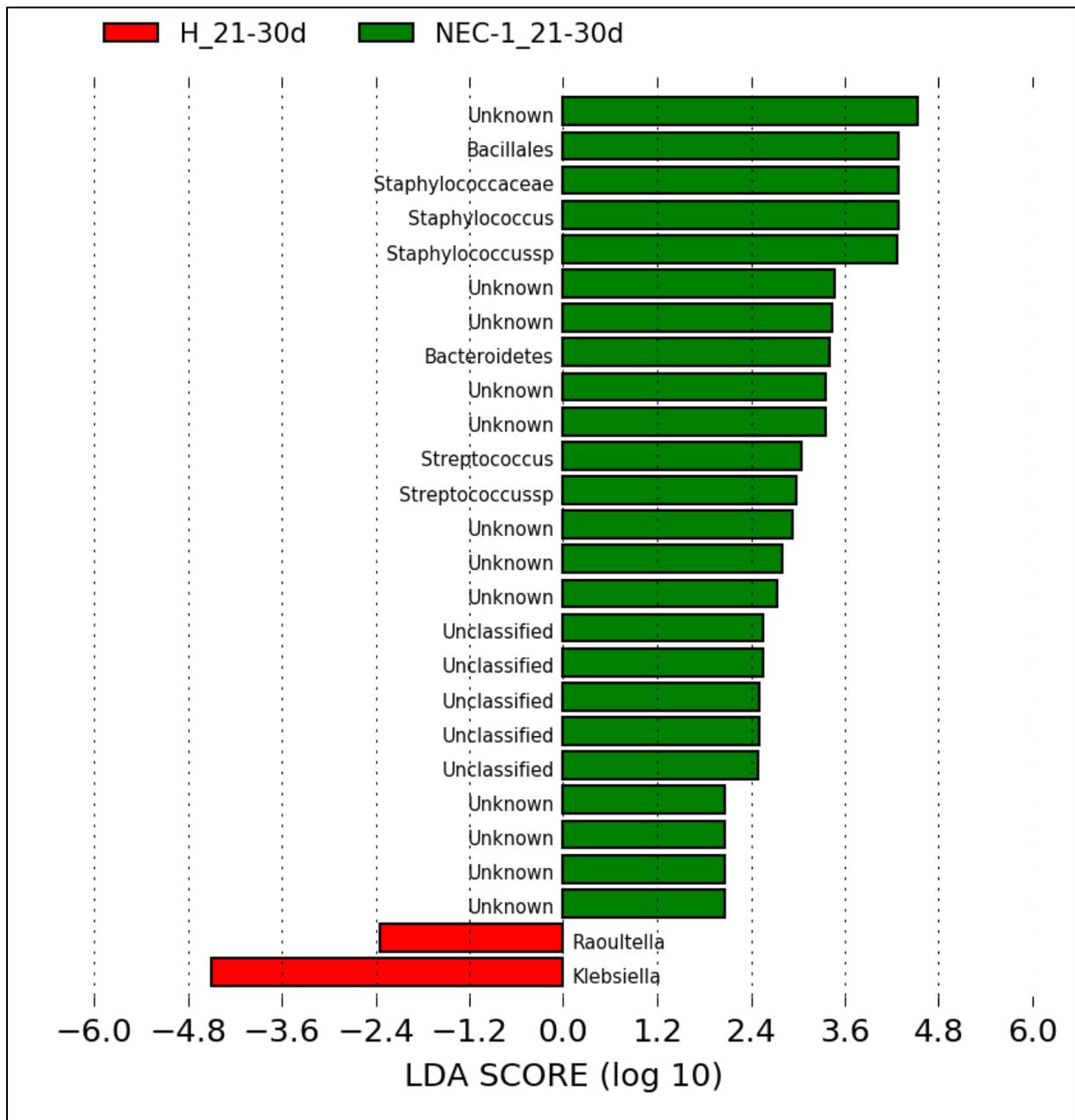


Figure 22 : Analyse structurale du microbiote intestinal pendant la troisième décade de vie. Score LDA utilisé pour construire le cladogramme de la Figure 21. En rouge sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe témoin comparativement au groupe des entéropathes ; en vert sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes comparativement au groupe témoin. N=13 pour H et N=7 pour NEC-1.

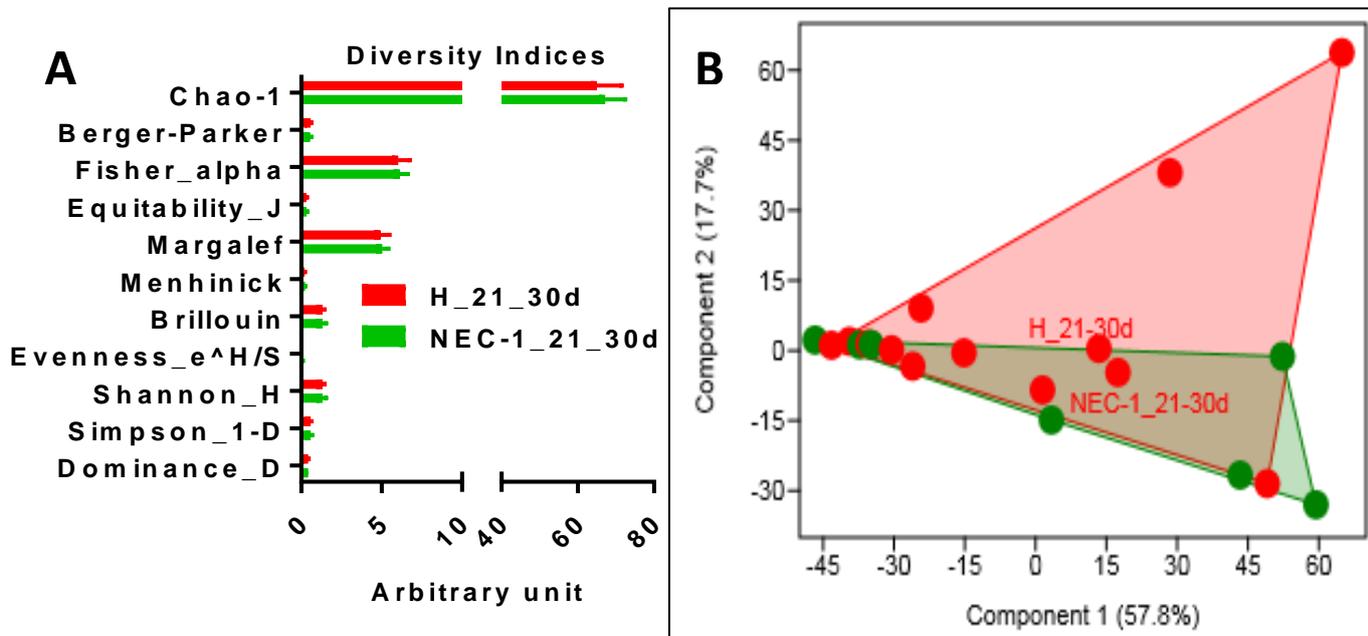


Figure 23 : Indices de diversité du microbiote intestinal de 21 jours à 30 jours de vie (A) et Analyse en composantes principales (PCA) (B) du microbiote intestinal ; N=13 pour H et N=7 pour NEC-1.

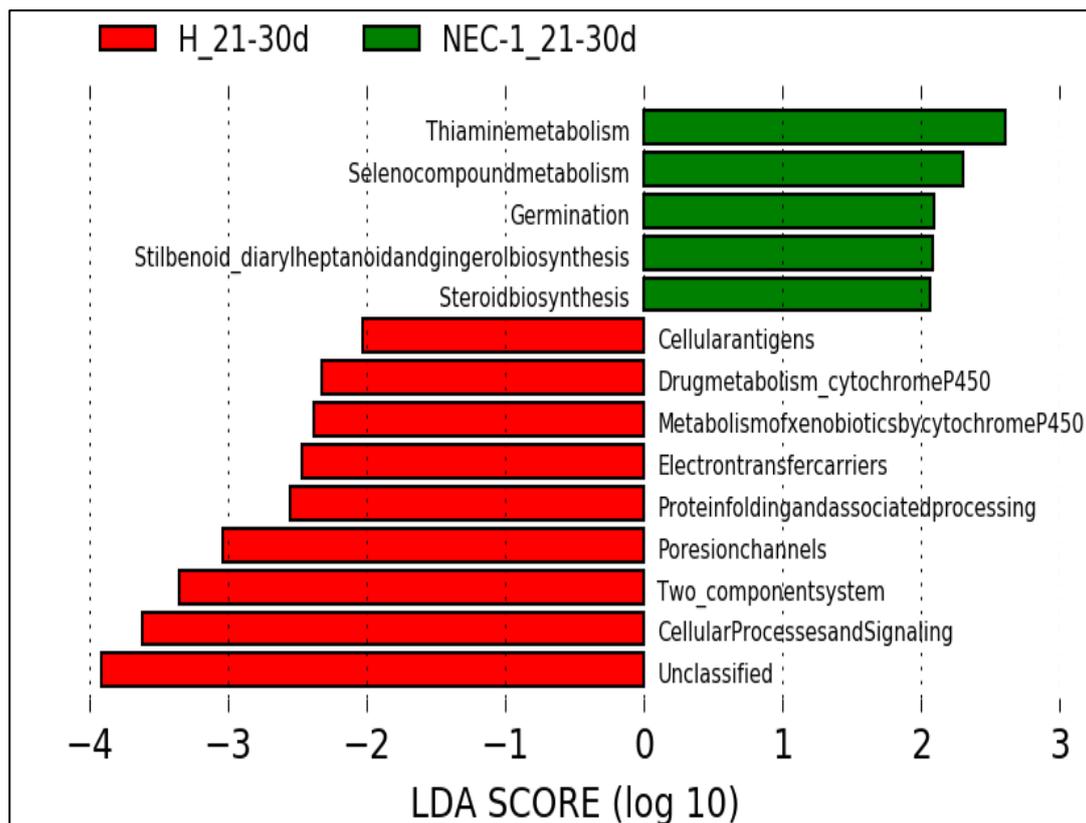
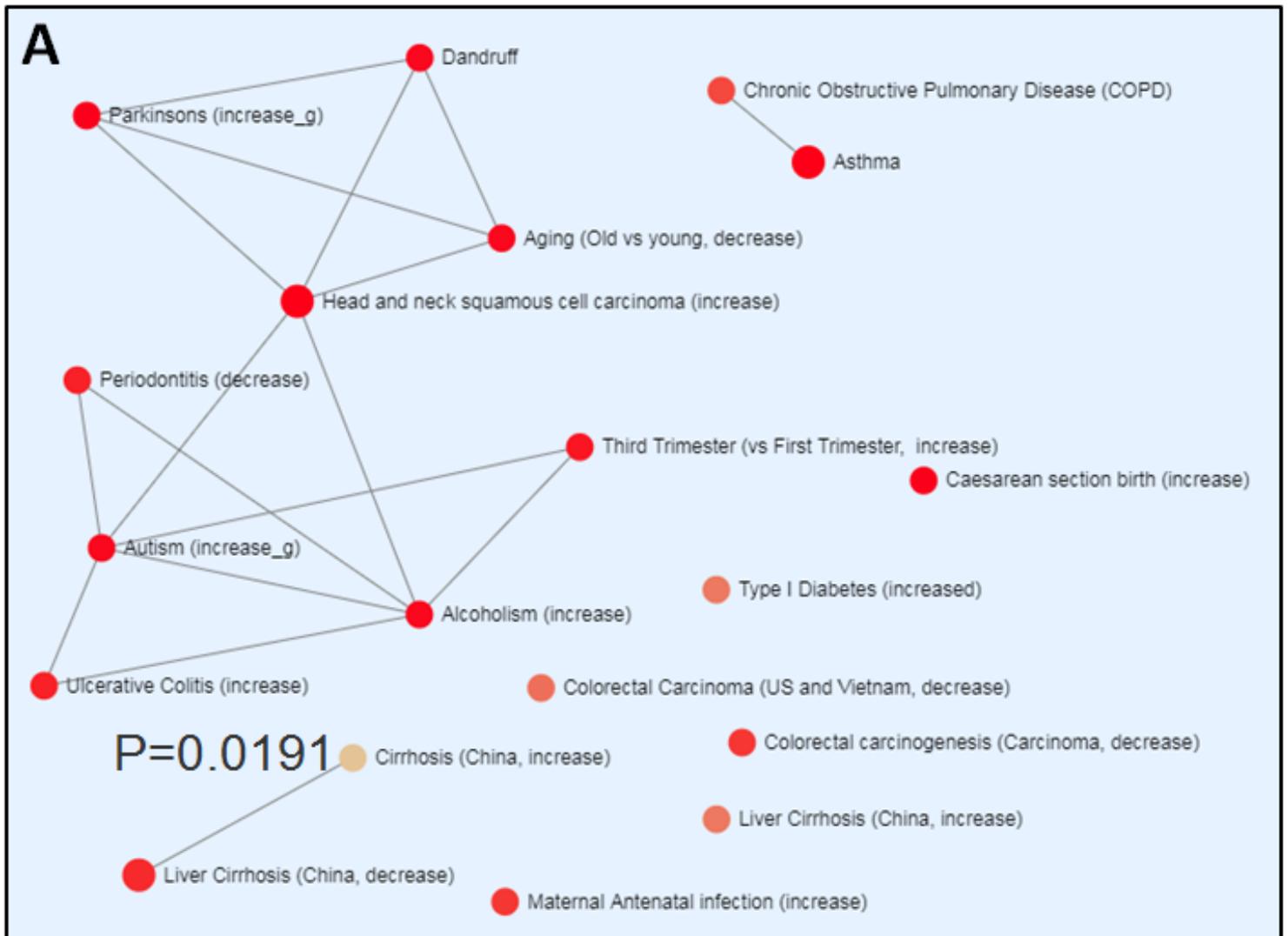


Figure 24 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal de 21 jours à 30 jours de vie représentée par le Score LDA pour les voies fonctionnelles microbiennes prédictives. En rouge sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des témoins par rapport au groupe des entéropathes et en vert sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des entéropathes par rapport aux témoins. N=13 pour H et N=7 pour NEC-1.

Le profil de microbiome intestinal de la troisième décennie de vie chez les entéropathes était associé : 1) à de multiples maladies et notamment augmenté de façon significative dans la colite ulcéreuse (**Fig.25A**) ; 2) à des variations génétiques de l'hôte et à un lien significatif avec *anp32e*, gène impliqué dans la colite ulcéreuse (**Fig.25B**) [148] 3) à des variations génétiques concernant la voie des enzymes de restrictions.



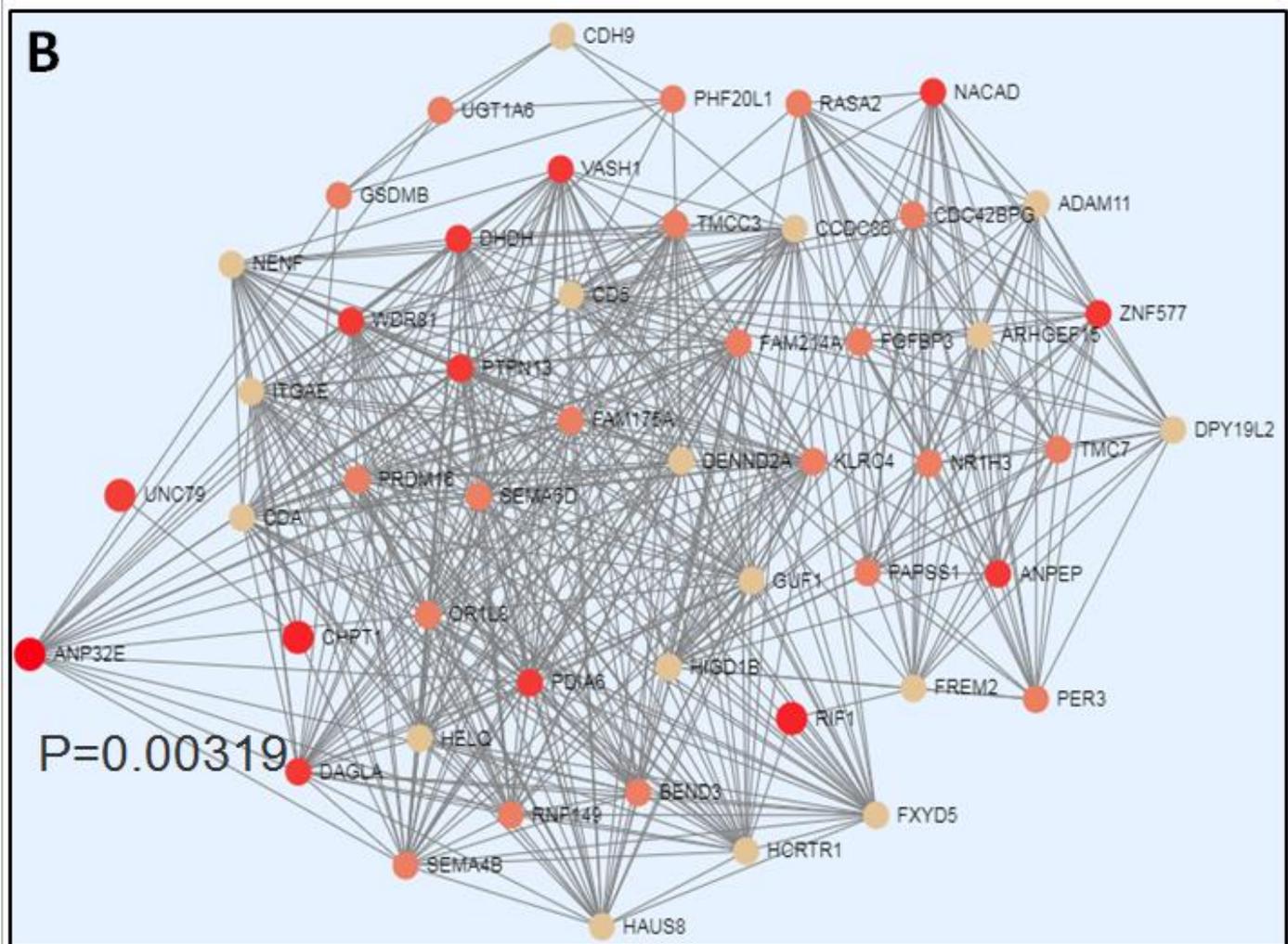


Figure 25 : A) Maladies et B) variations génétiques de l'hôte liées au microbiote intestinal associé au NEC-1_21-30d. N=13 pour H et N=7 pour NEC-1. Cette analyse du microbiome a été effectuée grâce au logiciel <https://www.microbiomeanalyst.ca/> en utilisant l'analyse TSEA (Taxon Set Enrichment Analysis). A partir d'une liste de microbes d'intérêt, on teste s'il y a un enrichissement d'ensembles taxonomiques. Ces ensembles taxonomiques sont définis comme des groupes de microbes qui ont quelque chose en commun. Par exemple, un groupe de microbes qui partagent les mêmes traits phénotypiques ou qui ont déjà été décrits comme associés avec le mode de vie de l'hôte (alimentation, IMC, etc...) ; ou un groupe de microbes dont on a constaté qu'ils étaient associés de façon significative à des troubles particuliers du développement, des troubles physiologiques ou à des maladies ; ou un groupe de microbes dont la composition est altérée par une variation génétique commune [149].

