Exploration du dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte chez les enfants nés grands-prématurés à un mois de vie via des méthodes méta-omiques

Constance Patin

▶ **To cite this version:**

Constance Patin. Exploration du dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte chez les enfants nés grands-prématurés à un mois de vie via des méthodes méta-omiques. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ045 . tel-04553200

HAL Id: tel-04553200
https://theses.hal.science/tel-04553200

Submitted on 19 Apr 2024

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.

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASQ045

université PARIS-SACLAY

Exploration du dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte chez les enfants nés grands prématurés à un mois de vie via des méthodes méta-omiques

Exploration of the crosstalk between the intestinal microbiota and the host in very-preterm at one month of life through meta-omics methods

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Health and drug sciences HeaDS. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche :
Micalis Institute
INRAE
(Université Paris-Saclay, AgroParisTech)
78350, Jouy-en-Josas, France
Sous la direction de **Patricia LEPAGE**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 22 Septembre 2023, par

Constance PATIN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Imad KANSAU Prof. Dr, Université Pharmacie Paris Saclay	Président
Marie JOOSSENS Prof. Dr, Microbial Ecosystem Pathology Unit, Université Ghent	Rapporteur & Examinatrice
Bénédicte PIGNEUR MCU-PH, Gastro-entérologie et Nutrition Pédiatrique, Hôpital Necker Enfants-Malades	Rapporteur & Examinatrice
Hervé BLOTTIERE DRex, Directeur UMR PhAN, Univ. Nantes, INRAE	Examinateur
Marie-José BUTEL Eméritat, Université Pharmacie Paris Cité	Examinatrice

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Exploration du dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte chez les enfants nés grands-prématurés à un mois de vie par l'analyses de fèces via des méthodes méta-omiques.....

Mots clés : Enfants prématurés – microbiote intestinal – fonctions métaboliques – transcriptomique

Résumé : La naissance prématurée (<37 semaines de gestation) est la principale cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde. Par conséquent, il est important de comprendre ses conséquences à court et à long terme. Alors que l'association entre la naissance prématurée et la santé à court terme a été largement étudiée, son association avec les résultats à long terme est peu connue. Chez les nourrissons prématurés et très prématurés, le microbiote intestinal est très variable et représente souvent le microbiote trouvé dans l'environnement de l'unité de soins intensifs néonatals.

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les interactions entre les profils du microbiote intestinal et l'hôte à l'âge d'un mois chez les nourrissons très prématurés (<32 semaines de gestation ; cohorte EPIPAGE2). Les nourrissons ont été regroupés en fonction des résultats du questionnaire d'âge et d'étape de développement (ASQ) à l'âge de 2 ans.

Nous avons réalisé une étude méta-omique sur des échantillons de selles de nourrissons très prématurés à l'âge d'un mois et intégré des données sur le microbiote fécal (séquençage du gène codant l'ARNr 16S), le métabolome (spectrométrie de masse en tandem LC-MS) et le transcriptome de l'hôte (RNA-seq et RT-qPCR).

Chez les nourrissons nés grand-prématurés, il est possible de relier des profils de microbiote à différentes voies métaboliques ainsi qu'à des marqueurs immunitaires de l'hôte. Ces combinaisons sont elles-mêmes associées à des évolutions cliniques telles que le transit intestinal ou le neurodéveloppement ultérieur. Le microbiote à 1 mois pourrait être un indicateur non invasif de l'immaturité intestinale. *Escherichia* et *Staphylococcus* se sont avérés être les meilleurs indicateurs de maturité et d'immaturité, respectivement. *Escherichia* pourrait faciliter le processus de maturation intestinale chez les nourrissons prématurés.

Title: Exploration of the crosstalk between the intestinal microbiota and the host in children born as very preterm at one month of life through fecal analysis using meta-omics methods.....

Keywords: Preterm birth – gut microbiota – functional profile - transcriptomic

Abstract: Preterm birth (<37 gestational age) is the leading cause of death in children under 5 years of age worldwide. Therefore, it is important to understand its short-term and long-term consequences. While the association between preterm birth and short-term health has been extensively studied, its link to long-term outcomes remains relatively unknown. In premature and very premature infants, the intestinal microbiota is highly variable and often resembles the microbiota found in the neonatal intensive care unit environment.

The aim of this study was to gain a better understanding of the interactions between intestinal microbiota profiles and the host at one month of age in very preterm infants (<32 weeks of gestation; EPIPAGE2 cohort). Infants were grouped based on the results of the Ages and Stages Questionnaire (ASQ) at the age of 2 years, focusing on developmental milestones.

We performed a meta-omic study on fecal samples from very-preterm infants at 1 month of age and integrated data on the fecal microbiota (16S rRNA gene sequencing), metabolome (LC-MS), and host transcriptome (RNA-seq).

In infants born very prematurely, it is possible to link microbiome profiles to various metabolic pathways as well as host immune markers. These combinations are themselves associated with clinical outcomes such as intestinal transit or later neurodevelopment. The microbiome at 1 month may serve as a non-invasive indicator of intestinal immaturity. *Escherichia* and *Staphylococcus* have proven to be the best indicators of maturity and immaturity, respectively. *Escherichia* might facilitate the process of intestinal maturation in preterm infants.

Remerciements

Je souhaite remercier les rapporteurs et examinateurs de cette thèse : Marie Joossens, Bénédicte Pigneur, Hervé Blottière et Marie-José Butel pour avoir bien voulu évaluer le travail que j'ai réalisé durant ces trois années de doctorat. Je tiens également à remercier Imad Kansau pour avoir accepté de présider ma thèse.

Je remercie bien entendu ma directrice de thèse, Patricia Lepage, pour m'avoir offert l'opportunité de m'investir dans ce projet de recherche. Son encadrement m'a permis de développer une grande autonomie et de progresser dans de nombreux domaines. Merci à tous les membres de l'équipe PhylHom, Karine, pour ton aide précieuse pour toutes les manips, Esra, Céline, pour toutes les conversations autour de la paillasse et merci Camille pour ton soutien surtout durant ces derniers mois, ainsi que nos conversations sur le Bassin ;)

Un merci tout particulier à Alice pour m'avoir aidé lors de mes premières qPCR mais également merci pour ton soutien durant ces trois années. Merci Colombe, pour ta bienveillance et ta générosité et surtout ta relecture de ma thèse au bon moment. Merci Christelle pour ta bonne humeur et tes encouragements. Merci Hiba, pour toutes ces discussions passionnantes dans notre bureau. Merci Delphine pour m'avoir remotivé à faire du sport ainsi que pour nos covoit' parfois un peu râleurs. Merci Maeva pour toutes nos discussions et souvent autour des plantes. Merci Célia et Amandine pour vos conseils toujours bienveillants. Vous êtes devenues de véritables amies et avez rendu ces années de thèse fort mémorables.

Je voudrais également remercier toute l'équipe Fine pour l'aide technique apportée à ce projet.

Merci à Auguste pour sa contribution à mon projet de recherche ;)

Un grand merci à mon oncle Benoit pour son aide précieuse et merci à Quentin pour avoir su m'écouter et me comprendre.