En ce qui concerne le métabolome fécal, nous n'avons observé aucun changement significatif chez les enfants ECUN-1 par rapport aux enfants témoins (**Fig.25**). Globalement, ces données confirment l'évolution du microbiote intestinal en termes de taxonomie, en association avec les données de la deuxième décade de vie entre ECUN-1 et les enfants témoins.

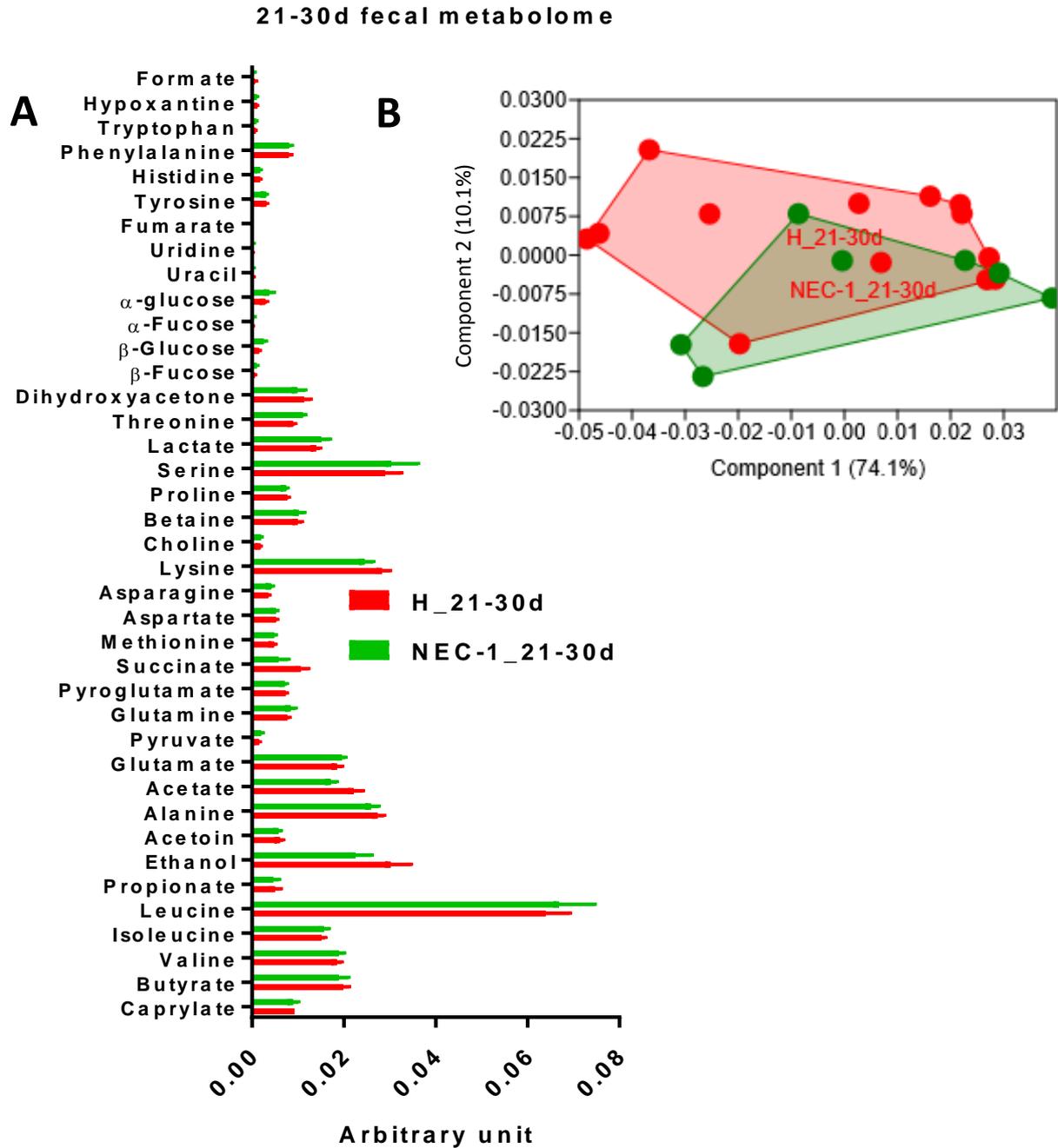


Figure 26 : Analyse du métabolome fécal pendant la troisième décennie de vie. Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux et de la PCA. Chaque point représente un échantillon, les points rouges correspondant à un échantillon du groupe témoin et les points verts correspondant à un échantillon du groupe des entéropathes. N=13 pour H et N=7 pour NEC-1.

Enfin, nous avons mené la même enquête sur les selles recueillies **au cours du deuxième mois de vie**. Au cours de cette période de la vie, les différences taxonomiques dans le microbiote intestinal de ECUN-1 par rapport au microbiote intestinal des témoins étaient plus modestes que celles observées précédemment et liées à une abondance plus importante

des espèces de *Raoultella* dans le microbiote intestinal des entéropathes (**Fig.27**) malgré une variation intragroupe encore importante (**Fig.28A**) et aucun changement dans les indices de diversité globale (**Fig.28B**). Nous avons également observé une abondance plus importante des fonctions microbiennes dans le microbiote intestinal des entéropathes et d'autres fonctions liées à la réparation de l'ADN (**Fig.29**). De plus, cette période de la vie était caractérisée par la plus grande séparation en termes de métabolome fécal, avec des niveaux significativement inférieurs d'éthanol et de leucine chez les enfants ECUN-1 (**Fig. 30 A et B**).

Les résultats des analyses structurales, fonctionnelles et métabolomiques du microbiote fécal dans l'ensemble des échantillons, au cours des différentes étapes de vie (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} décades, et deuxième mois de vie), sont résumés dans le **tableau 6**.

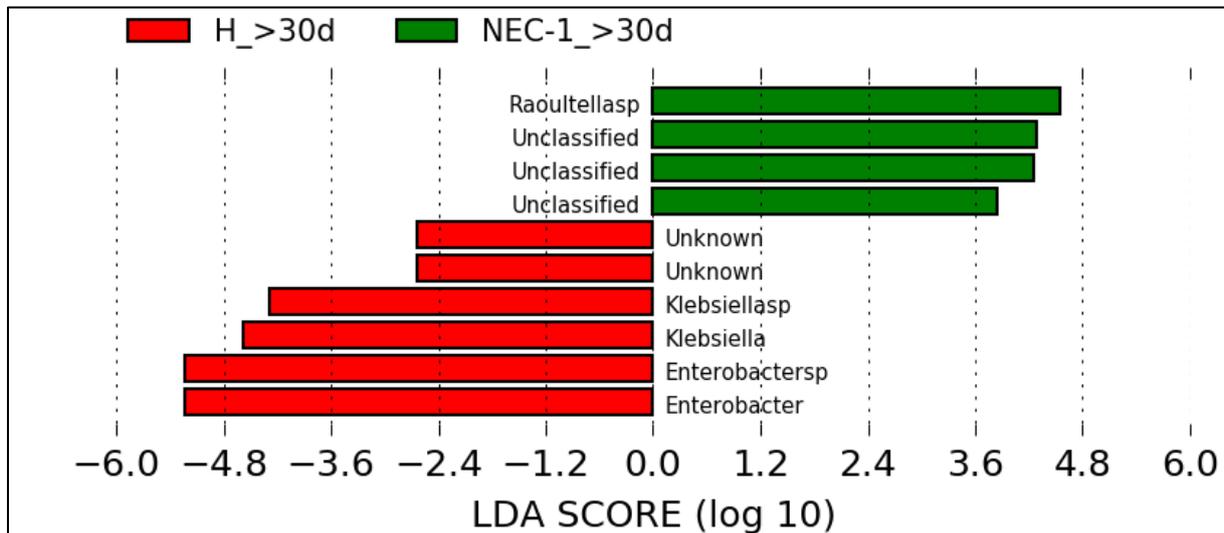


Figure 27 : Analyse structurelle du microbiote intestinal pendant le deuxième mois de vie par le score de LDA. En rouge sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe témoin comparativement au groupe des entéropathes; en vert sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes comparativement au groupe témoins. N=11 pour H et N=6 pour NEC-1.

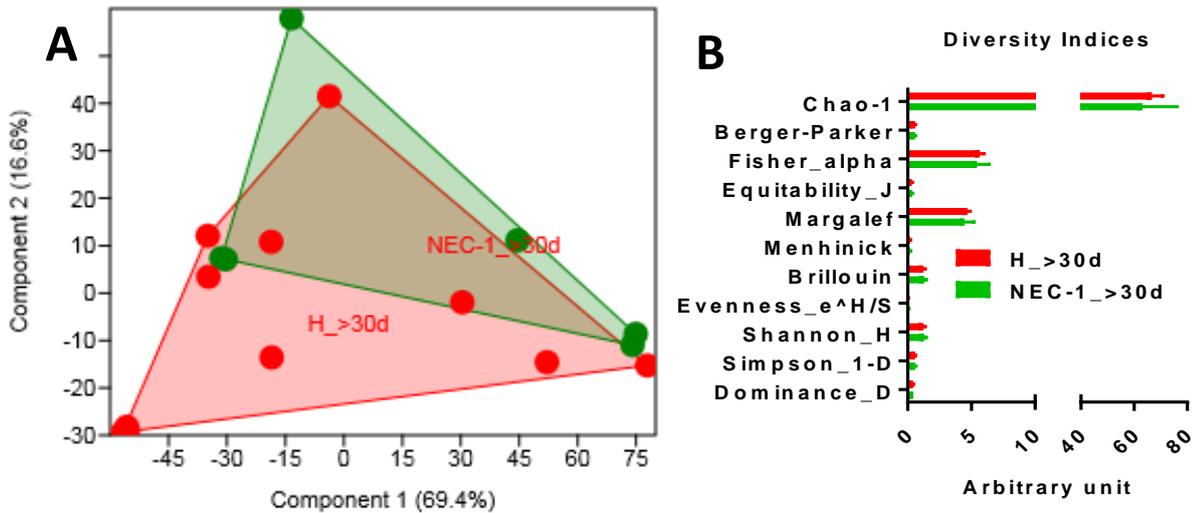


Figure 28 : Analyse structurale du microbiote au cours du deuxième mois de vie. Analyse en composantes principales (PCA) du microbiote intestinal (A) ; Indices de diversité du microbiote intestinal (B). N=11 pour H et N=6 pour NEC-1.

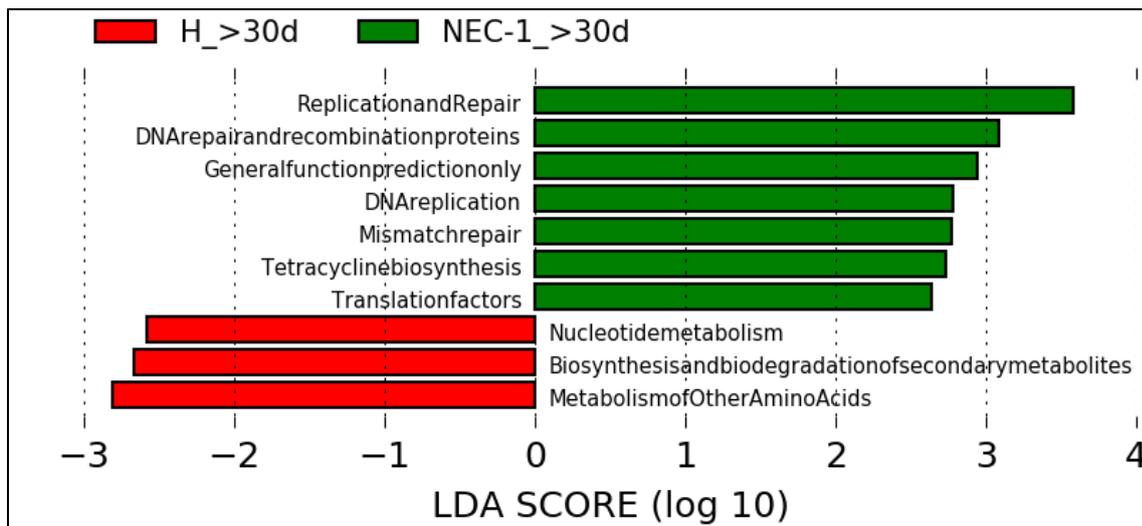


Figure 29 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal pendant le deuxième mois de vie avec le score LDA pour les voies microbiennes prédictives (P<0,01). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des témoins par rapport au groupe des entéropathes et en vert sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le groupe des entéropathes par rapport aux témoins. N=11 pour H et N=6 pour NEC-1.

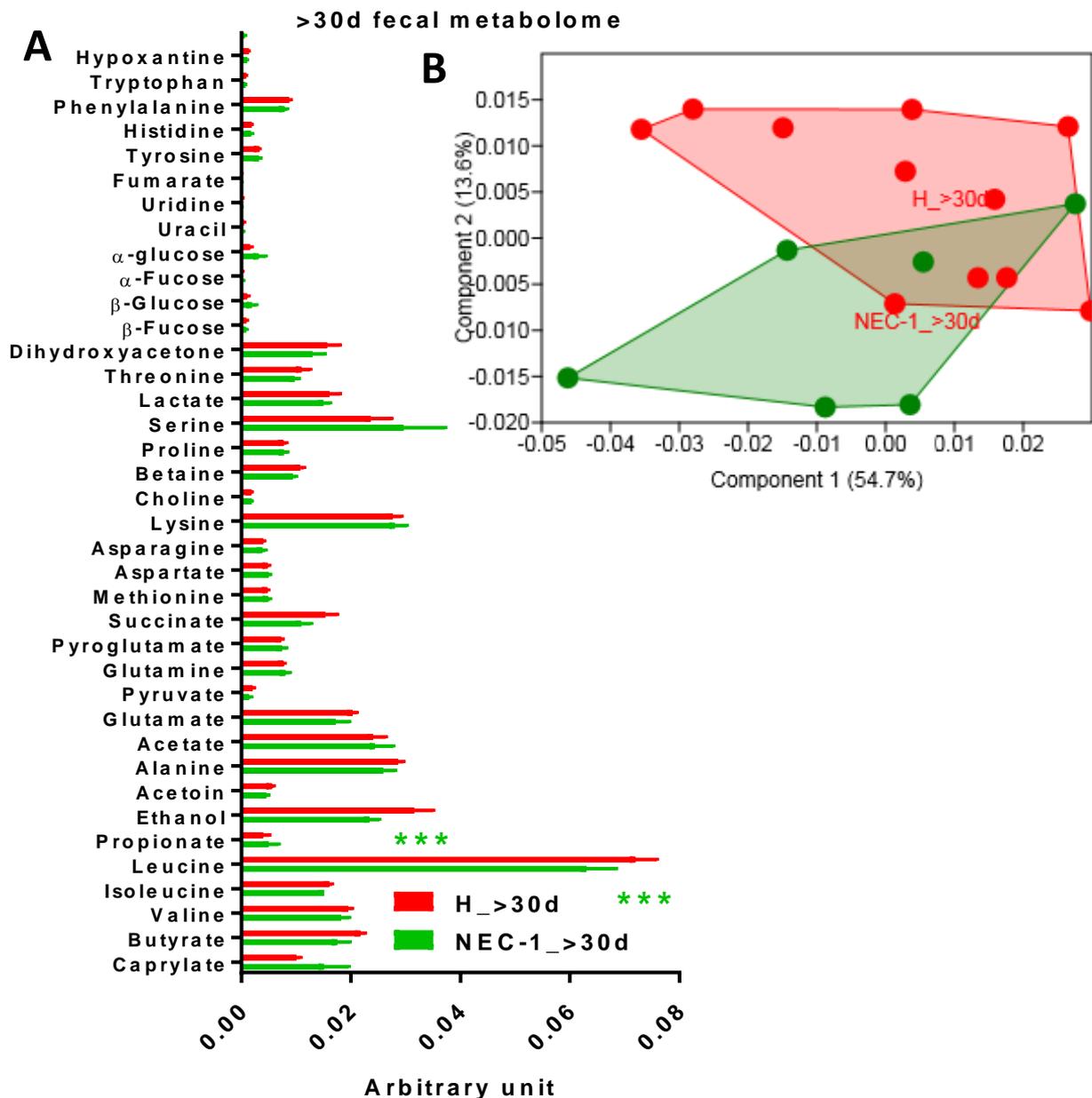


Figure 30 : Analyse du métabolome fécal au cours du deuxième mois de vie. Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et de la PCA (B). Chaque point représente un échantillon, les points rouges correspondant à un échantillon du groupe témoin et les points verts correspondant à un échantillon du groupe des entéropathes. *ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini. Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes (<0,05) ; N=11 pour H et N=6 pour NEC-1.**

Tableau 10 : Analyse comparative du microbiote fécal du groupe des entéropathes et du groupe des témoins (analyses structurale, fonctionnelle et métabolomique fécales). Seules les augmentations dans les profils microbiens au niveau structurel, fonctionnel ou les métabolites fécaux sont indiquées.

Étapes de vie	Entéropathes	Témoins
Type d'analyse comparative	<i>nombre d'échantillons</i> <i>n=27</i>	<i>nombre d'échantillons</i> <i>n=53</i>
1^{ère} décade (J1-J10)	<i>n= 4</i>	<i>n=15</i>
Indice de diversité	-	Indice de diversité Chao1
Analyse structurale du microbiote fécal	-	<i>Klebsiella</i>
Analyse fonctionnelle du microbiote fécal	Réplication, recombinaison réparation des protéines	Métabolisme des cofacteurs et vitamines Métabolisme des porphyrines, glycine, sérine et thréonine
Analyse du métabolome fécal	-	-
2^{ème} décade (J11-J20)	<i>n=10</i>	<i>n=14</i>
Indice de diversité	Indice de diversité Chao1	-
Analyse structurale du microbiote fécal	<i>Streptococcaceae</i> <i>Micrococcaceae</i>	-
Analyse fonctionnelle du microbiote fécal	-	-
Analyse du métabolome fécal	Sérine	-
3^{ème} décade (J21-J30)	<i>n=7</i>	<i>n=13</i>
Indice de diversité	-	-
Analyse structurale du microbiote fécal	<i>Bacillales</i> <i>Staphylococcaceae</i> <i>Streptococcus</i> <i>Bacteroidetes</i>	<i>Klebsiella</i> <i>Raoultella</i>
Analyse fonctionnelle du microbiote fécal	Métabolisme de la thiamine, des composés du sélénium, germination, biosynthèse des stéroïdes	Signalisation cellulaire Canaux ioniques Repliements protéiques et processus associés
Analyse du métabolome fécal	-	-
Deuxième mois de vie	<i>n=6</i>	<i>n=11</i>
Indice de diversité	-	-
Analyse structurale du microbiote fécal	<i>Raoultella</i>	<i>Klesiella</i> <i>Enterobacter</i>
Analyse fonctionnelle du microbiote fécal	Réplication réparation ADN Recombinaison des protéines	Métabolisme des acides aminés Biosynthèse et biodégradation de métabolites secondaires
Analyse du métabolome fécal	-	Leucine Ethanol

3. Impact spécifique de l'entéropathie sur la composition structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal ainsi que du métabolome fécal au cours des deux premiers mois de la vie, comparativement aux enfants témoins.

Pour étudier l'impact de l'entéropathie sur la composition structurale et fonctionnelle du microbiote intestinal ainsi que du métabolome fécal au cours des deux premiers mois de la vie, nous avons mené une étude intragroupe sur les entéropathes et sur les enfants témoins, selon les quatre groupes mentionnés ci-dessus : 1-10j, 11-20j, 21-30j et >30j. Nous n'avons observé aucun changement taxonomique significatif dans le microbiote intestinal des enfants ECUN-1. Il est intéressant de noter que le groupe ECUN-1_21-30j avait un microbiome intestinal spécifique dont la fonction la plus régulée était liée à l'enzyme de restriction (**Fig. 31**). Les quatre groupes ECUN-1 différaient également en termes de métabolome fécal : de leucine, d'éthanol et de sérine (**Fig. 32**). Sur la base de ces résultats, nous avons effectué une analyse d'enrichissement à deux niveaux : i) ensembles de métabolites associés à la voie métabolique (**Fig. 33**) et ii) ensembles de métabolites associés au polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) (**Fig. 34**) [147].

L'évolution du profil métabolique de l'ECUN-1 (taux plus élevés de l'éthanol et de la sérine) a été associée de façon significative à la dégradation de l'homocystéine et à la biosynthèse de la phosphatidyléthanolamine (**Fig. 33**), la sérine étant le métabolite le plus lié aux SNP associés à ECUN-1 (**Fig. 34**).

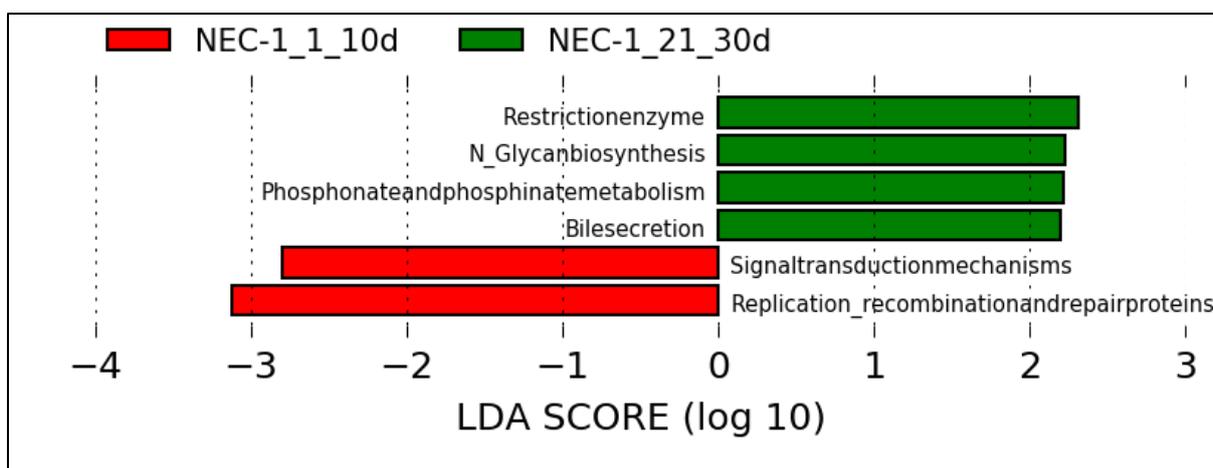


Figure 31 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal du groupe des entéropathes en fonction des décades de vie, avec le score LDA pour les voies microbiennes prédictives (P<0,01). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le sous-groupe première décade de vie (1-10d) par rapport aux autres sous-groupes (2^{ème} (11-20d) et 3^{ème} (21-30d) décades de vie et deuxième mois de vie) ; en vert sont représentées les voies fonctionnelles augmentées dans le sous-groupe 3^{ème} décade de vie (21-30d) par rapport aux autres sous-groupes. N=23 pour NEC-1.

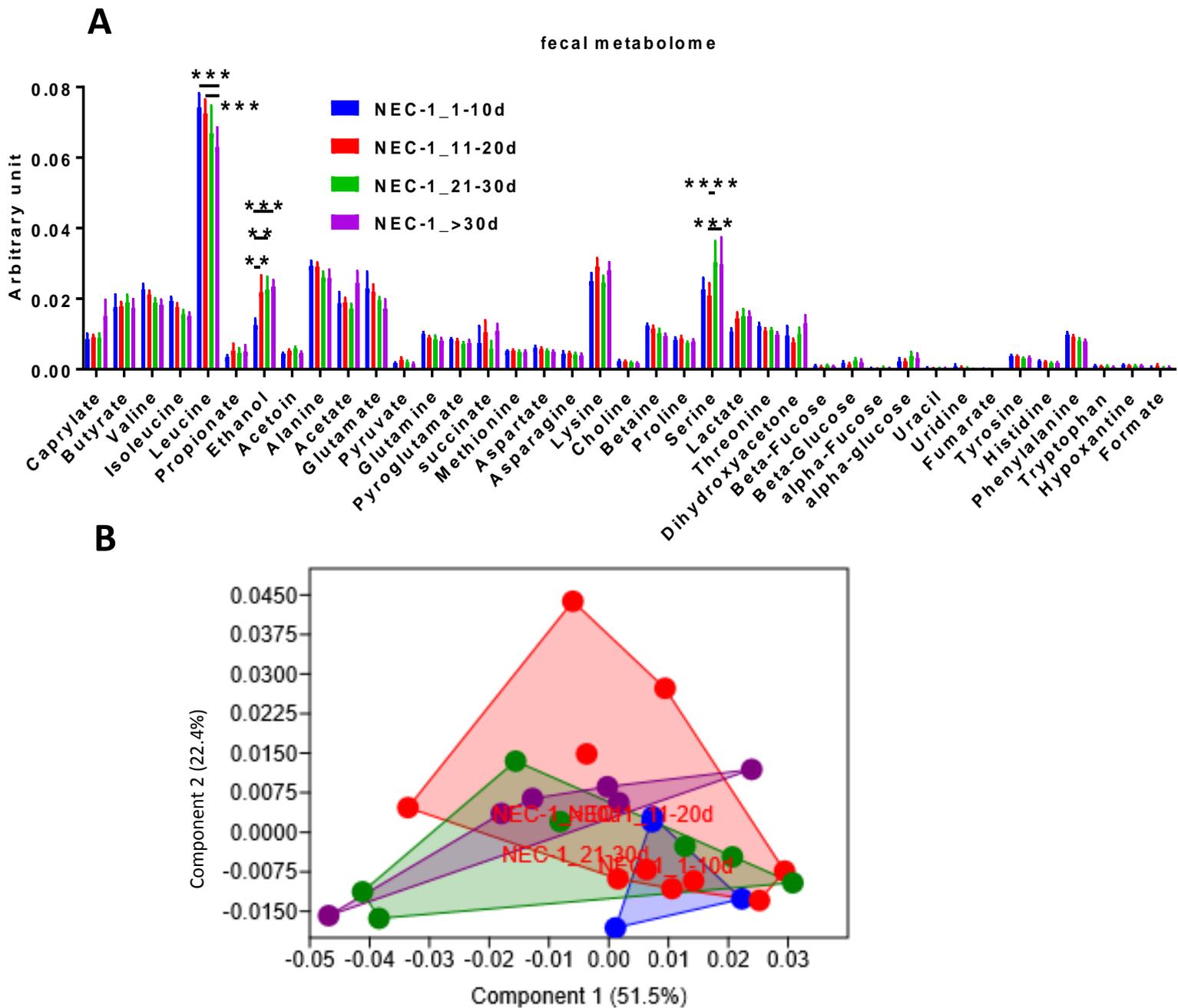


Figure 32 : Analyse comparative du métabolome intestinal du groupe des entéropathes (NEC-1) en fonction des décades de vie. Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et de la PCA (B). Chaque point représente un échantillon, les points bleus correspondant à un échantillon du sous-groupe de la 1^{ère} décade de vie (1-10d), les points rouges ceux de la 2^{ème} décade de vie (11-20d), les points verts de la 3^{ème} décade de vie (21-30d) et les points violets du 2^{ème} mois de vie (>30d). ***ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini. Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes (<0,05). N=23 pour NEC-1.

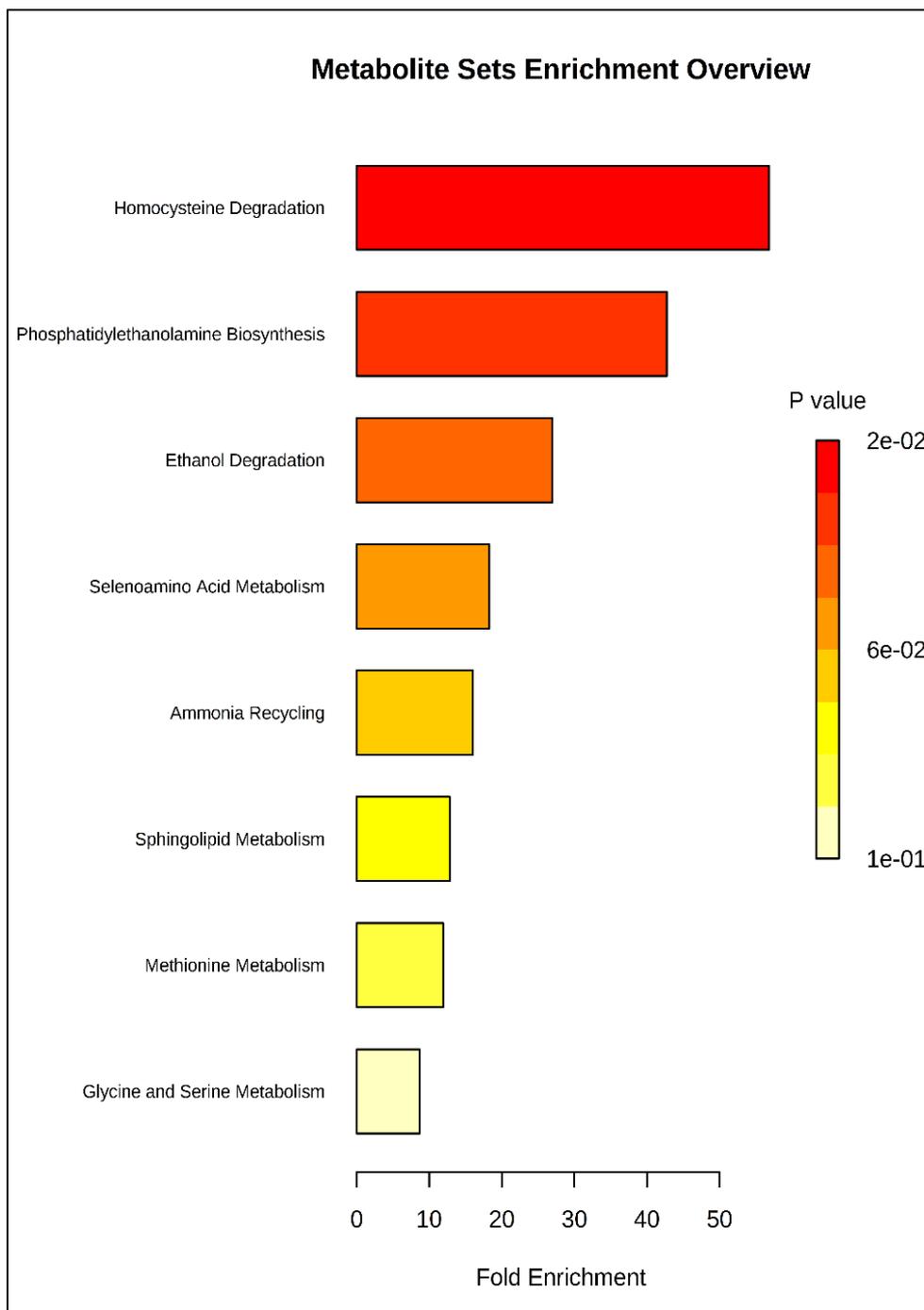


Figure 33 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des entéropathes par analyse de l'ensemble des métabolites associés à la voie métabolique. Cette analyse a été effectuée grâce à la méthode MSEA (metabolite set enrichment analysis). Cette méthode utilise les concentrations de métabolites au lieu des valeurs d'expression de gènes et des groupes (sets) de métabolites créés à partir des métabolites appartenant à la même voie métabolique. MSEA permet le calcul d'enrichissement en utilisant la topologie des voies métaboliques. <https://www.metaboanalyst.ca> [147].