Merci à mes parents et mon frère pour leur confiance, leur soutien et leurs encouragements depuis le début. Merci à ma grand-mère qui a toujours su décrocher son téléphone quand j'avais besoin de me changer les idées. Merci également à mes grands-parents qui s'intéressaient de très près à mes recherches. Vous êtes une source d'inspiration. Merci à toute ma famille qui m'a toujours épaulé en cas de besoin.

Enfin je voudrais remercier Alan, pour avoir réussi à gérer (et supporter) mon stress et mes doutes durant ces 3 ans, en particulier pendant la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ton aide avec tous les problèmes informatiques que j'ai pu avoir et pour m'avoir aidé à chaque « pourquoi ça ne fonctionne pas ? », merci.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS **8**

INTRODUCTION **9**

I. LA PREMATURITE 9
I.1 Un problème de santé publique 9
I.2 Prise en charge des nouveau-nés prématurés 10
I.3 Causes de la naissance prématurée 11
I.4 Conséquences à court-terme de la naissance prématurée 12
I.5 Conséquences à long-terme de la naissance prématurée sur la santé de l'enfant et l'adulte en devenir 13
I.5 La cohorte nationale EPIPAGE2 et le projet EPIFLORE 15
II. LE MICROBIOME HUMAIN 17
II.1 Le microbiote intestinal 17
II.2 Dysbiose intestinale 19
II.3 Mise en place du microbiote intestinal : la primo colonisation 21
II.4 Facteurs influençant la primo colonisation 23
II.5 Activité métabolique du microbiote intestinal 25
III. INTERACTIONS HOTE-MICROBIOME 29
III.1 Évolution du système digestif impactant la digestion et l'absorption 29
III.2 Interaction du microbiote intestinal avec les cellules de la muqueuse intestinale au niveau du côlon 31
III.3 Impact du microbiote intestinal sur l'expression de gènes de l'hôte 35
III.4 Immunité intestinale 38
III.5 Développement de l'axe intestin-cerveau 43
IV. EXPOSOMES DES ENFANTS PREMATURES 46
IV.1 Importance de la compréhension de l'exposome des enfants prématurés 46
IV.2 Exposition chimique 47
IV.3 Exposition médicamenteuse 49

OBJECTIFS **52**

MATERIELS ET METHODES **54**

I. COHORTE ET ECHANTILLONS 54
II. ANALYSE DU MICROBIOTE INTESTINAL D'ENFANTS GRANDS PREMATURES AGES D'UN MOIS 55
III. ANALYSE DU METABOLOME FECAL D'ENFANTS GRANDS PREMATURES AGES D'UN MOIS 56
IV. ANALYSE DU TRANSCRIPTOME FECAL DE L'HOTE 58
V. COMMUNAUTES SYNTHETIQUES, CREATION D'AMORCES QPCR ET EXPOSITION AU XENOBIOTIQUE ET A *CANDIDA ALBICANS* 58
VI. BIO-INFORMATIQUE ET ANALYSES STATISTIQUES 59

RESULTATS **61**

CHAPITRE 1 : ASSOCIATION DE VARIABLES CLINIQUES ET DES GENRES MAJORITAIRES DU MICROBIOME INTESTINAL DANS LA COHORTE DE 60 ENFANTS NES GRANDS-PREMATURES A 1 MOIS D'AGE 62
1. Introduction 62
2. Résultats 64
3. Discussion 76
4. Conclusion 80

CHAPITRE 2 : LE TRANSIT INTESTINAL PRECOCE CHEZ LES NOURRISSONS PREMATURES EST ASSOCIE A DES SIGNATURES FONCTIONNELLES DU MICROBIOTE INTESTINAL A L'AGE DE 1 MOIS. 81
1. Introduction 81
2. Article 83
3. Discussion / conclusion 99

CHAPITRE 3 : DIALOGUE ENTRE LE MICROBIOME INTESTINAL ET L'HOTE : IMPACT DE LA NAISSANCE PREMATUREE SUR LE CYCLE DE L'ACIDE CITRIQUE (TCA) ET L'IMMUNITE CHEZ LES NOURRISSONS AGES D'1 MOIS. 101
1. Introduction 101
2. Article 102
3. Discussion / conclusion 134
CHAPITRE 4 : IMPACT DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL SUR LES GRANDES VOIES METABOLIQUES MICROBIENNES CHEZ LES GRANDS-PREMATURES AGES D'UN MOIS 135
1. Introduction 135
2. Résultats 136
3. Discussion 153
4. Conclusion 157
CHAPITRE 5 : IMPACT DES BACTERIES DU GENRE *ESCHERICHIA/SHIGELLA* SUR L'EXPRESSION DE CALPROTECTINE ET CATHELICIDINE PAR LES CELLULES EPITHELIALES 159
1. Introduction 159
2. Résultats 162
3. Discussion 167
4. Conclusion 168
CHAPITRE 6 : IMPACT DES XENOBIOTIQUES ET DE *CANDIDA ALBICANS* SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL D'ENFANTS NES PREMATURES 169
1. Introduction 169
2. Résultats 171
3. Discussion 185
4. Conclusion 188
DISCUSSION 189
CONCLUSION 201
VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE ET ACTIVITES D'ENSEIGNEMENTS 205
1. Publication 205
2. Communication 205
3. Co-encadrement 206
4. Enseignement 206
REFERENCES 207

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : DIFFERENTS STADES DE LA PREMATURITE 10
FIGURE 2 : PRISE EN CHARGE D'UN NOUVEAU-NE PREMATURE EN COUVEUSE 11
FIGURE 3 : SUIVI DES ENFANTS DE LA COHORTE EPIPAGE 2 15
FIGURE 4 : RESULTATS DU PROJET EPIFLORE 16
FIGURE 5 : LES 4 FONCTIONS MAJEURES DU MICROBIOTE INTESTINAL (A) ET LES CONSEQUENCES D'UNE DYSBIOSE SUR L'AXE INTESTIN-CERVEAU (B) 19
FIGURE 6 : CANDIDA ALBICANS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 19
FIGURE 7 : CAUSES ET CONSEQUENCES DE LA DYSBIOSE 20
FIGURE 8 : EVOLUTION DES FAMILLES BACTERIENNES MAJEURES DU MICROBIOTE INTESTINAL DE LA NAISSANCE A L'AGE ADULTE ET EVOLUTION DES CONDITIONS PRESENTES DANS LA LUMIERE DE L'INTESTIN 22
FIGURE 9 : FACTEURS INFLUENÇANT LA COLONISATION DU NOUVEAU-NE 25
FIGURE 10 : METABOLITES PRODUITS PAR LE MICROBIOTE INTESTINAL VIA DIFFERENTES SOURCES DE NUTRIMENTS 26
FIGURE 11 : DEVELOPPEMENT DES PROCESSUS DIGESTIFS ET SCHEMA DE MOTILITE AU COURS DES SEMAINES DE GESTATION 29
FIGURE 12 : TYPES CELLULAIRES DIFFERENTS DE L'EPITHELIUM DU COLON AVEC LEUR PRINCIPALES FONCTIONS 34
FIGURE 13 : DEVELOPPEMENT ANORMAL DE L'AXE MICROBIOTE-SYSTEME IMMUNITAIRE-CERVEAU CHEZ LES NOUVEAU-NES PREMATURES ATTEINTS DE LESIONS CEREBRALES 39
FIGURE 14 : SCHEMA REPRESENTANT LE SYSTEME DE PRR PRESENT SUR LES CELLULES EPITHELIALES ABOUTISSANT A UNE REPONSE IMMUNITAIRE 40
FIGURE 15 : DIFFERENTES CELLULES ET LEURS PRINCIPALES FONCTIONS COMPOSANT LE SYSTEME IMMUNITAIRE INTESTINAL 42
FIGURE 16 : VOIES DE L'AXE INTESTIN-CERVEAU 44
FIGURE 17 : STRUCTURE CHIMIQUE DU BISPHENOL A ET DU BISPHENOL S 48
FIGURE 18 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA DOMPERIDONE 50
FIGURE 19 : DESCRIPTION DE L'ADMINISTRATION DE 8 EXCIPIENTS POTENTIELLEMENT NOCIFS CHEZ 726 NOUVEAU-NES 51
FIGURE 20 : OBJECTIFS DE LA THESE 52
FIGURE 21 : CONDITIONS D'UTILISATION DES TESTS STATISTIQUES 59
FIGURE 22 : RELATION ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LE DEVELOPPEMENT NEUROLOGIQUE A 2 ANS 65
FIGURE 23 : L'AGE GESTATIONNEL IMPACTE LE MICROBIOTE INTESTINAL DES GRANDS-PREMATURES A 1 MOIS 67
FIGURE 24 : ABONDANCES RELATIVES DE STAPHYLOCOCCUS ET ESCHERICHIA EN FONCTION DU MODE D'ACCOUCHEMENT 69
FIGURE 25 : ABONDANCE RELATIVE D'ESCHERICHIA EN FONCTION DU POIDS DE NAISSANCE 71
FIGURE 26 : ABONDANCE DE CLOSTRIDIUM EN FONCTION DE LA PRISE D'ANTIBIOTIQUES DES ENFANTS GRANDS-PREMATURES 73
FIGURE 27 : IMPACT DU MODE DE NUTRITION DANS LE MICROBIOTE INTESTINAL DES ENFANTS GRANDS-PREMATURES 75
FIGURE 28 : POURCENTAGE DE METABOLITES DETECTES DANS LES FECES DES ENFANTS GRANDS-PREMATURES DE LA COHORTE 136
FIGURE 29 : METABOLISME SIMPLIFIE DE LA VOIE DE LA CARNITINE 137
FIGURE 30 : METABOLISME DE LA CARNITINE DANS LES FECES D'ENFANTS GRANDS-PREMATURES 139
FIGURE 31 : METABOLISME SIMPLIFIE DU CATABOLISME DE L'HISTIDINE EN HISTAMINE 141
FIGURE 32 : METABOLISME DE L'HISTIDINE DANS LES FECES D'ENFANTS GRANDS-PREMATURES 143
FIGURE 33 : METABOLISME SIMPLIFIE DU P-CRESOL 144

FIGURE 34 : METABOLISME DE LA TYROSINE ET DU P-CRESOL DANS LES FECES D'ENFANTS GRANDS-PREMATURES 145
FIGURE 35 : METABOLISME SIMPLIFIE DES ACIDES BILIAIRES 147
FIGURE 36 : METABOLISME DES ACIDES BILIAIRES DANS LES FECES D'ENFANTS GRANDS-PREMATURES 148
FIGURE 37 : METABOLISME SIMPLIFIE DU TRYPTOPHANE 150
FIGURE 38 : METABOLISME DU TRYPTOPHANE DANS LES FECES D'ENFANTS GRANDS-PREMATURES 152
FIGURE 39 : RELATIONS ENTRE LES GENES/PROTEINES LIES A LA CALPROTECTINE 162
FIGURE 40 : EXPRESSION ET CORRELATIONS DE LA CALPROTECTINE AVEC LES GENRES BACTERIENS ENRICHIS DANS LES CLUSTERS 164
FIGURE 41 : IMPACT DES SURNAGEANTS BACTERIENS DE E. COLI, S. CAPAE, E. FAECALIS ET K. ARE ROGENES SUR L'EXPRESSION DE S100A9 PAR DES CELLULES HT29. EXPRESSION INDIQUEE EN LOG2 FOLD CHANGE. DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE SURNAGEANTS BACTERIENS ONT ETE TESTEES POUR CHAQUE ESPECE: 20% ET 40% 166
FIGURE 42 : NOMBRE D'ECHANTILLONS PAR METHODES DE DETECTION DE BACTERIES DANS LE MICROBIOTE INTESTINAL DES GRANDS-PREMATURES. 171
FIGURE 43 : BACTERIES DETECTEES OU ISOLEES VIA DIFFERENTES METHODES AU SEIN DU MEME ECHANTILLON DE L'ENTEROTYPE 2 ENRICHI EN ENTEROBACTER 173
FIGURE 44 : BACTERIES DETECTEES OU ISOLEES VIA DIFFERENTES METHODES AU SEIN DU MEME ECHANTILLON DE L'ENTEROTYPE 4 ENRICHI EN ENTEROCOCCUS 175
FIGURE 45 : BACTERIES DETECTEES OU ISOLEES VIA DIFFERENTES METHODES AU SEIN DU MEME ECHANTILLON DE L'ENTEROTYPE 3 ENRICHI EN ESCHERICHIA 177
FIGURE 46 : CINETIQUE DE CROISSANCE EN FONCTION DES MILIEUX MGAM ET MILIEU MIXTE POUR TROIS BACTERIES ET MILIEUX YM ET MIXTE POUR CANDIDA ALBICANS 179
FIGURE 47 : COMPARAISON DU MODELE COMMUNAUTE SYNTHETIQUE ET DES FECES VIA LA QUANTIFICATION BACTERIENNE 181
FIGURE 48 : EXPOSITION AUX XENOBIOTIQUES ET CO-CULTURE AVEC CANDIDA ALBICANS SUR DES COMMUNAUTES SYNTHETIQUES 184
FIGURE 49 : RESUME GRAPHIQUE 203

LISTE DES ABREVIATIONS

2'FL : 2 Fucosyllactose
5-HT : 5-hydroxytryptamine
ACP : Analyse en composante principale
AGCC : Acides gras à chaine courte
AGN : Age gestationnel
AHR : Récepteur d'aryl hydrocarbone
AINS : Anti-inflammatoire
ASQ : Âge and score questionary
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor
BHE : Barrière hemato encéphalique
BPA: Bisphenol A
BPS: Bisphenol S
CAMP: Cathelicidin antimicrobial peptide
DAO: Diamine oxydase
DEF: Defensine
DEFA: Defensine alpha
DOHaD: Developmental origins of health and Diseases
ECUN : Entérocolite ulcéro-nécrosante
EPIPAGE : Étude épidémiologique sur les petits âges gestationnels
FXR : Récepteur farnesoïde X
GALT : Tissue lymphoïde associé à l'intestin
GO: Gene Ontology
HDC: Histidine decarboxylase
HK : Hexokinase
HMO : Oligosaccharides du lait humain
HPA : Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
IDO1 : Indoleamine 2,3-dioxygénase
Ig : Immuno globuline
IL : Interleukine
IMC : Indice de masse corporel
LC-MS : Spectrométrie de masse par chromatographie en phase liquide
LPS : lipopolysaccharide
RTqPCR : Reverse transcriptase quantitative polymerisation chain reaction
MAMP : Motif moléculaire associé aux microbes
mGAM : Gifu Anaerobic Medium Agar, Modified
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
Muc : Mucine
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
nampt : nicotinamide phosphoribosyltransférase
USIN : Unité intensif de soin néonatal
PAMP : Motifs moléculaires associés à des pathogènes
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PLSDA : Partial Least Squares regression discriminant analysis
PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PS : Polysorbate
PXR : Récepteur de prégane X
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
SA : Semaine d'aménorrhée
SNC : Système nerveux central
TDAH : Trouble déficit de l'attention avec hyperactivité
TMAO : Triméthylamine-N-oxyde
TnaA : Tryptophanase
Trpd : Tryptophane decarboxylase
TSA : Trouble du spectre de l'autisme
YM: Yeast Media