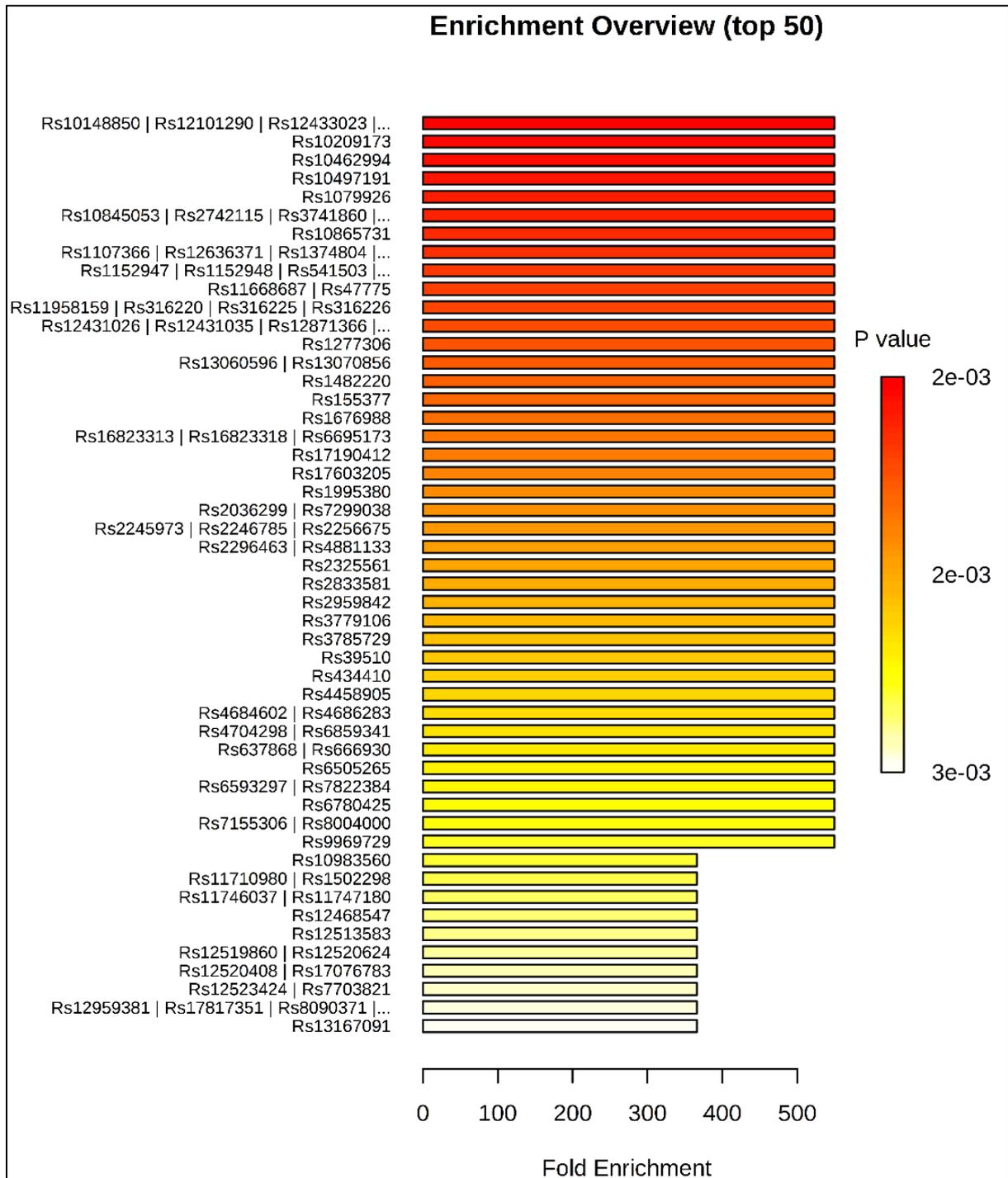


Figure 34 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des entéropathes par analyse de la sérine associée au polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP). Cette analyse a été effectuée selon l'étude d'une association entre génome et métabolome (metabome Genome Wide Association Study: mGWAS). Les caractéristiques du métabolome sont testées pour déterminer leur association avec des variantes génétiques, comme les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP). <https://www.metaboanalyst.ca> [147].

Il est intéressant de noter que chez les enfants témoins, les quatre groupes mentionnés ci-dessus ne différaient pas non plus en termes de microbiote intestinal et de microbiome, mais seulement en ce qui concerne leur métabolome fécal (**Fig.35**). L'évolution du profil métabolomique témoin (augmentation de la leucine, de l'éthanol et de la dihydroxyacétone) a été associée de façon significative à la dégradation de la valine, de la leucine et de l'isoleucine et au métabolisme des corps cétoniques (**Fig.36**), la leucine étant le métabolite le plus lié au SNP (**Fig.37**), associé au groupe témoin.

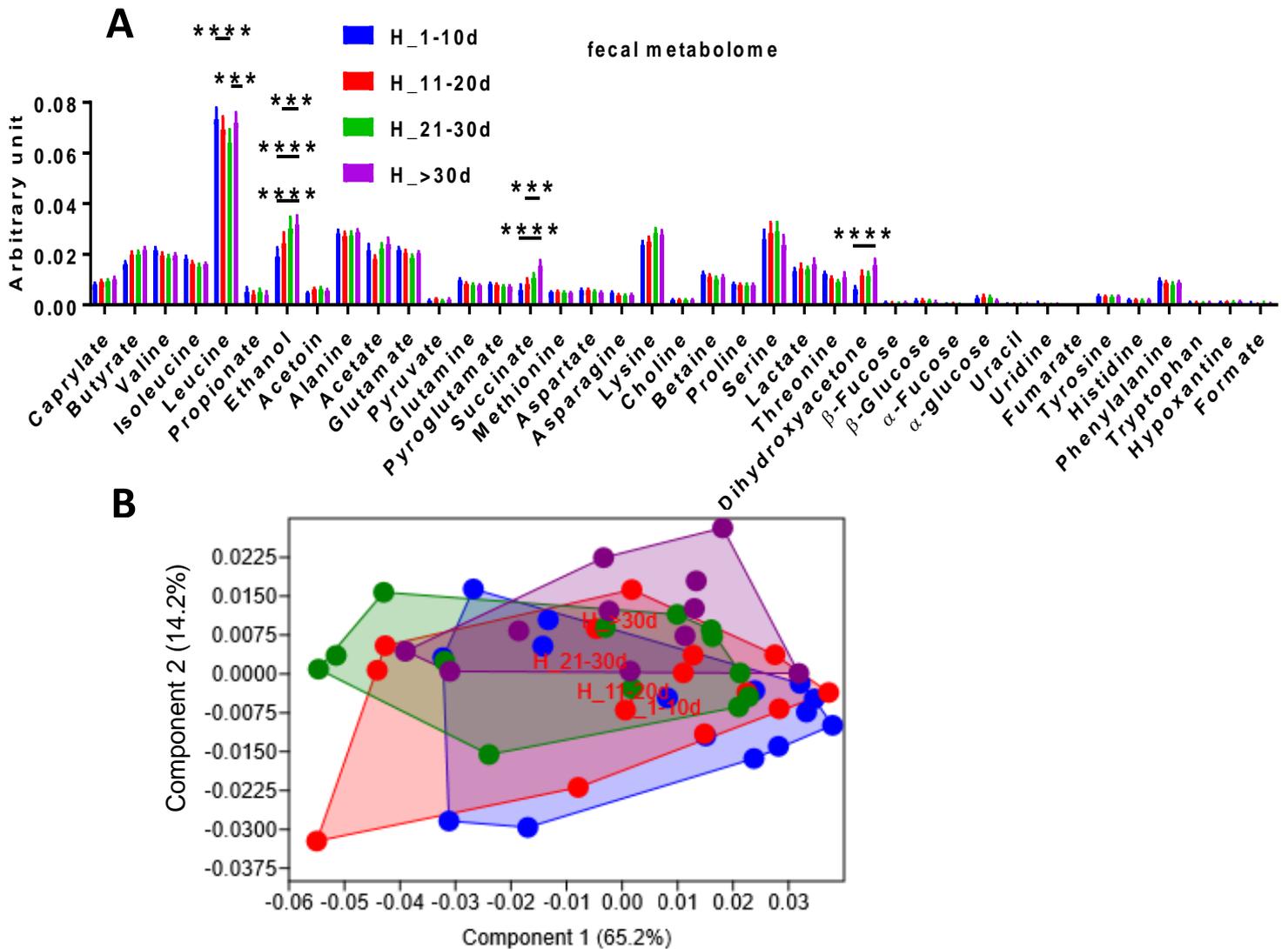


Figure 35 : Analyse comparative du métabolome fécal chez les nouveau-nés témoins (H) en fonction des décades de vie. Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et de la PCA (B). Chaque point représente un échantillon, les points bleus correspondant à un échantillon du sous-groupe de la 1^{ère} décade de vie (1-10d), les points rouges ceux de la 2^{ème} décade de vie (11-20d), les points verts de la 3^{ème} décade de vie (21-30d) et les points violets du 2^{ème} mois de vie (>30d). ***ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini. Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes (<0,05). N=57 pour H.

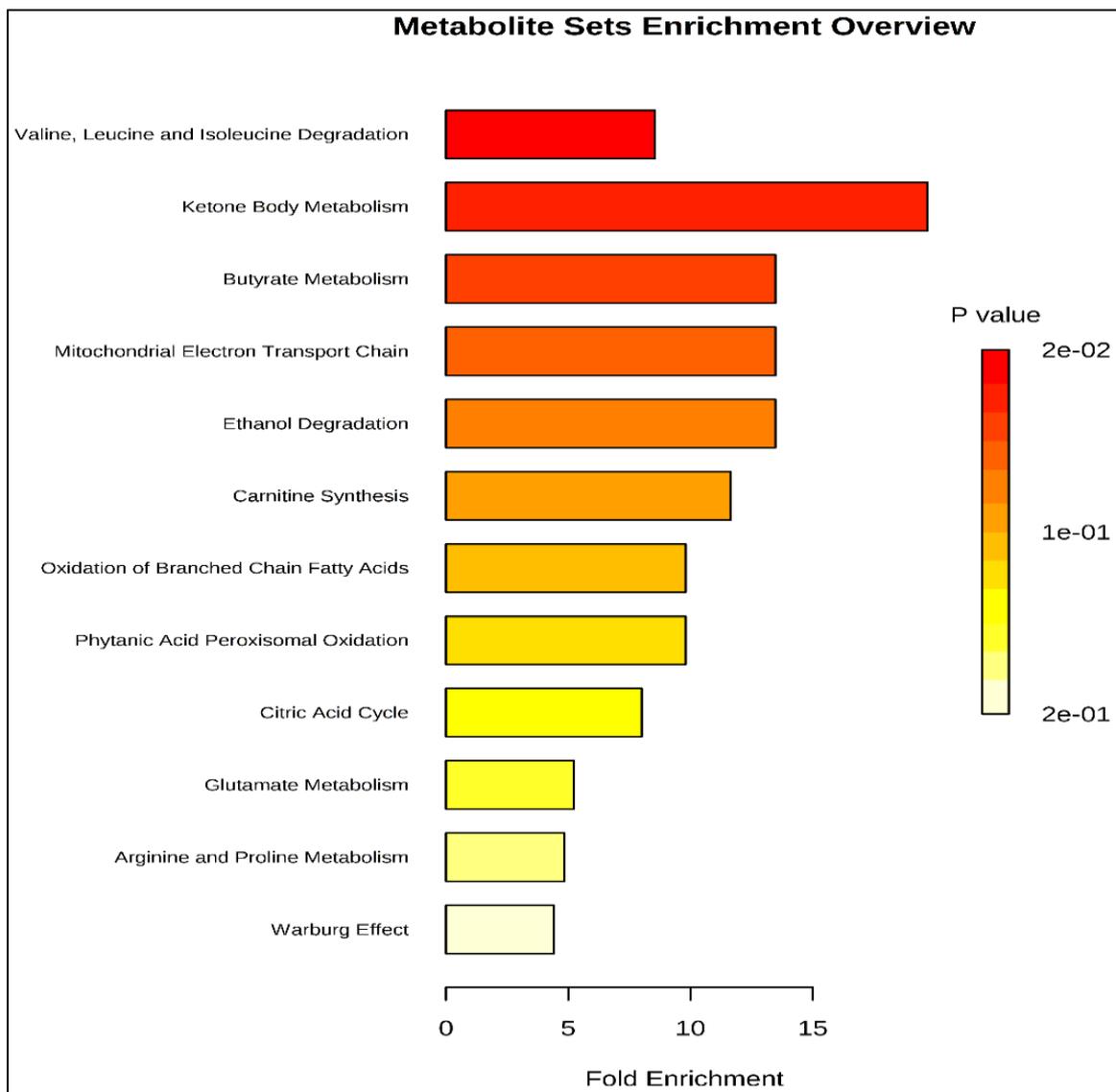


Figure 36 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe témoins par analyse de l'ensemble des métabolites associés à la voie métabolique. Cette analyse a été effectuée grâce à la méthode MSEA (metabolite set enrichment analysis). Cette méthode utilise les concentrations de métabolites au lieu des valeurs d'expression de gènes et des groupes (sets) de métabolites créés à partir des métabolites appartenant à la même voie métabolique. MSEA permet le calcul d'enrichissement en utilisant la topologie des voies métaboliques. <https://www.metaboanalyst.ca>.

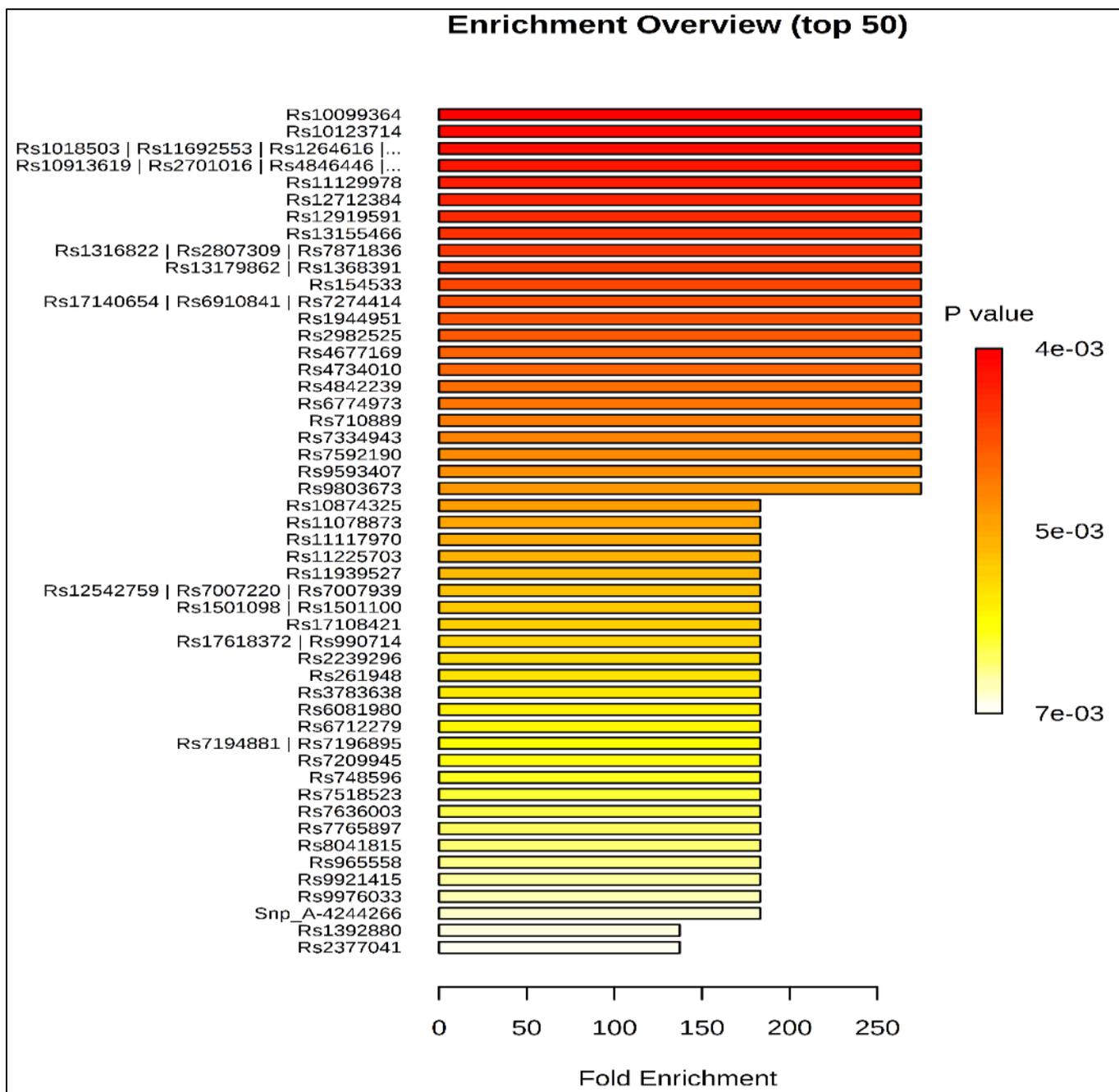


Figure 37 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des témoins par analyse de la leucine associés au polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP). Cette analyse a été effectuée selon l'étude d'une association entre génome et métabolome (metabome Genome Wide Association Study: mGWAS). Les caractéristiques du métabolome sont testées pour déterminer leur association avec des variantes génétiques, comme les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP). <https://www.metaboanalyst.ca>.