INTRODUCTION

I. La prématurité

I.1 Un problème de santé publique

La prématurité a toujours été présente dans l'histoire de l'humanité, bien qu'elle ait été traitée différemment au fil du temps en fonction des connaissances médicales et des ressources disponibles.

Dans les temps anciens, les prématurés n'avaient souvent que peu de chances de survie en raison du manque de soins médicaux appropriés. Au début du XX^{e} siècle, les avancées médicales ont permis de mieux prendre en charge les bébés prématurés grâce à l'introduction de nouvelles techniques médicales. Les progrès technologiques, tels que les couveuses, ont été utilisés pour apporter une assistance vitale aux bébés prématurés, en leur fournissant un environnement contrôlé et adapté à leurs besoins, améliorant ainsi leurs chances de survie et de développement. Au cours des dernières décennies, les avancées médicales ont encore amélioré la survie des prématurés. Les soins néonatals spécialisés, les médicaments et les techniques de soutien respiratoire ont contribué à augmenter le taux de survie.

Néanmoins à l'heure actuelle, la prématurité reste à l'échelle mondiale la première cause de décès d'enfants de moins de 5 ans. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le taux d'enfants nés avant 36 semaines de gestation varie de 5 à 18 % en fonction des pays, le nombre total de naissances prématurées dépassant 15 millions en 2020 [1].

La prématurité est divisée en trois catégories en fonction de sa gravité **(Figure 1)** : i) la prématurité modérée à tardive pour les enfants nés entre 32 et 37 semaines d'aménorrhée, ii) les grands prématurés nés entre 28 et 32 semaines, iii) la très grande prématurité pour les enfants nés à moins de 28 semaines [1,2]. Les nourrissons prématurés sont également divisés en 3 groupes en fonction du poids de naissance : i) extrêmement faible <1000g, ii) très faible compris entre 1000g et 1499g, iii) modéré compris entre 1500g et 2500g [3]. Aucune survie d'enfant n'est décrite en dessous de 22 semaines d'aménorrhée et un poids inférieur à 500g.

En France, le taux de prématurité est passé de 4,5% en 1995 à 5,6% en 2016 et représente 7% en 2019 [4], ce qui concerne environ 55 000 naissances par an.

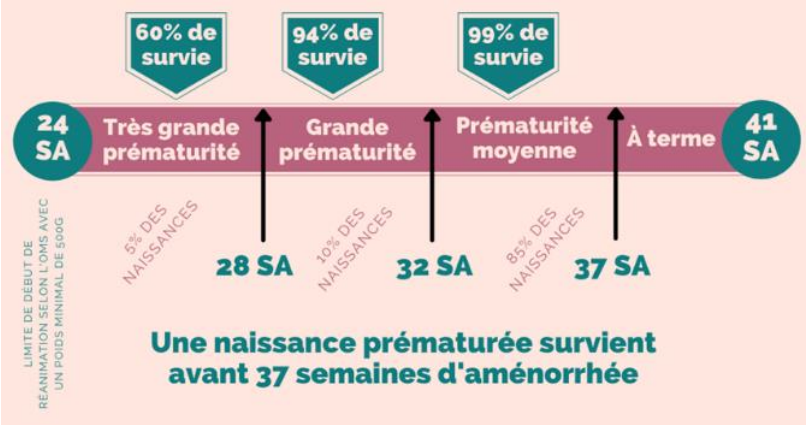


Figure 1 : Différents stades de la prématurité [2]

Bien que l'amélioration des soins apportés aux enfants prématurés permette d'augmenter leur survie et de réduire la fréquence et la sévérité des conséquences sur leur développement, il reste important de comprendre les causes et conséquences d'une naissance prématurée pour pouvoir tenter de pallier au mieux à cette problématique.

I.2 Prise en charge des nouveau-nés prématurés

La prise en charge des enfants prématurés diffère en fonction des pays et 90% des enfants nés grands prématurés dans des pays à faible revenu décèdent tandis que ce taux descend à 10% dans les pays à revenu élevé [1]. À la naissance, les prématurés sont hospitalisés dans des unités de soins intensifs néonatals (USIN) permettant de fournir un environnement contrôlé et adapté à leurs besoins. Ils sont placés dans des couveuses chauffées et humidifiées pour réguler leur température entre 36,5°C et 37,5°C et un taux d'humidité supérieur à 60% [5]. La durée de maintien en couveuse peut être de quelques semaines à plusieurs mois et ils peuvent sortir de ces couveuses lorsque leur poids et leur capacité à réguler leur température le leur permettent (environ 2kg). Pendant ce temps, ils peuvent être nourris par voie entérale avec du lait maternel à l'aide d'une sonde introduite jusque dans l'estomac ou l'intestin grêle ou par voie parentérale par intraveineuse **(Figure 2)**.

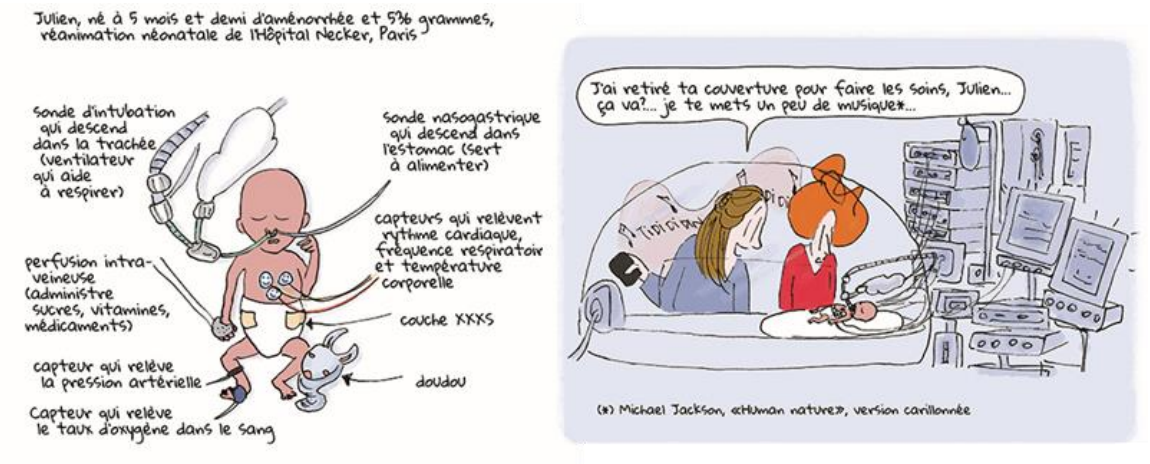


Figure 2 : Prise en charge d'un nouveau-né prématuré en couveuse [6]

I.3 Causes de la naissance prématurée

La plupart des naissances prématurées sont dites spontanées dues à des contractions précoces dont la cause est rarement identifiée ou causée par la rupture prématurée des membranes fœtales. Les autres naissances prématurées sont dites provoquées, car les enfants naissent par césarienne notamment si un risque est encouru pour la mère ou l'enfant.

Les facteurs pouvant influencer la naissance prématurée sont les grossesses multiples (52% de prématurité contre 5,5% avec une grossesse unique), l'âge plus avancé des mères, un indice de masse corporel (IMC) élevé, le stress, la pollution environnementale, la consommation d'alcool ou de tabac ou encore les conditions socio-économiques avec un risque plus faible chez les femmes occupant des emplois de cadres que chez des femmes ouvrières ou employées. Les facteurs santé augmentant le risque d'une naissance prématurée durant la grossesse sont une hypertension artérielle, les maladies rénales, ou encore des infections non traitées durant la grossesse [3,7,8]. Cependant, les causes d'une naissance prématurée sont souvent inconnues et/ou multifactorielles.

Durant le confinement de 2020 mis en place pour contrer la pandémie de Covid-19, une diminution de 7% des naissances prématurées en France a été observée. Des observations similaires ont été faites au Danemark, en Irlande ou aux Pays-Bas [9]. Plusieurs hypothèses sont évoquées dont une diminution des autres infections par les gestes barrières, le repos des femmes enceintes confinées ou la baisse de la pollution [9].

I.4 Conséquences à court terme de la naissance prématurée

Il existe de nombreuses conséquences à court terme pour les enfants nés prématurés. Ils peuvent être victimes de mort subite des nourrissons, d'entérocolites ulcéro-nécrosantes (ECUN), de difficultés à respirer ou à s'alimenter ou encore d'un développement neurologique anormal. Ces enfants ont également un système immunitaire immature. Les organes sont présents, mais immatures en raison de l'interruption du développement *in utero*. Les poumons manquent souvent de surfactant, qui aide les alvéoles pulmonaires à rester ouvertes [10]. L'appareil digestif est sous-développé, tant en termes de taille que de fonctions (production d'une couche de mucus, perméabilité accrue, réduction des peptides antimicrobiens et diminution du nombre de cellules de Paneth) [11] avec une capacité de digestion et d'absorption réduite. Les enfants nés prématurés auront un temps de vidange gastrique prolongé et une motilité diminuée, car ces deux processus ne sont matures qu'à la 36^{e} semaine de gestation [12]. Le tractus digestif va doubler de taille entre la 37^{e} semaine et la 40^{e} semaine de gestation. Les enzymes intestinales ne sont pas entièrement fonctionnelles comme la lipase gastrique dont l'activité augmente jusqu'à la 41^{e} semaine de gestation ainsi que la lactase dont le pic d'activité apparaît à la 37^{e} semaine de gestation [13]. Le mécanisme de succion n'est développé qu'à la 34^{e} semaine pouvant entraîner une nutrition parentérale de l'enfant, car l'enfant n'est pas capable de se nourrir de lait maternel.

Pour ces raisons, les enfants très prématurés doivent être hospitalisés dans des unités de soins intensifs néonatals en attendant que leurs organes fonctionnent de manière autonome, qu'ils régulent leur température corporelle et qu'ils prennent du poids [3].

I.5 Conséquences à long terme de la naissance prématurée sur la santé de l'enfant et l'adulte en devenir

Les conséquences à court terme sont donc nombreuses, mais ces enfants peuvent également souffrir de difficultés à plus long terme et plusieurs études ont montré que les enfants prématurés ont un risque accru de développer des problèmes de santé à l'âge adulte [13–15] : maladies métaboliques, retards de croissance physique et mentale, troubles de l'attention, hypertension, troubles respiratoires, épilepsie et une plus forte susceptibilité aux troubles psychiatriques.

Le concept des origines développementales de la santé et de la maladie (DOHaD) [16,17] est un domaine de recherche qui explore les liens entre l'environnement précoce du développement, les expositions périnatales et la santé à long terme d'un individu. Cette approche met l'accent sur la période critique du développement, allant de la période de conception à l'âge de 2 ans, et suggère que les influences environnementales (environnement génétique, utérin ou encore social) pendant cette phase peuvent avoir des conséquences majeures sur la santé tout au long de la vie. Ainsi, des facteurs tels que l'alimentation maternelle, le stress, l'exposition à des produits chimiques, les infections, le statut socio-économique, et d'autres facteurs environnementaux peuvent influencer la mise en place des systèmes biologiques, épigénétiques et métaboliques du fœtus en développement et du nouveau-né. Ces influences précoces peuvent entraîner des modifications durables de la physiologie, du métabolisme et de la structure des organes, augmentant potentiellement le risque de maladies chroniques non transmissibles telles que l'obésité, le diabète de type 2 ou les maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Récemment, il a été montré que l'exposition précoce aux antibiotiques était associée à un risque plus important d'asthme, d'allergie, d'IMC plus important et de trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité [18].

Des recherches ont, d'autre part, mis en évidence le rôle de l'épigénétique comme la méthylation de l'ADN, où des changements durables dans l'expression des gènes peuvent être induits par des facteurs environnementaux tels que le stress prénatal ou le poids de naissance pendant le développement précoce [19–21].

Dans le cas des enfants prématurés, les expositions sont nombreuses : stress, changements nutritionnels, infections, interventions médicales intensives, etc... Ces expositions précoces

peuvent avoir un impact significatif sur leur développement ultérieur et leur santé à long terme, ce que le concept de DOHaD permet de mieux comprendre.

La cohorte EPIPAGE1 (Étude EPIdémiologique sur les Petits Ages Gestationnels) a été créée pour mener une étude épidémiologique française de grande envergure sur un très grand nombre d'enfants nés prématurément en 1997 [22,23]. Elle a permis de suivre 5 541 enfants jusqu'à l'âge de 5 ans pour recueillir des informations sur leur santé et leur développement puis un bilan a été effectué à 8 et 16 ans. Cette étude visait à évaluer les résultats de santé à court et long terme, ainsi que les facteurs associés à la prématurité. Elle a montré que la survie globale des enfants prématurés a considérablement augmenté par rapport aux décennies précédentes. Cependant, les enfants nés très prématurément (avant 32 semaines de grossesse) avaient un risque de mortalité plus élevé que les enfants nés légèrement prématurés (entre 32 et 36 semaines de grossesse). Les enfants prématurés présentaient également un risque accru de problèmes de développement cognitif, de retards intellectuels et du développement moteur [24,25], des troubles sensoriels et respiratoires [26] par rapport aux enfants nés à terme. Un mauvais développement cognitif à 5 ans chez les grands prématurés peut être prédit par le statut socio-économique, l'absence d'allaitement, la présence de lésions cérébrales à l'échographie, la petite taille pour l'âge gestationnel et un nombre élevé de frères et sœurs. Les facteurs sociaux prédisaient à la fois des déficiences cognitives légères et sévères, tandis que les facteurs médicaux prédisaient principalement des déficiences cognitives sévères [27].