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que : 1) il existe une évolution intragroupe différente entre ECUN-1 et les enfants témoins en ce qui concerne le microbiote intestinal et le microbiome et 2) le microbiome ECUN-1 semble plus sensible aux facteurs liés aux mères.

4. Facteurs maternels et infantiles influençant le microbiote intestinal, le microbiome et le métabolome fécal pendant l'ECUN-1.

Une fois identifiés les profils microbiens du microbiote intestinal et du métabolome fécal associés au ECUN-1, nous avons cherché à identifier quel facteur lié à la mère et à l'enfant pouvait affecter les paramètres rapportés ci-dessus.

Nous avons analysé six conditions: la présence d'antibiothérapie (ABx) néonatale, le traitement ABx sur la mère, l'accouchement (césarienne (C-sec) vs. accouchement vaginal (VB), le très faible poids à la naissance (VLBW), le poids extrêmement faible à la naissance (ELBW) et l'âge gestationnel (GA) > ou \leq 28 semaines. Seul le traitement néonatal ABx a affecté le microbiote intestinal à la fois chez les entéropathes et les enfants témoins (Fig.38). En revanche, tous les facteurs, à l'exception du VLBW, ont affecté le microbiome intestinal (Fig.39-43). L'accouchement, l'ELBW et l'AG n'ont affecté le microbiome intestinal que chez les enfants entéropathes (Fig.41-43).

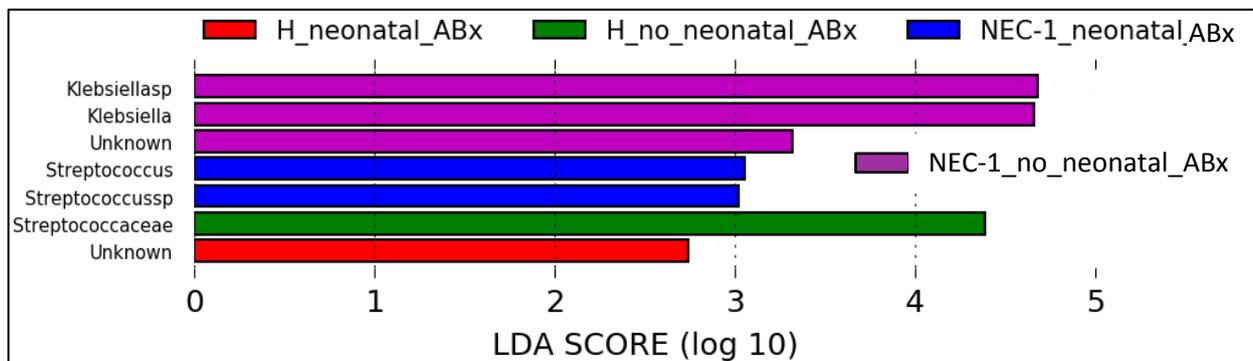


Figure 38 : Comparaison du microbiote des enfants entéropathes (NEC-1) et des témoins (H) en fonction de leur exposition néonatale aux antibiotiques par le score LDA. En rouge sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe témoin avec une exposition néonatale aux antibiotiques (H-neonatal-ABx) comparativement aux autres groupes; en vert sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe témoins n'ayant pas reçu d'antibiothérapie néonatale (H-no-neonatal ABx) comparativement aux autres groupes, en bleu sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes ayant reçu une antibiothérapie néonatale (NEC-1-neonatal ABx) comparativement aux autres groupes et en violet sont représentés les profils microbiens qui sont augmentés dans le groupe des entéropathes n'ayant pas reçu une antibiothérapie néonatale (NEC-1-no-neonatal-ABx) comparativement aux autres groupes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

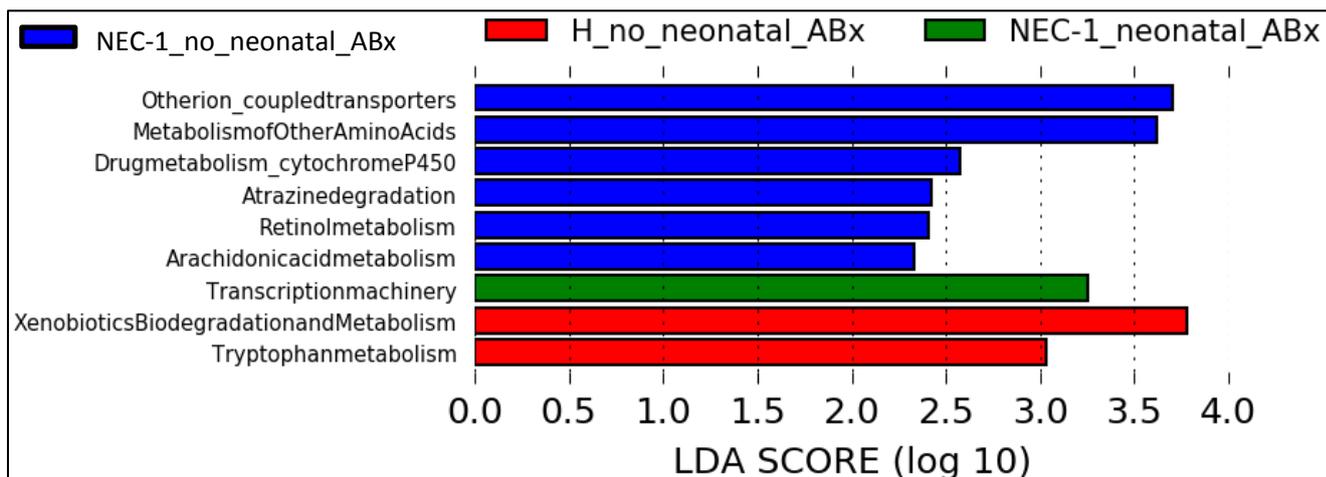


Figure 39 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction de l'exposition néonatale aux antibiotiques avec le score LDA pour les voies microbiennes prédictives ($P < 0,01$). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des témoins sans exposition néonatale aux antibiotiques (H-no-neonatal-ABx) comparativement aux autres groupes; en vert sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes ayant reçu une antibiothérapie néonatale (NEC-1-neonatal-ABx) comparativement aux autres groupes, en bleu sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes n'ayant pas reçu d'antibiothérapie néonatale (NEC-1-no-neonatal-ABx) comparativement aux autres groupes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

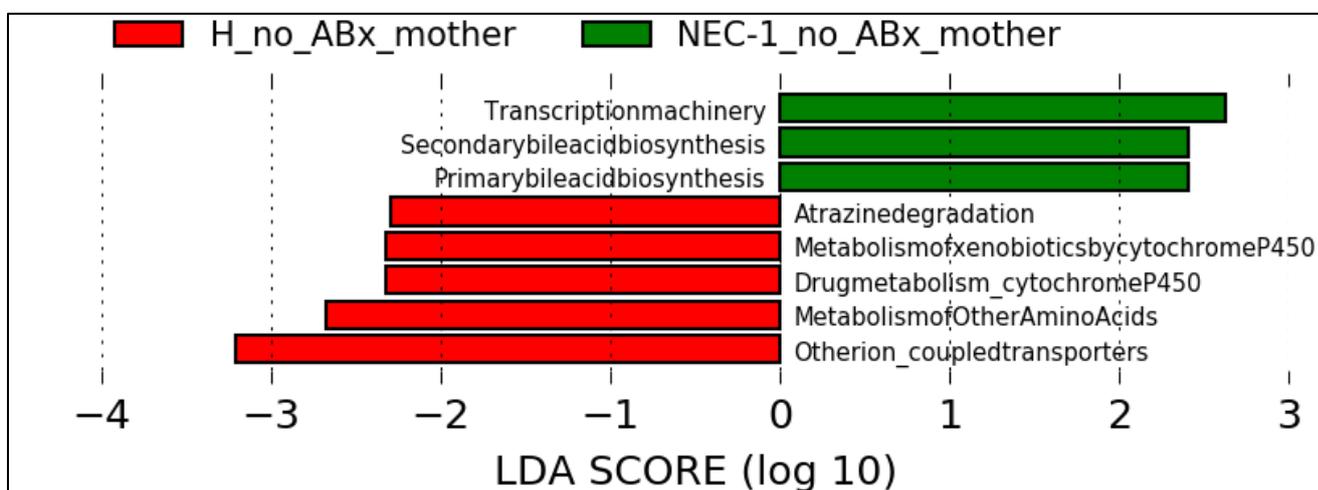


Figure 40 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction de l'exposition maternelle aux antibiotiques (ABx-mother) représentée par le score LDA pour les voies microbiennes prédictives ($P < 0,01$). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des témoins sans exposition maternelle aux antibiotiques (H-no-ABx-mother) comparativement aux autres groupes; en vert sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes sans exposition maternelle aux antibiotiques (NEC-1-no-ABx-mother) comparativement aux autres groupes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

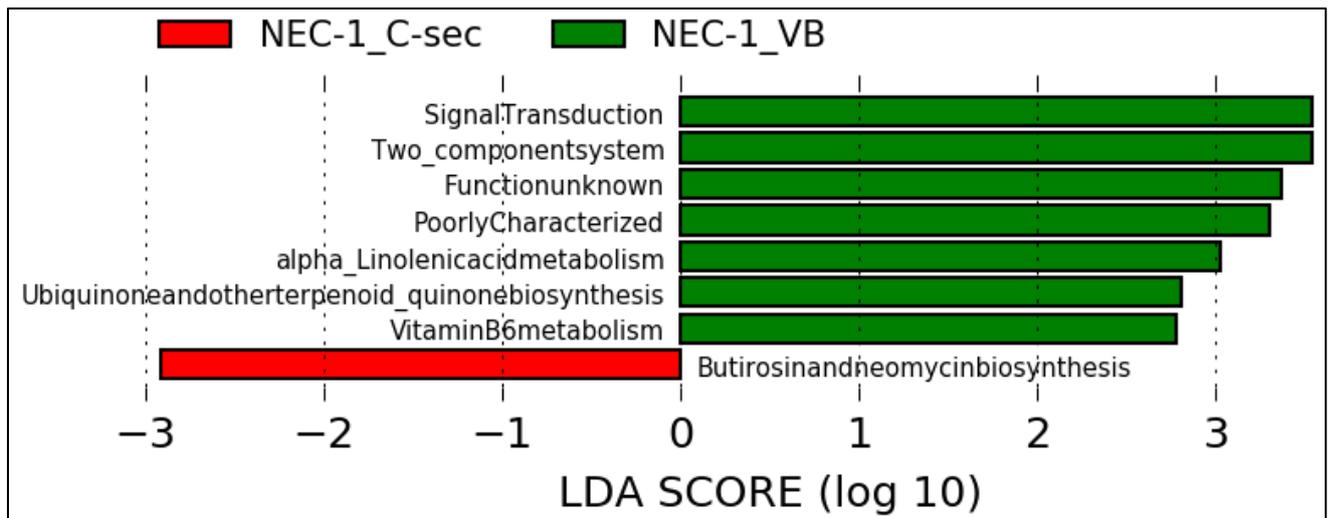


Figure 41 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction du mode d'accouchement représentée par le score LDA pour les voies microbiennes prédictives ($P < 0,01$). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes nés par césarienne (NEC-1-C-sec) comparativement aux autres groupes; en vert sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes nés par voie basse (NEC-1-VB) comparativement aux autres groupes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

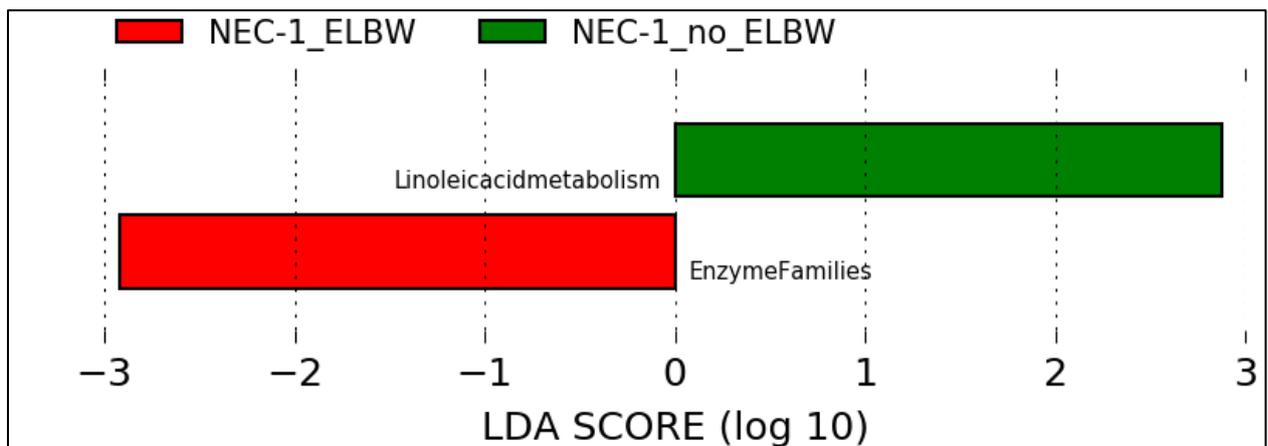


Figure 42 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction du poids de naissance (ELBW pour Extremely Low Birth Weight = poids de naissance < 1000g) représentée par le score LDA pour les voies microbiennes prédictives ($P < 0,01$). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes ELBW (NEC-1-ELBW) comparativement aux autres groupes; en vert sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes non ELBW (NEC-1-no-ELBW) par rapport aux autres groupes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

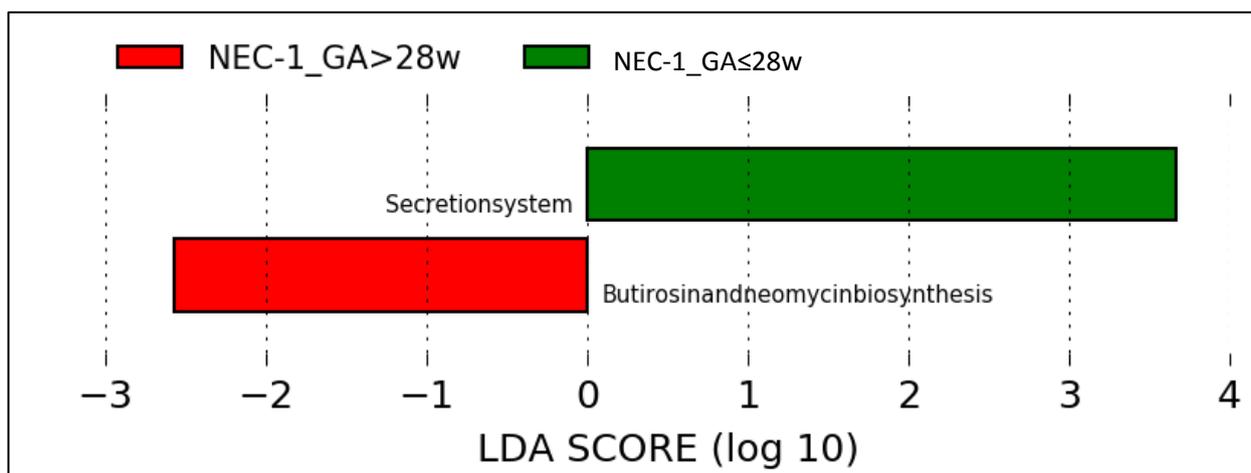


Figure 43 : Analyse fonctionnelle du microbiote intestinal en fonction l'âge gestationnel (GA) représentée par le score LDA pour les voies microbiennes prédictives ($P < 0,01$). En rouge sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes nés à plus de 28 semaines d'aménorrhée (NEC-1-GA>28w) comparativement aux autres groupes; en vert sont représentées les voies fonctionnelles qui sont augmentées dans le groupe des entéropathes nés à moins de 28 SA (NEC-1- GA≤28w) par rapport aux autres groupes. N=53 pour H et N=27 pour NEC-1.