Ces résultats ont permis de mieux comprendre les défis auxquels les enfants prématurés peuvent être confrontés. Ils ont également mis en évidence l'importance d'une prise en charge précoce et d'un suivi médical régulier pour les enfants nés prématurément, afin de minimiser les conséquences à long terme de la prématurité et de favoriser leur santé et leur bien-être tout au long de la vie. Les résultats de l'étude EPIPAGE1 ont également contribué à l'amélioration des soins néonataux et des interventions préventives pour les enfants prématurés. Depuis 1997, les enfants prématurés sont plus nombreux, mais leur survie s'est améliorée avec des pratiques en néonatologie qui ont évolué. C'est pour cela qu'une seconde cohorte a vu le jour, EPIPAGE2, qui répond au besoin d'étude prospective avec un suivi dans le temps jusqu'à l'adolescence voire à l'âge adulte. Elle prend également en compte un éventail plus large de facteurs sociaux, familiaux et environnementaux. Il est indispensable de savoir ce que les enfants prématurés qui naissent actuellement deviennent, au-delà des premières semaines de vie.

I.6 La cohorte nationale EPIPAGE2 et le projet EPIFLORE

La cohorte nationale EPIPAGE2 a été lancée en 2011 pour étudier les conséquences de la prématurité à court et long terme. Elle suit des enfants prématurés de la naissance jusqu'à l'âge de 12 ans **(Figure 3)**. En tout, 7804 naissances ont été recensées dans l'étude. Cette étude permet de répondre à de nombreuses questions concernant la grande prématurité et les objectifs sont nombreux : i) améliorer les connaissances sur les causes de la prématurité, ii) évaluer les effets de l'organisation des soins et des pratiques médicales sur la santé et le développement des enfants prématurés, iii) mieux connaître le devenir des enfants grands prématurés et définir les besoins de prise en charge spécifiques pendant l'enfance, iv) étudier de manière globale et multidisciplinaire les grands enjeux de la santé, du développement et de la socialisation de ces enfants à moyen et long terme [14].

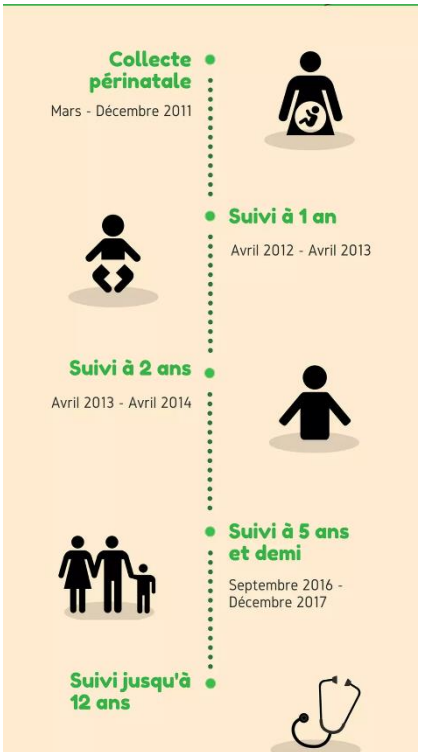


Figure 3 : Suivi des enfants de la cohorte EPIPAGE 2 (INSERM)

Le projet EPIFLORE a vu le jour pour compléter les données de la cohorte EPIPAGE2 par l'analyse du microbiote intestinal des enfants. Ce projet financé par l'ANR et coordonné par le Pr Marie-José Butel (Faculté de Pharmacie, Université Paris-Cité) avait pour but de déterminer le risque pour un grand prématuré de développer des pathologies à court et long terme avec 3 objectifs différents : i) étudier à grande échelle le microbiote intestinal spécifique de nouveau-nés grands prématurés avec une approche multicentrique prenant en compte la variabilité interindividuelle et la variabilité liée au centre USIN, ii) relier la grande prématurité au développement de pathologies à court et plus long terme, et iii) rechercher des relations entre le profil du microbiote et le développement de sepsis ou d'ECUN. Mon projet de thèse s'appuie sur la cohorte d'enfants recrutés dans EPIFLORE en utilisant des échantillons de fèces ainsi que les données cliniques et de santé des enfants de cette cohorte.

Le projet EPIFLORE a permis de montrer que les nourrissons nés très grands prématurés (n=577 ; nés avant 31 semaines de grossesse) peuvent être divisés en 6 groupes ou entérotypes en fonction de la composition de leur microbiote intestinal à l'âge d'un mois [28]. Cinq entérotypes étaient dominés par un genre bactérien spécifique, tandis qu'un sixième entérotype se caractérisait par une très faible charge bactérienne (entérotype 6) **(Figure 4)**.

Ces entérotypes étaient associés à différents développements évalués à l'âge de 2 ans par un questionnaire « Ages & Stages » (ASQ) fournissant un score ASQ. Les entérotypes 4, 5 et 6 (caractérisés respectivement par des proportions élevées d'*Enterococcus*, *Staphylococcus* et une faible quantité de bactéries) regroupaient les prématurés présentant le plus mauvais pronostic, l'entérotype 3 (dominé par *Escherichia*) regroupait les nourrissons ayant le meilleur pronostic, et enfin, les entérotypes 1 et 2 (dominés par *Clostridium* et *Klebsiella/Enterobacter*) regroupaient des nourrissons avec des pronostics hétérogènes.