De plus, tous les facteurs, à l'exception du traitement néonatal ABx et de l'ELBW, ont affecté le métabolome fécal (**Fig.44**). Ensuite, nous avons effectué une analyse d'enrichissement sur l'ensemble des voies associées aux métabolites, basée sur la figure dans laquelle il y a une augmentation de l'éthanol et du succinate dans le groupe ECUN-1_GA≤28w soit les entéropathes nés le plus prématurément. Nous avons constaté que les corps cétoniques et le métabolisme du butyrate étaient les deux voies métaboliques les plus significativement associées à cet ensemble métabolomique (**Fig.45**)

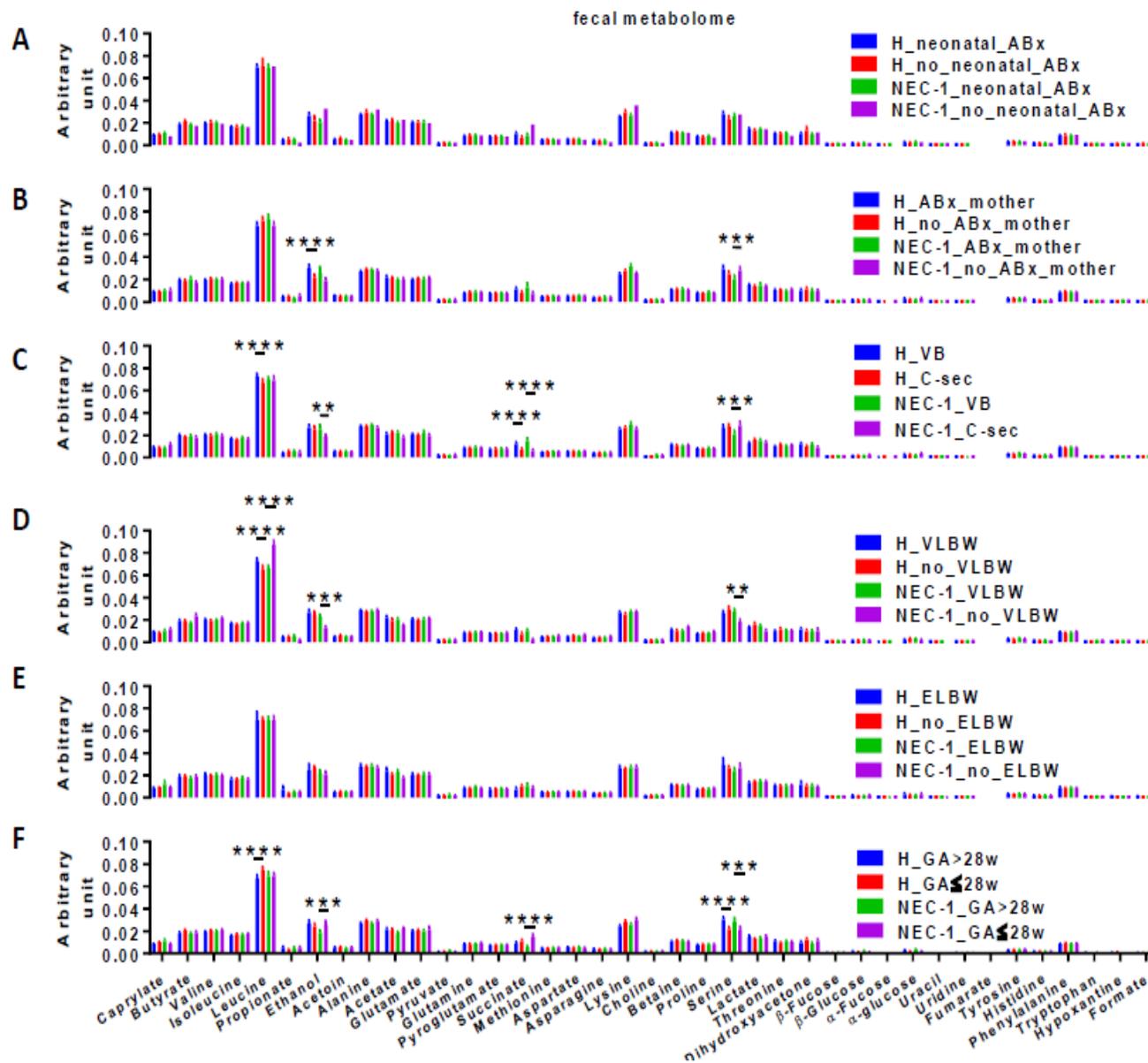


Figure 44 : Facteurs maternels et infantiles influençant le métabolome fécal. Histogramme de l'ensemble des métabolites fécaux (A) et de la PCA (B). ***ANOVA bidirectionnelle suivie d'une procédure d'augmentation linéaire en deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples en contrôlant le taux de fausses découvertes (<0,05).

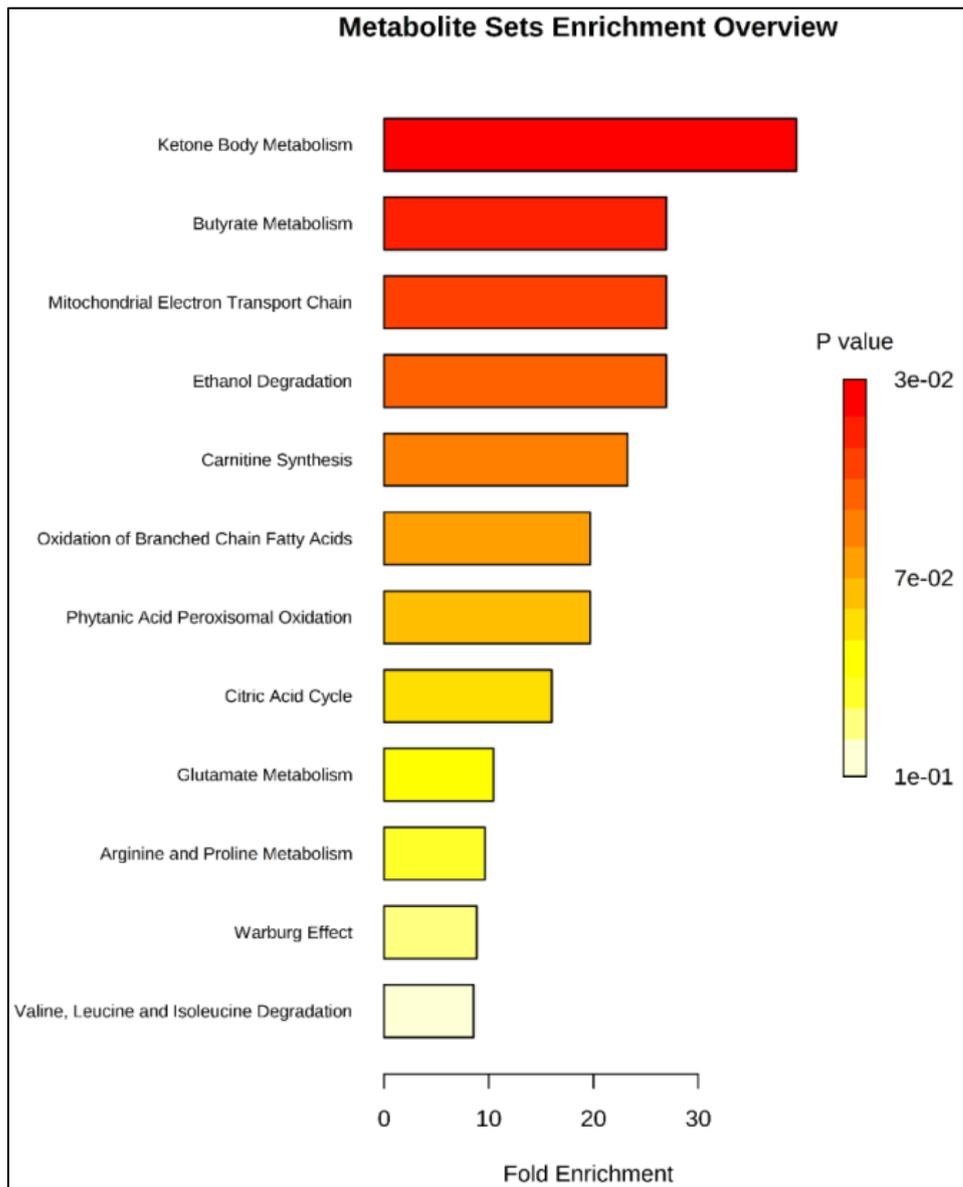


Figure 45 : Analyse d'enrichissement du métabolome intestinal dans le groupe des entéropathes nés avant 28 semaines d'aménorrhée par analyse de l'ensemble des métabolites associés à la voie métabolique. Cette analyse a été effectuée grâce à la méthode MSEA (metabolite set enrichment analysis). Cette méthode utilise les concentrations de métabolites au lieu des valeurs d'expression de gènes et des groupes (sets) de métabolites créés à partir des métabolites appartenant à la même voie métabolique. MSEA permet le calcul d'enrichissement en utilisant la topologie des voies métaboliques. <https://www.metaboanalyst.ca>.

VII. DISCUSSION

A. Facteurs cliniques et colonisation intestinale associés à l'entéropathie

Le stade I de l'ECUN est un stade qui n'est pas individualisé et considéré dans les études s'intéressant à l'ECUN. L'hypothèse de notre étude était que certains facteurs cliniques pouvaient être en lien avec une modification de la colonisation intestinale des nouveau-nés prématurés et la survenue d'une entéropathie. Pour cela nous avons mené une étude cas-témoins nichée dans une étude prospective monocentrique.

Dans notre étude nous avons identifié une association entre l'entéropathie et un certain nombre de facteurs relatifs à l'enfant et aux évènements périnataux (lactates au cordon, nombre de jours sous antibiotiques et le nombre de bactériémie, volume d'alimentation entérale à J7 de vie, âge de vie où l'alimentation entérale est complète). Une étude suédoise récente, ayant inclus le plus grand nombre de cas d'ECUN et de contrôles, s'est intéressée à l'identification de facteurs associés au développement de l'ECUN. Dans l'ensemble de la population étudiée, l'analyse multivariée a montré des facteurs cliniques indépendamment associée à l'ECUN tels que : l'allo-immunisation, l'anoxo-ischémie périnatale, les troubles du rythme cardiaque fœtal, une naissance par césarienne, une infection néonatale y compris septicémie, la transfusion d'érythrocytes, la persistance du canal artériel, la notion de malformation cardiaque, de malformation gastro-intestinale ou anomalie chromosomique. Des associations négatives ont été trouvées pour le poids maternel, la pré-éclampsie, l'infection urinaire maternelle, la prématurité, la rupture des membranes et le poids à la naissance [150]. L'hypothèse de la contribution des lésions ischémiques hypoxiques à la pathogenèse de la NEC est moins considérée ces dernières années. Cependant, il est très probable que la micro-vascularisation de l'intestin soit affectée en tant que produit final de la cascade inflammatoire, aboutissant aux lésions intestinales observées dans l'ECUN, y compris dans le premier stade d'ECUN suspectée [151]. Tous les modèles animaux expérimentaux mimant l'ECUN associent une mise en condition hypoxique pour les animaux, +/- associée à une alimentation hyperosmolaire et à d'autres conditions comme l'hypothermie [152].

Le dosage des lactates au cordon est un reflet du métabolisme anaérobie *perpartum* [153]. Dans notre étude, le taux de lactates au cordon plus élevé chez les entéropathes est positivement associé au développement de l'entéropathie. L'hypothèse d'une contribution de

lésions hypoxiques survenant *in utero* ou au moment de l'accouchement n'est donc pas exclue concernant la survenue d'une entéropathie. Ce facteur est peu pris en compte dans les études s'intéressant à la physiopathologie de l'entérocolite [150]. D'un point de vue expérimental, nous pourrions utiliser un modèle murin d'hypoxie *in utero*, doser les lactates au cordon après césarienne et voir si ces conditions induisent une ECUN chez le nouveau-né.

La faible taille de notre cohorte est une limite à l'identification d'autres facteurs cliniques associés positivement à la survenue de l'entéropathie du nouveau-né prématuré. Le lien entre la rapidité d'alimentation entérale dans les 7 premiers jours de vie et le développement de l'entéropathie a déjà été souligné dans de nombreuses études [120, 154]. Dans notre étude, les nouveau-nés présentant une entéropathie (médiane de survenue à 12 jours de vie) avaient un volume d'alimentation entérale inférieur aux témoins. Dans les cas d'ECUN prouvée (stade II et III), un faible volume d'alimentation entérale versus un volume plus important dans les premiers jours de vie n'est pas un facteur protecteur de la survenue de cette pathologie. De plus, il prolonge la durée d'hospitalisation et majore le risque d'infections [154].

Au cours des dix premiers jours de vie, la comparaison des profils microbiens entre entéropathes et témoins montrent des différences significatives au niveau fonctionnel et non au niveau taxonomique. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les nouveau-nés prématurés ont une colonisation microbienne intestinale plus tardive que les nouveau-nés à terme [6, 32, 68]. La faible colonisation et la grande variabilité intra-groupe dans les premiers jours de vie ne permettaient pas de mettre en évidence des différences de profils microbiens inter-groupes dans notre cohorte. Dans d'autres conditions notamment nutritionnelles, des différences fonctionnelles du microbiote intestinal ont déjà été observées, alors même qu'il n'y avait pas de différence observée au niveau de la structure de ce microbiote intestinal [155].

La prédominance de Streptocoque et de Staphylocoque chez les entéropathes s'installe dès la deuxième décade et se confirme après trois semaines de vie. L'exposition aux antibiotiques dans la première semaine de vie ne diffère pas entre les deux groupes. Par contre, les nouveau-nés entéropathes ont été beaucoup plus exposés aux glycopeptides. Ces antibiotiques ciblent les Staphylocoques mais sont aussi actifs sur d'autres cocci Gram positif. Cependant, l'administration par voie veineuse de ces antibiotiques qui diffusent mal au niveau de la lumière intestinale pourrait avoir un effet sub-inhibiteur sur ce microbiote [156]. Bien qu'une étude récente ait montré un impact moins important de la vancomycine par rapport aux

bétalactamines sur la richesse du microbiote intestinal de nouveau-nés prématurés, on pourrait supposer que ces antibiotiques aient un impact sur la diversité de ce microbiote [69]. En effet, en cas d'utilisation d'un traitement antibiotique couramment prescrit (association vancomycine et gentamicine), Gibson *et al.* ont identifié des biomarqueurs génétiques d'espèces et de résistance aux antibiotiques qui peuvent prédire avec une grande précision l'impact à court terme sur la richesse des espèces et donc le potentiel de perturbation du microbiote intestinal en développement chez le prématuré [157]. Une exposition antérieure à la gentamicine et à la vancomycine n'a pas eu d'effet significatif sur la richesse en espèces de l'intestin du nourrisson prématuré dans cette étude. Néanmoins, cela n'exclut pas la possibilité que ces antibiotiques " modulent " le microbiote intestinal pour qu'il réagisse différemment au prochain traitement antibiotique. Il n'est pas possible de réaliser d'étude comparative randomisée sur l'antibiothérapie chez les prématurés mais des modèles animaux pour vérifier les hypothèses générées par cette étude pourraient être instructifs.

Au-delà du premier mois de vie, les Proteobactéries sont identifiées en plus grande quantité chez les entéropathes. Des travaux antérieurs ont trouvé que l'ampicilline et la gentamicine (les antibiotiques les plus couramment utilisés chez les nourrissons dans le cadre de cette étude) ont un effet qui n'est pas uniforme sur la diversité bactérienne, tantôt croissante, tantôt décroissante [69]. Cependant, les antibiotiques modifient les membres du microbiote, ce qui pourrait avoir des effets néfastes sur la santé avec des effets profonds sur le développement et la croissance du système immunitaire [105].

B. Signature métagénomique fonctionnelle du microbiote intestinal et entéropathie

L'analyse métagénomique fonctionnelle microbienne intestinale montre un enrichissement de la voie du métabolisme des acides aminés (valine, leucine et isoleucine) chez les témoins et un enrichissement de la voie du métabolisme des butyrates et des corps cétoniques chez les entéropathes nés avant 28 SA. Le butyrate est un carburant majeur pour les colonocytes et un stimulant majeur pour la formation et l'intégrité des jonctions étroites [158].

De plus, le profil du microbiote intestinal NEC-1 a été associé à la colite ulcéreuse et à la variation génétique de l'hôte dans le gène *anp32e*, codant pour une protéine impliquée dans la cortico-résistance pendant la colite ulcéreuse. Cette protéine est une histone chaperonne qui détache l'histone H2A.Z de la chromatine [159]. L'inactivation du gène codant pour ANP32E chez la souris induit une accumulation de H2A.Z sur l'ensemble du génome au niveau des promoteurs où elle reste bloquée, mais également sa redistribution au niveau de séquences régulatrices. Une dérégulation de l'expression de *anp32e* a été décrite dans diverses tumeurs humaines [160]. Une étude récente de 2017 parue dans le *British Medical Journal* n'a pas identifié la corticothérapie avant la naissance comme un facteur de risque de NEC [161], une meta-analyse plus ancienne avait même identifié la corticothérapie anténatale comme un facteur protecteur de la survenue ultérieure d'une ECUN [162]. Malgré le fait que les souris déficientes en *anp32e* ne présentent aucun signe de maladie, il ne faut pas exclure le rôle de l'*anp32e* dans un modèle d'inflammation intestinale qui imite la colite ulcéreuse [148]. Bien qu'il n'y ait pas de différence en termes d'exposition à une corticothérapie anténatale (**Tableau 2**), la recherche d'un lien entre exposition fœtale aux corticoïdes, entéropathie et le gène *anp32e* mériterait d'être approfondie par une étude plus large.