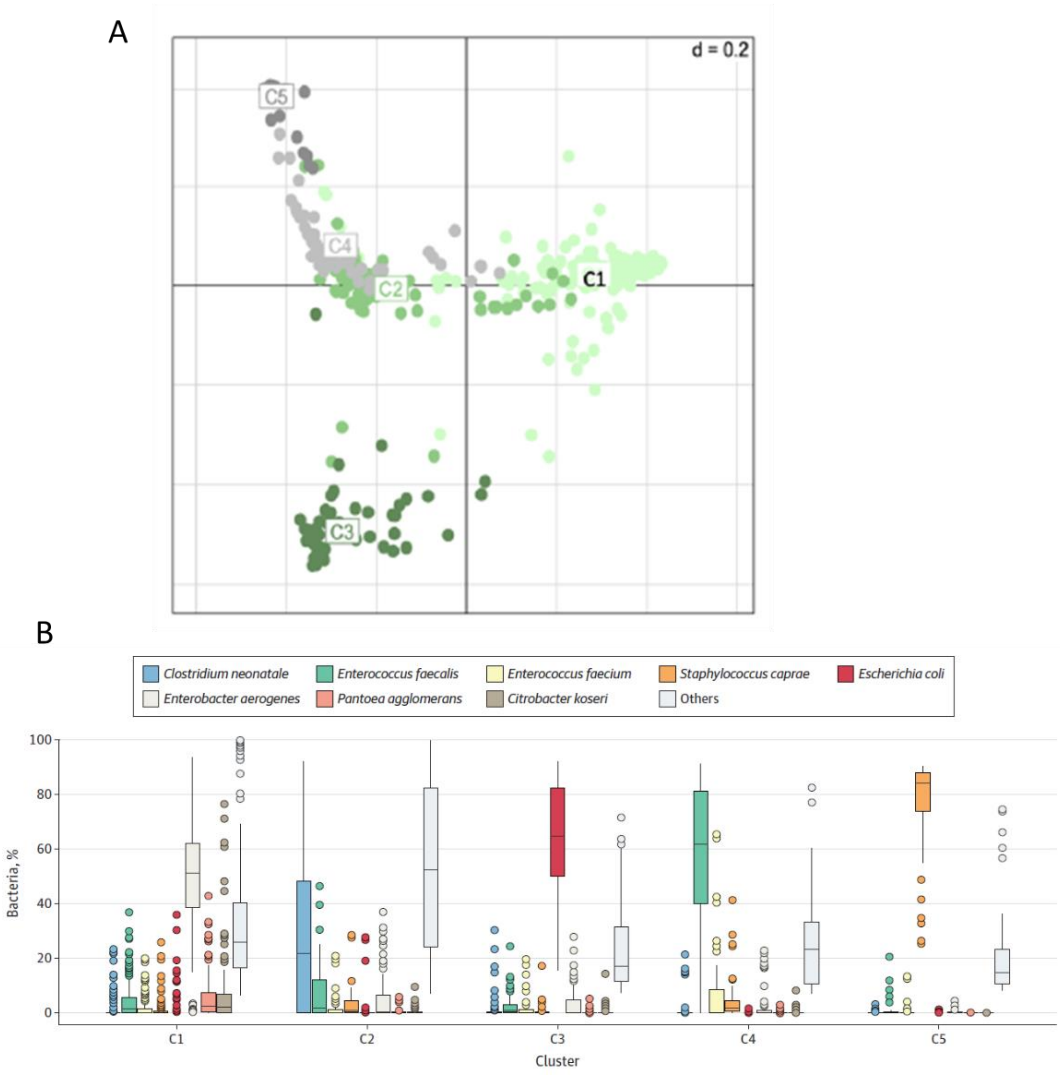


Figure 4 : Résultats du projet EPIFLORE [28]

A/ Analyse en coordonnées principales (PCoA) au niveau de l'OTU.
B/ Abondance relative des genres bactériens détectés dans les entérotypes.

II. Le microbiote humain

II.1 Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est une communauté complexe de microorganismes vivant dans notre système digestif. Il est composé principalement de bactéries, mais aussi de virus, de champignons, de protistes et d'archées. Il est composé de milliards de microorganismes et son génome contient environ 10 millions de gènes bactériens [29]. La densité bactérienne du côlon atteint 10^{12} bactéries et ces dernières représentent 60% de la composition des fèces. L'étude de la composition bactérienne des fèces est donc un bon moyen d'étudier le microbiote intestinal [30]. Le tractus digestif présente un gradient d'oxygène : sa concentration va en diminuant du haut vers le bas, ce qui entraîne une variation de la composition en espèces bactériennes tout au long de ce tractus. Dans le côlon, la composition bactérienne est dominée par des espèces anaérobies strictes [31].

Le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions **(Figure 5A)**. Il a un rôle dans la digestion des aliments et le métabolisme des nutriments [32]. Il aide à décomposer les aliments que nous consommons et qui ne sont pas utilisés directement dans l'intestin, en les transformant en composés plus simples, ce qui permet leur absorption par l'organisme.

Le microbiote intestinal contribue également au bon fonctionnement du système immunitaire de l'hôte, et l'absence de microbiote conduit à des altérations de développement du système immunitaire [33]. Les souris axéniques ont ainsi une capacité d'activation plus faible des cellules dendritiques et un déficit de production d'interleukine (IL) 22 et de lymphocytes T [34–36]. D'autre part, au début de la vie, le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans le développement du système immunitaire [37]. Le microbiote mature contribue au développement de la réponse immunitaire innée ; par exemple, les niveaux de cytokines liées à la prolifération et à la maturation des cellules immunitaires sont augmentés dans les fèces au cours du temps [33]. Les proportions de *Bacteroides* et de *Prevotella* sont fortement corrélées aux réponses des récepteurs de type TLR2 (Toll-like receptor 2). De plus, la colonisation par *Bifidobacterium* est liée à une plus grande production d'interleukines : IL-5, IL-6, IL-13, TNF et IL-1. La colonisation intestinale par *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus* ou *Clostridium* dans la petite enfance est négativement associée à l'IL-13, à l'IL-5 et au TNF induits à l'âge de 3 ans. Dès lors, les probiotiques et prébiotiques permettent la modulation du système immunitaire

[33,38] en améliorant la fonction de barrière intestinale, en empêchant la translocation des agents pathogènes, en modifiant l'expression des récepteurs de motifs moléculaires associés aux microbes (MAMP), en modulant les voies de signalisation cruciales, en stimulant les activités des cellules immunitaires et en équilibrant la réponse immunitaire Th1/Th2.

Une fonction majeure du microbiote intestinal est de limiter la croissance des agents pathogènes via différents mécanismes : compétition pour les nutriments, interactions métaboliques compétitives, exclusion de niche et induction de la réponse immunitaire de l'hôte [39]. Par exemple, *Enterococcus faecalis* peut inhiber la croissance de *Clostridioides difficile* grâce à son activité antibactérienne en empêchant la production et la germination de spores de *Clostridioides difficile* [40,41]. De même, *Enterococcus faecalis* peut sécréter des molécules antibactériennes qui réduisent les effets cytotoxiques des toxines de *Clostridioides difficile* et protègent les cellules HT29 (lignée cellulaire cancéreuse du côlon) [41]. Lorsque le microbiote est fragilisé (dans le cadre d'une prise d'antibiotiques par exemple), la pression exercée par les bactéries commensales sur les pathogènes diminue et ces derniers pourront coloniser une partie des niches disponibles. Un microbiote sain contribue à renforcer l'immunité de l'hôte et à prévenir les infections [42].

Des recherches récentes suggèrent que le microbiote intestinal peut avoir un impact sur notre santé mentale et notre bien-être émotionnel [43]. Certaines études ont montré que des déséquilibres dans le microbiote peuvent être associés à des troubles tels que l'anxiété et la dépression [44] mais également à l'autisme [45]. Ces résultats indiquent un lien fort entre le microbiote intestinal et le cerveau **(Figure 5B)**. Des études ont également suggéré que le microbiote intestinal peut influencer notre poids corporel. Certaines souches bactériennes peuvent être associées à un gain de poids excessif [46] ou à l'anorexie [47]. Enfin, certains genres bactériens peuvent métaboliser des médicaments, ce qui peut influencer leur efficacité et leurs effets secondaires [48].