Un changement fonctionnel microbien a été décrit au sein du groupe des entéropathes et non chez les témoins. Les gènes de la voie des enzymes de restriction sont surexprimés chez les entéropathes entre J21 et J30 de vie. Une bactérie utilise une enzyme de restriction pour se défendre contre les virus bactériens appelés bactériophages, ou phages. Lorsqu'un phage infecte une bactérie, il insère son ADN dans la cellule bactérienne pour qu'elle puisse être répliquée. L'enzyme de restriction empêche la répllication de l'ADN du phage en le coupant en plusieurs morceaux. Les enzymes de restriction ont été nommées en raison de leur capacité à restreindre ou à limiter le nombre de souches de bactériophages qui peuvent infecter une bactérie. Une étude récente a établi que les virus ciblant les bactéries sont présents en

abondance dans l'intestin du nourrisson [163]. Une hypothèse d'interactions entre les virus et les bactéries a été proposée, dans laquelle les deux parties sont capables de moduler leur composition relative et d'influer sur l'état de santé de l'hôte. Immédiatement après la naissance et jusqu'à l'âge de deux ou trois ans, le microbiote intestinal du nourrisson semble être extrêmement dynamique, subissant un processus d'expansion et une diversification rapide pour aboutir à un microbiote ressemblant à celui d'un adulte. Les facteurs guidant le développement précoce du microbiote intestinal sont encore mal connus. Cependant des études récentes ont indiqué que le virome intestinal joue un rôle dans cette dynamique microbienne [163, 164]. Par ailleurs, une étude s'intéressant à l'effet d'antibiotique sur le cycle de vie des phages a révélé que la présence d'une concentration sub-inhibitrice en antibiotique permettait d'augmenter significativement la production de phages par la bactérie infectée [165]. Cette étude pilote offre de nouvelles perspectives de recherche sur le lien entre bactériome, virome, exposition aux antibiotiques et développement de l'entéropathie du nouveau-né prématuré. Notre collection de fèces pourrait être utilisée à cette fin.

L'analyse du microbiome a permis d'observer une augmentation de certaines fonctions microbiennes dans les profils microbiens intestinaux des entéropathes notamment les fonctions liées à la réparation de l'ADN. Les mécanismes moléculaires qui lient la réplication et la réparation de l'ADN, le vieillissement, l'inflammation, le métabolisme et la tolérance aux maladies restent très mal définis. Un autre problème est le rôle souvent conflictuel des dommages à l'ADN dans l'inflammation et la modulation de la mort ou de la survie cellulaire. Celles-ci dépendent sans aucun doute du contexte et de l'intensité des dommages. La compréhension des mécanismes de leur modulation par les voies de la réplication et de la réparation de l'ADN sera d'une pertinence majeure. Les progrès dans ce domaine pourraient conduire à des découvertes inédites dans la physiopathologie des organes et des fonctions de l'organisme. De plus, les voies moléculaires impliquées sont susceptibles de constituer de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes pour l'entéropathie du nouveau-né prématuré [166].

Les changements fonctionnels au sein du groupe NEC- 1 sont influencés par des facteurs cliniques tels que l'âge gestationnel, le très petit poids de naissance et la voie d'accouchement. Ces modifications fonctionnelles sont plus stables chez les témoins, ne variant pas en fonction de ces différents facteurs cliniques. Cette particularité a déjà été identifiée dans des études s'intéressant aux changements du microbiome de nouveau-nés

prématurés. La voie d'accouchement n'était pas un facteur influençant le développement de ce microbiome, contrairement à ce qui a été observé chez les nouveau-nés à terme [167].

C. Signature métabolomique fécale et entéropathie

Les divergences au niveau métabolomique n'apparaissent qu'après le deuxième mois de vie et affectent particulièrement le métabolisme des acides aminés. Un lien entre dysbiose microbienne et métabolisme des acides aminés a déjà été établi dans des pathologies métaboliques comme l'obésité ou le diabète [168, 169]. Chez les entéropathes, la colonisation néonatale dysbiotique et/ou le fait d'être alimenté plus tardivement pourrait expliquer les différences observées au niveau métabolomique à partir du deuxième mois de vie. Aucun enfant dans notre cohorte n'a évolué vers un stade II ou III de l'ECUN. Une étude multicentrique, prospective et sur une durée plus longue permettrait d'étayer nos résultats.

La métabolomique non ciblée peut étudier de nombreux métabolites d'un échantillon biologique pour fournir un instantané du métabolisme actif d'un système tel que l'intestin humain. Les profils métaboliques des prématurés de cette étude se sont révélés personnalisés en fonction de leur âge à degré similaire à celui de la composition bactérienne à partir du deuxième mois de vie. Ces résultats sont concordants avec la seule étude s'étant intéressée au métabolome fécal de nouveau-nés prématurés présentant une ECUN ou une infection tardive. Cela contraste avec les résultats d'une étude précédente sur les nourrissons à terme qui a montré que le profil métabolomique était stable et faiblement associé à la composition bactérienne au cours des premières années de vie [170]. Les signatures métaboliques personnalisées d'une maladie sont très prometteuses pour compléter le profil microbien dans les systèmes humains [107, 171]. Cependant, l'analyse des données métabolomiques est un défi parce qu'un éventail de facteurs contribue à l'abondance des métabolites dans les échantillons de matières fécales, y compris le métabolisme bactérien, la biologie de l'hôte et l'apport alimentaire.

Les perspectives de cette étude seraient de faire un transfert du microbiote intestinal des enfants entéropathes dans un modèle de souris axéniques et d'analyser différents paramètres : score clinique d'entérocólite, analyse structurelle et fonctionnelle du microbiote intestinal, analyse métabolomique des fécès, analyse de l'inflammation intestinale, métabolisme glucidique, métabolisme hépatique, profil lipidique.

VIII. CONCLUSION

En conclusion, l'énorme variance observée chez les enfants NEC-1 montre clairement le développement personnalisé de cette affection sévère, en termes de structure et fonction du microbiote intestinal ainsi que du métabolome fécal. Plutôt que de trouver des signatures microbiennes de la maladie, nous avons constaté que le microbiome du nourrisson prématuré et le métabolome étaient personnalisés et que le microbiome intestinal du nourrisson prématuré est enrichi en microbes qui dominent généralement en présence d'antibiotiques. Ces résultats contribuent à l'accroissement des connaissances sur le microbiome du nourrisson prématuré et soulignent l'importance d'une vision personnalisée pour démêler les conséquences du microbiome du nourrisson prématuré sur sa santé.

Notre étude montre l'importance pour les services de néonatalogie de continuer à travailler particulièrement sur deux éléments qui semblent permettre de diminuer le risque d'évolution d'une NEC-1: i) rester vigilant sur les stratégies nutritionnelles (volume d'alimentation entérale dans les premiers jours de vie) notamment chez les enfants ayant un taux de lactates au cordon élevé; ii) réduire l'exposition antibiotique dans les premiers jours de vie (C3G, Amoxicilline, aminosides) mais aussi dans les premières semaines de vie des prématurés (utilisation de la vancomycine associée à un aminoside).

Une étude multicentrique, prospective et sur une durée plus longue permettrait d'étayer nos résultats. Nous pourrions y associer un suivi de ces enfants prématurés ayant développé une entéropathie dans les premières semaines de vie (neuro-développement, croissance staturopondérale, susceptibilité à développer certaines pathologies comme l'asthme, intolérance et/ou allergie alimentaire, maladies métaboliques comme le diabète, évolution de leur microbiote intestinal).

IX. BIBLIOGRAPHIE

1. Dodet, B., [*Microbiota and representations of the human body*]. Med Sci (Paris), 2016. **32**(11): p. 1003-1008.
2. Lepage, P., et al., *Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages?* Gut, 2008. **57**(3): p. 424-5.
3. Bernstein, C.N. and J.D. Forbes, *Gut Microbiome in Inflammatory Bowel Disease and Other Chronic Immune-Mediated Inflammatory Diseases*. Inflamm Intest Dis, 2017. **2**(2): p. 116-123.
4. Vallianou, N., et al., *Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives*. Curr Obes Rep, 2019.
5. Chawanpaiboon, S., et al., *Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis*. Lancet Glob Health, 2019. **7**(1): p. e37-e46.
6. Groer, M.W., et al., *Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority*. Microbiome, 2014. **2**: p. 38.
7. Murphy, K., et al., *The gut microbiota composition in dichorionic triplet sets suggests a role for host genetic factors*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122561.
8. Serino, M., et al., *Young microbes for adult obesity*. Pediatr Obes, 2017. **12**(4): p. e28-e32.
9. Bell, R.S., *Neonatal necrotizing enterocolitis*. N Engl J Med, 1970. **283**(3): p. 153-4.
10. Bell, M.J., *Neonatal necrotizing enterocolitis*. N Engl J Med, 1978. **298**(5): p. 281-2.
11. Kliegman, R.M. and M.C. Walsh, *Neonatal necrotizing enterocolitis: pathogenesis, classification, and spectrum of illness*. Curr Probl Pediatr, 1987. **17**(4): p. 213-88.
12. Ancel, P.Y., et al., *Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study*. JAMA Pediatr, 2015. **169**(3): p. 230-8.
13. Claud, E.C. and W.A. Walker, *Bacterial colonization, probiotics, and necrotizing enterocolitis*. J Clin Gastroenterol, 2008. **42 Suppl 2**: p. S46-52.
14. Pammil, M., et al., *Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 31.
15. Musemeche, C.A., et al., *Comparative effects of ischemia, bacteria, and substrate on the pathogenesis of intestinal necrosis*. J Pediatr Surg, 1986. **21**(6): p. 536-8.
16. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans*. Cell, 2016. **164**(3): p. 337-40.
17. Li, J., et al., *An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(8): p. 834-41.
18. Moore, W.E. and L.V. Holdeman, *Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies*. Am J Clin Nutr, 1974. **27**(12): p. 1450-5.
19. Tyson, G.W., et al., *Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment*. Nature, 2004. **428**(6978): p. 37-43.
20. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
21. Costea, P.I., et al., *Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(11): p. 1069-1076.
22. Cullender, T.C., et al., *Innate and adaptive immunity interact to quench microbiome flagellar motility in the gut*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(5): p. 571-81.
23. Lee, P.Y., et al., *Metaproteomic analysis of human gut microbiota: where are we heading?* J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 36.
24. Miquel, S., et al., *Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of Faecalibacterium prausnitzii*. MBio, 2015. **6**(2).

25. Browne, H.P., et al., *Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation*. *Nature*, 2016. **533**(7604): p. 543-546.
26. Lagier, J.C., et al., *Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics*. *Nat Microbiol*, 2016. **1**: p. 16203.
27. Lagier, J.C., et al., *Culturing the human microbiota and culturomics*. *Nat Rev Microbiol*, 2018: p. 540-550.
28. Sunagawa, S., et al., *Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes*. *Nat Methods*, 2013. **10**(12): p. 1196-9.
29. Arrieta, M.C., et al., *Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(307): p. 307ra152.
30. Cahenzli, J., et al., *Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels*. *Cell Host Microbe*, 2013. **14**(5): p. 559-70.
31. Zhuang, L., et al., *Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2019. **17**(1): p. 13-25.
32. Hill, C.J., et al., *Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTEMET Cohort*. *Microbiome*, 2017. **5**(1): p. 4.
33. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(26): p. 11971-5.
34. Milani, C., et al., *The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2017. **81**(4).
35. Koren, O., et al., *Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy*. *Cell*, 2012. **150**(3): p. 470-80.
36. Aagaard, K., et al., *A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy*. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e36466.
37. Romero, R., et al., *The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women*. *Microbiome*, 2014. **2**(1): p. 4.
38. MacIntyre, D.A., et al., *The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8988.
39. Vaishampayan, P.A., et al., *Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant*. *Genome Biol Evol*, 2010. **2**: p. 53-66.
40. Watkins, C., et al., *Microbial Therapeutics Designed for Infant Health*. *Front Nutr*, 2017. **4**: p. 48.
41. Azad, M.B., et al., *Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months*. *CMAJ*, 2013. **185**(5): p. 385-94.
42. Chu, D.M., et al., *Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery*. *Nat Med*, 2017. **23**(3): p. 314-326.
43. Reinhardt, C., C.S. Reigstad, and F. Backhed, *Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. **48**(3): p. 249-56.
44. Cabrera-Rubio, R., et al., *The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery*. *Am J Clin Nutr*, 2012. **96**(3): p. 544-51.
45. Hunt, K.M., et al., *Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21313.
46. Barile, D. and R.A. Rastall, *Human milk and related oligosaccharides as prebiotics*. *Curr Opin Biotechnol*, 2013. **24**(2): p. 214-9.
47. Sudo, N., et al., *The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction*. *J Immunol*, 1997. **159**(4): p. 1739-45.
48. Koenig, J.E., et al., *Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4578-85.

49. Murgas Torrazza, R. and J. Neu, *The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate*. J Perinatol, 2011. **31 Suppl 1**: p. S29-34.
50. Yatsunenکو, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-7.
51. Azad, M.B. and A.L. Kozyrskyj, *Perinatal programming of asthma: the role of gut microbiota*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 932072.
52. Jauregui, F., et al., *Effects of intrapartum penicillin prophylaxis on intestinal bacterial colonization in infants*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(11): p. 5184-8.
53. Keski-Nisula, L., et al., *Maternal intrapartum antibiotics and decreased vertical transmission of Lactobacillus to neonates during birth*. Acta Paediatr, 2013. **102**(5): p. 480-5.
54. Fouhy, F., et al., *High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(11): p. 5811-20.
55. Aloisio, I., et al., *Influence of intrapartum antibiotic prophylaxis against group B Streptococcus on the early newborn gut composition and evaluation of the anti-Streptococcus activity of Bifidobacterium strains*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014. **98**(13): p. 6051-60.
56. Tanaka, S., et al., *Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009. **56**(1): p. 80-7.
57. Penders, J., et al., *Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **243**(1): p. 141-7.
58. Bezirtzoglou, E., A. Tsiotsias, and G.W. Welling, *Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Anaerobe, 2011. **17**(6): p. 478-82.
59. Hascoet, J.M., et al., *Effect of formula composition on the development of infant gut microbiota*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011. **52**(6): p. 756-62.
60. Borewicz, K., et al., *The effect of prebiotic fortified infant formulas on microbiota composition and dynamics in early life*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2434.
61. Collado, M.C., et al., *Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 894-9.
62. Cox, L.M. and M.J. Blaser, *Pathways in microbe-induced obesity*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 883-94.
63. Hu, J., et al., *Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78257.
64. Stanislawski, M.A., et al., *Pre-pregnancy weight, gestational weight gain, and the gut microbiota of mothers and their infants*. Microbiome, 2017. **5**(1): p. 113.
65. Gosalbes, M.J., et al., *Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(2): p. 198-211.
66. Arrieta, M.C., et al., *The intestinal microbiome in early life: health and disease*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 427.
67. Morgan, A.S., et al., *Intensity of perinatal care, extreme prematurity and sensorimotor outcome at 2 years corrected age: evidence from the EPIPAGE-2 cohort study*. BMC Med, 2018. **16**(1): p. 227.
68. Ho, T.T.B., et al., *Dichotomous development of the gut microbiome in preterm infants*. Microbiome, 2018. **6**(1): p. 157.
69. Gibson, M.K., et al., *Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome*. Nat Microbiol, 2016. **1**: p. 16024.
70. Moles, L., et al., *Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66986.
71. Arboleya, S., et al., *Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics*. J Pediatr, 2015. **166**(3): p. 538-44.

72. Brooks, B., et al., *Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants*. *Microbiome*, 2014. **2**(1): p. 1.
73. Wang, X., et al., *Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56131.
74. Brown, C.T., et al., *Genome resolved analysis of a premature infant gut microbial community reveals a *Varibaculum cambriense* genome and a shift towards fermentation-based metabolism during the third week of life*. *Microbiome*, 2013. **1**(1): p. 30.
75. La Rosa, P.S., et al., *Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(34): p. 12522-7.
76. Neu, J. and W.A. Walker, *Necrotizing enterocolitis*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(3): p. 255-64.
77. Lindquist, S. and O. Hernell, *Lipid digestion and absorption in early life: an update*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(3): p. 314-20.
78. Patel, R.M., et al., *Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 331-40.
79. Bazacliu, C. and J. Neu, *Necrotizing Enterocolitis: Long Term Complications*. *Curr Pediatr Rev*, 2019. **15**(2): p. 115-124.
80. Ancel, P.Y., F. Goffinet, and E.W. Group, *EPIPAGE 2: a preterm birth cohort in France in 2011*. *BMC Pediatr*, 2014. **14**: p. 97.
81. Overman, R.E., Jr., C.N. Criss, and S.K. Gadepalli, *Necrotizing enterocolitis in term neonates: A different disease process?* *J Pediatr Surg*, 2019.
82. Carr, B.D. and S.K. Gadepalli, *Does Surgical Management Alter Outcome in Necrotizing Enterocolitis?* *Clin Perinatol*, 2019. **46**(1): p. 89-100.
83. Frost, B.L., et al., *New Medical and Surgical Insights Into Neonatal Necrotizing Enterocolitis: A Review*. *JAMA Pediatr*, 2017. **171**(1): p. 83-88.
84. Claud, E.C. and W.A. Walker, *Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis*. *FASEB J*, 2001. **15**(8): p. 1398-403.
85. Cho, S.X., et al., *The immunological landscape in necrotising enterocolitis*. *Expert Rev Mol Med*, 2016. **18**: p. e12.
86. Afrazi, A., et al., *New insights into the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors and beyond*. *Pediatr Res*, 2011. **69**(3): p. 183-8.
87. Cotten, C.M., et al., *Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants*. *Pediatrics*, 2009. **123**(1): p. 58-66.
88. Alexander, V.N., V. Northrup, and M.J. Bizzarro, *Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis*. *J Pediatr*, 2011. **159**(3): p. 392-7.
89. Warner, B.B. and P.I. Tarr, *Necrotizing enterocolitis and preterm infant gut bacteria*. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2016. **21**(6): p. 394-399.
90. Ward, D.V., et al., *Metagenomic Sequencing with Strain-Level Resolution Implicates Uropathogenic *E. coli* in Necrotizing Enterocolitis and Mortality in Preterm Infants*. *Cell Rep*, 2016. **14**(12): p. 2912-24.
91. Mai, V., et al., *Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e52876.
92. Wojkowska-Mach, J., et al., *Necrotising enterocolitis in preterm infants: epidemiology and antibiotic consumption in the Polish neonatology network neonatal intensive care units in 2009*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92865.
93. Torrazza, R.M., et al., *Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e83304.
94. Terrin, G., et al., *Ranitidine is associated with infections, necrotizing enterocolitis, and fatal outcome in newborns*. *Pediatrics*, 2012. **129**(1): p. e40-5.
95. Gupta, R.W., et al., *Histamine-2 receptor blockers alter the fecal microbiota in premature infants*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2013. **56**(4): p. 397-400.

96. Mehall, J.R., et al., *Acidification of formula reduces bacterial translocation and gut colonization in a neonatal rabbit model*. J Pediatr Surg, 2001. **36**(1): p. 56-62.
97. Boneti, C., et al., *Probiotic acidified formula in an animal model reduces pulmonary and gastric bacterial load*. J Pediatr Surg, 2009. **44**(3): p. 530-3.
98. Carrion, V. and E.A. Egan, *Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1990. **11**(3): p. 317-23.
99. Manzoni, P., et al., *Exposure to Gastric Acid Inhibitors Increases the Risk of Infection in Preterm Very Low Birth Weight Infants but Concomitant Administration of Lactoferrin Counteracts This Effect*. J Pediatr, 2018. **193**: p. 62-67 e1.
100. Romaine, A., et al., *Safety of histamine-2 receptor blockers in hospitalized VLBW infants*. Early Hum Dev, 2016. **99**: p. 27-30.
101. Biagi, E., et al., *Microbial Community Dynamics in Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut in Moderately Preterm Infants*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2512.
102. Cacho, N.T., L.A. Parker, and J. Neu, *Necrotizing Enterocolitis and Human Milk Feeding: A Systematic Review*. Clin Perinatol, 2017. **44**(1): p. 49-67.
103. Stewart, C.J., et al., *Metabolomic and proteomic analysis of serum from preterm infants with necrotizing enterocolitis and late-onset sepsis*. Pediatr Res, 2016. **79**(3): p. 425-31.
104. Morrow, A.L., et al., *Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants*. Microbiome, 2013. **1**(1): p. 13.
105. Wandro, S., et al., *The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis*. mSphere, 2018. **3**(3).
106. Wilcock, A., et al., *The metabolomics of necrotizing enterocolitis in preterm babies: an exploratory study*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016. **29**(5): p. 758-62.
107. Stewart, C.J., et al., *Temporal bacterial and metabolic development of the preterm gut reveals specific signatures in health and disease*. Microbiome, 2016. **4**(1): p. 67.
108. Millar, M.R., et al., *Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(10): p. 2506-10.
109. de la Cochetiere, M.F., et al., *Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium*. Pediatr Res, 2004. **56**(3): p. 366-70.
110. Wang, Y., et al., *16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis*. ISME J, 2009. **3**(8): p. 944-54.
111. Mshvildadze, M., et al., *Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques*. J Pediatr, 2010. **156**(1): p. 20-5.
112. Mai, V., et al., *Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20647.
113. Smith, B., et al., *Investigation of the early intestinal microflora in premature infants with/without necrotizing enterocolitis using two different methods*. Pediatr Res, 2012. **71**(1): p. 115-20.
114. Stewart, C.J., et al., *The preterm gut microbiota: changes associated with necrotizing enterocolitis and infection*. Acta Paediatr, 2012. **101**(11): p. 1121-7.
115. Normann, E., et al., *Intestinal microbial profiles in extremely preterm infants with and without necrotizing enterocolitis*. Acta Paediatr, 2013. **102**(2): p. 129-36.
116. Torrazza, R.M. and J. Neu, *The altered gut microbiome and necrotizing enterocolitis*. Clin Perinatol, 2013. **40**(1): p. 93-108.
117. Zhou, Y., et al., *Longitudinal analysis of the premature infant intestinal microbiome prior to necrotizing enterocolitis: a case-control study*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0118632.
118. McMurtry, V.E., et al., *Bacterial diversity and Clostridia abundance decrease with increasing severity of necrotizing enterocolitis*. Microbiome, 2015. **3**: p. 11.
119. Sim, K., et al., *Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants*. Clin Infect Dis, 2015. **60**(3): p. 389-97.

120. Roze, J.C., et al., *Nutritional strategies and gut microbiota composition as risk factors for necrotizing enterocolitis in very-preterm infants*. Am J Clin Nutr, 2017. **106**(3): p. 821-830.
121. Dobbler, P.T., et al., *Low Microbial Diversity and Abnormal Microbial Succession Is Associated with Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2243.
122. Itani, T., et al., *Individual variations in intestinal microbiota were higher in preterm infants with necrotising enterocolitis than healthy controls*. Acta Paediatr, 2019. **108**(12): p. 2294-2295.
123. Feng, J., et al., *The constitution and functional prediction of the microbiota in necrotizing enterocolitis with a gestational age of over 28 weeks*. Medicine (Baltimore), 2019. **98**(40): p. e17206.
124. Thomas, J.P., et al., *Probiotics for the prevention of necrotising enterocolitis in very low-birth-weight infants: a meta-analysis and systematic review*. Acta Paediatr, 2017. **106**(11): p. 1729-1741.
125. Lin, H.Y., et al., *Prevention of necrotizing enterocolitis in preterm very low birth weight infants: is it feasible?* J Formos Med Assoc, 2014. **113**(8): p. 490-7.
126. Hill, C., et al., *Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(8): p. 506-14.
127. Lau, C.S. and R.S. Chamberlain, *Probiotic administration can prevent necrotizing enterocolitis in preterm infants: A meta-analysis*. J Pediatr Surg, 2015. **50**(8): p. 1405-12.
128. AlFaleh, K. and J. Anabrees, *Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(4): p. CD005496.
129. Deshpande, G., et al., *Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates*. Pediatrics, 2010. **125**(5): p. 921-30.
130. Deshpande, G., S. Rao, and S. Patole, *Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1614-20.
131. Wang, Q., J. Dong, and Y. Zhu, *Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials*. J Pediatr Surg, 2012. **47**(1): p. 241-8.
132. Baucells, B.J., et al., *[Probiotic associations in the prevention of necrotising enterocolitis and the reduction of late-onset sepsis and neonatal mortality in preterm infants under 1,500g: A systematic review]*. An Paediatr (Barc), 2016. **85**(5): p. 247-255.
133. Janvier, A., J. Lantos, and K. Barrington, *The politics of probiotics: probiotics, necrotizing enterocolitis and the ethics of neonatal research*. Acta Paediatr, 2013. **102**(2): p. 116-8.
134. Neu, J., *Probiotics and necrotizing enterocolitis*. Clin Perinatol, 2014. **41**(4): p. 967-78.
135. Teresa, C., D. Antonella, and J.V. de Goyet, *New Nutritional And Terapeutical Strategies Of Nec*. Curr Paediatr Rev, 2019.
136. Alexandre-Gouabau, M.C., et al., *Comprehensive Preterm Breast Milk Metabotype Associated with Optimal Infant Early Growth Pattern*. Nutrients, 2019. **11**(3).
137. Gregory, K.E., et al., *Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants*. Microbiome, 2016. **4**(1): p. 68.
138. Hodzic, Z., A.M. Bolock, and M. Good, *The Role of Mucosal Immunity in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis*. Front Pediatr, 2017. **5**: p. 40.
139. Mihi, B. and M. Good, *Impact of Toll-Like Receptor 4 Signaling in Necrotizing Enterocolitis: The State of the Science*. Clin Perinatol, 2019. **46**(1): p. 145-157.
140. Zani, A., et al., *Amniotic fluid stem cells improve survival and enhance repair of damaged intestine in necrotising enterocolitis via a COX-2 dependent mechanism*. Gut, 2014. **63**(2): p. 300-9.
141. Zani, A., et al., *Assessment of a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis*. Eur J Pediatr Surg, 2008. **18**(6): p. 423-6.

142. Ostergaard, M.V., et al., *Provision of Amniotic Fluid During Parenteral Nutrition Increases Weight Gain With Limited Effects on Gut Structure, Function, Immunity, and Microbiology in Newborn Preterm Pigs*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2016. **40**(4): p. 552-66.
143. Nicolas, S., et al., *Transfer of dysbiotic gut microbiota has beneficial effects on host liver metabolism*. Mol Syst Biol, 2017. **13**(3): p. 921.
144. Segata, N., et al., *Metagenomic biomarker discovery and explanation*. Genome Biol, 2011. **12**(6): p. R60.
145. Langille, M.G., et al., *Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 814-21.
146. Parks, D.H., et al., *STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles*. Bioinformatics, 2014. **30**(21): p. 3123-4.
147. Chong, J., D.S. Wishart, and J. Xia, *Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis*. Curr Protoc Bioinformatics, 2019. **68**(1): p. e86.
148. Loren, V., et al., *ANP32E, a Protein Involved in Steroid-Refractoriness in Ulcerative Colitis, Identified by a Systems Biology Approach*. J Crohns Colitis, 2019. **13**(3): p. 351-361.
149. Dhariwal, A., et al., *MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W180-W188.
150. Ahle, M., et al., *Maternal, fetal and perinatal factors associated with necrotizing enterocolitis in Sweden. A national case-control study*. PLoS One, 2018. **13**(3): p. e0194352.
151. Neu, J., *Necrotizing enterocolitis: the mystery goes on*. Neonatology, 2014. **106**(4): p. 289-95.
152. Lu, P., et al., *Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of necrotizing enterocolitis: pathophysiology, translational relevance, and challenges*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(11): p. G917-28.
153. Tuuli, M.G., et al., *Umbilical cord arterial lactate compared with pH for predicting neonatal morbidity at term*. Obstet Gynecol, 2014. **124**(4): p. 756-61.
154. Oddie, S.J., L. Young, and W. McGuire, *Slow advancement of enteral feed volumes to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **8**: p. CD001241.
155. Tap, J., et al., *Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults*. Environ Microbiol, 2015. **17**(12): p. 4954-64.
156. Broom, L.J., *The sub-inhibitory theory for antibiotic growth promoters*. Poult Sci, 2017. **96**(9): p. 3104-3108.
157. Gasparri, A.J., et al., *Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome*. Gut Microbes, 2016. **7**(5): p. 443-9.
158. Peng, L., et al., *Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers*. J Nutr, 2009. **139**(9): p. 1619-25.
159. Obri, A., et al., *ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin*. Nature, 2014. **505**(7485): p. 648-53.
160. Xiong, Z., et al., *ANP32E induces tumorigenesis of triple-negative breast cancer cells by upregulating E2F1*. Mol Oncol, 2018. **12**(6): p. 896-912.
161. Travers, C.P., et al., *Exposure to any antenatal corticosteroids and outcomes in preterm infants by gestational age: prospective cohort study*. BMJ, 2017. **356**: p. j1039.
162. Crowley, P., *Corticosteroids after preterm premature rupture of membranes*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1992. **19**(2): p. 317-26.
163. Lim, E.S., et al., *Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants*. Nat Med, 2015. **21**(10): p. 1228-34.
164. Lim, E.S., D. Wang, and L.R. Holtz, *The Bacterial Microbiome and Virome Milestones of Infant Development*. Trends Microbiol, 2016. **24**(10): p. 801-810.
165. Trojet, S.N., et al., *The gp38 adhesins of the T4 superfamily: a complex modular determinant of the phage's host specificity*. Genome Biol Evol, 2011. **3**: p. 674-86.

166. Neves-Costa, A. and L.F. Moita, *Modulation of inflammation and disease tolerance by DNA damage response pathways*. FEBS J, 2017. **284**(5): p. 680-698.
167. Stewart, C.J., et al., *Cesarean or Vaginal Birth Does Not Impact the Longitudinal Development of the Gut Microbiome in a Cohort of Exclusively Preterm Infants*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1008.
168. Mokkala, K., et al., *Distinct Metabolic Profile in Early Pregnancy of Overweight and Obese Women Developing Gestational Diabetes*. J Nutr, 2019.
169. Rauschert, S., et al., *Early Programming of Obesity Throughout the Life Course: A Metabolomics Perspective*. Ann Nutr Metab, 2017. **70**(3): p. 201-209.
170. Kostic, A.D., et al., *The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(2): p. 260-73.
171. Kelly, C.J., et al., *Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(5): p. 662-71.

TITRE : Entéropathie du nouveau-né : approche clinique, métagénomique et métabolomique

RESUME : L'Entérococolite Ulcéro-Nécrosante (ECUN) est la pathologie intestinale la plus grave chez les nouveau-nés prématurés. Aucun essai clinique ou étude de cohorte ne s'est intéressé uniquement au stade I de l'ECUN. Nous avons analysé des échantillons de selles prélevées chez des nourrissons de moins de 34 semaines d'âge gestationnel, dont 11 nourrissons qui ont développé une entéropathie (ECUN-I) et 21 témoins appariés. Les communautés bactériennes des selles ont été profilées par séquençage du gène 16S de l'ARNr bactérien. Le métabolome fécal a été analysé par NMR. Au cours de la première décennie de vie (J1 à 10), les échantillons de nourrissons entéropathes tendaient vers une diversité alpha plus faible que chez les témoins avec une différence significative dans la répartition des communautés bactériennes, mais pas au niveau des métabolites fécaux. Dans la deuxième décennie (J11-J20), l'analyse du microbiome ne montre pas de différence entre entéropathes et témoins mais l'analyse métabolomique montre une diminution significative du taux de sérine dans le groupe des entéropathes. Entre J21 et J30, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Bacteroidetes* et *Streptococcus* sont les groupes bactériens les plus abondants chez les entéropathes, alors que les genres *Klebsiella* et *Raoultella* sont plus abondants chez les témoins. Au-delà de 30 jours de vie, les témoins ont un microbiote plus riche en entérobactéries (*Klebsiella* et *Enterobacter*) que les entéropathes. Les divergences au niveau métabolomique sont plus importantes au cours du deuxième mois de vie. Les modifications structurelles et fonctionnelles du microbiote intestinal semblent plus reconnaissables à la troisième décennie de la vie, comparativement aux enfants témoins. La fonctionnalité du microbiote intestinal est plus affectée par les facteurs maternels et infantiles alors que la structure du microbiote intestinal semble plus stable. Ces données pourraient fournir de nouvelles cibles microbiennes pour lutter contre la progression de l'ECUN dès le stade 1.

MOTS-CLES : entérococolite, prématurité, microbiote intestinal, métagénome, métabolome fécal

TITLE: Preterm neonatal enteropathy: focus on gut microbiota, microbiome and faecal metabolome.

Abstract: Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most serious intestinal pathology in preterm infants. No clinical trial or cohort studies included only stage I of NEC (NEC-1). We analysed stool samples collected from infants under 34 weeks of gestational age, including 11 infants who developed enteropathy (NEC-1 group) and 21 matched controls. Faecal Bacterial communities were profiled by sequencing the 16S rRNA bacterial gene. Faecal metabolomic profiles were analysed by NMR. During the first ten days of life (d1-10), samples from NEC-1 infants showed a lower alpha diversity than controls with a significant difference in the distribution of bacterial communities but not in faecal metabolome. Between d11-d20, microbiome did not differ between NEC-1 infants and controls, but metabolomic analysis showed a significant decrease in serine levels in NEC-1 infants. Between d21 and d30, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Bacteroidetes* and *Streptococcus* bacterial groups were more abundant in NEC-1 infants than in controls, whereas *Klebsiella* and *Raoultella* species were more abundant in controls. Beyond 30 days of life, controls showed a microbiota richer in *Klebsiella* and *Enterobacter* than NEC-1 infants. Leucine levels in faeces were lower in NEC-1 infants. The modifications of gut microbiota and microbiome during NEC-1 development appear more distinguishable by the third decade of life, when compared to healthy children. These data may suggest new microbial targets to fight/blunt the progression of NEC as early as by stage 1.

KEYWORDS: enterocolitis, preterm, gut microbiota, metagenome, faecal metabolome

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
DISCIPLINE BIOLOGIE ET SANTE