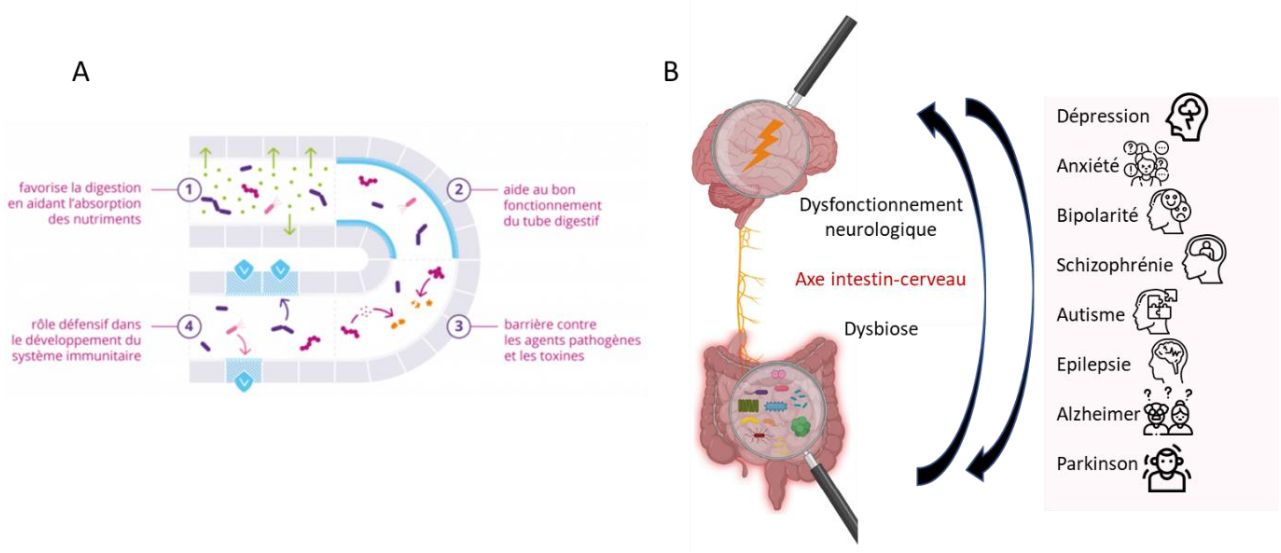


Figure 5 : Les 4 fonctions majeures du microbiote intestinal [49]*(A) et les conséquences d'une dysbiose sur l'axe intestin-cerveau (B)*

Les champignons sont également retrouvés dans le microbiote intestinal. Cette composante appelée le mycobiote est moins étudiée du fait de sa présence en plus faible quantité (moins de 0.1% des microorganismes) [50]. Les champignons les plus retrouvés font partie du genre *Candida,* le plus représenté chez l'Homme étant *Candida albicans* (30-60% des champignons totaux d'un microbiote sain) [51,52]. Concernant les enfants prématurés, les espèces fongiques les plus rencontrées sont *Candida albicans* **(Figure 6)**, *Candida parapsilosis* et *Saccharomyces cerevisae* [53]. Elles sont en plus forte abondance relative chez les enfants nés prématurés que chez les enfants nés à terme [54].

Figure 6 : Candida albicans en microscopie électronique (Institut Pasteur)

II.2 Dysbiose intestinale

Comme le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans de nombreux aspects de notre santé et de notre bien-être, des déséquilibres ou dysbioses de cet écosystème peuvent être associés à une inflammation chronique, notamment les maladies inflammatoires de l'intestin.

La dysbiose est un déséquilibre dans le microbiote comparé à un état sain (eubiose) et peut avoir des conséquences néfastes sur la santé. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à une dysbiose comme l'utilisation d'antibiotiques ou d'autres médicaments, un régime alimentaire non équilibré, un stress chronique, des infections intestinales, des facteurs environnementaux, un mode de vie sédentaire ou des facteurs génétiques [55] **(Figure 7)**.

Un microbiote intestinal perturbé chez les nouveau-nés et notamment les prématurés peut contribuer à considérablement augmenter le risque d'infections néonatales, ainsi qu'à une activation inappropriée des cellules immunitaires à court ou plus long terme, contribuant ainsi au développement de maladies inflammatoires, telles que l'asthme et les allergies.

Des approches sont actuellement étudiées pour restaurer et maintenir un microbiote intestinal sain et prévenir les dysbioses **(Figure 7)**. Il existe les prébiotiques qui sont des composés induisant des changements spécifiques dans la composition ou l'activité du microbiote intestinal conférant un bénéfice pour la santé ; et les probiotiques qui sont des organismes vivants ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. Une alimentation équilibrée est également recommandée [32]. La greffe ou transfert de microbiote fécal a des résultats très positifs dans le traitement des colites à *Clostridioides difficile*.

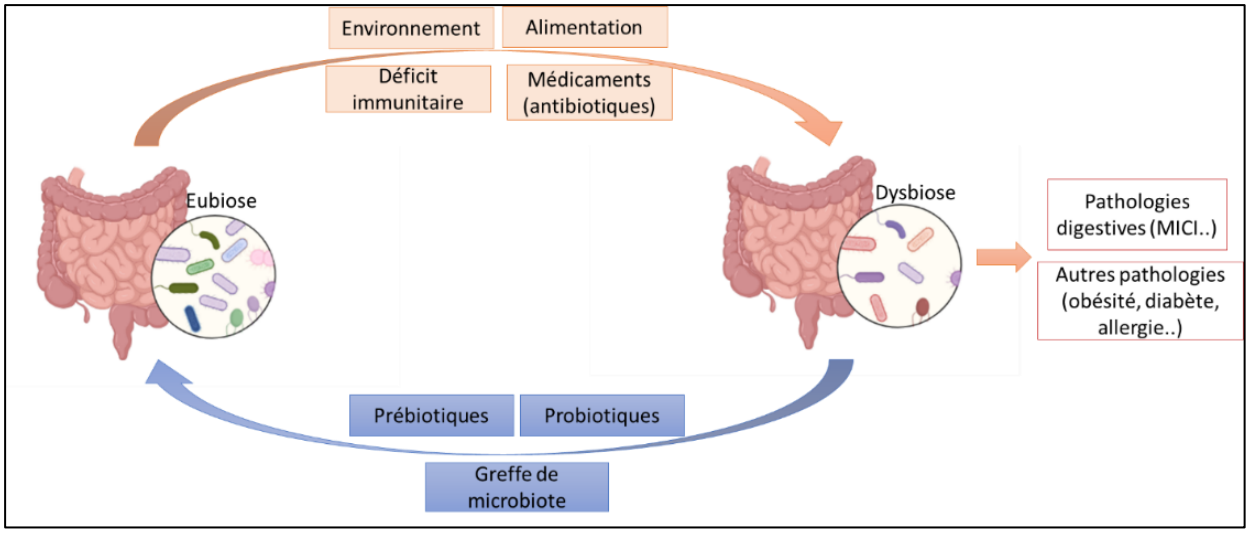


Figure 7 : Causes et conséquences de la dysbiose

La façon dont le microbiote intestinal néonatal est développé et son impact sur d'autres aspects de la santé divergent considérablement de notre compréhension du microbiote intestinal adulte, qui a été étudié plus en détail dans divers contextes pathologiques.

II.3 Mise en place du microbiote intestinal : la primo colonisation

Le nouveau-né a longtemps été considéré comme naissant dépourvu de bactéries et la présence de bactéries dans le placenta n'était alors ni envisagée ni détectée. Cependant, grâce aux progrès des techniques d'analyse du microbiote, certaines études ont depuis mis en évidence la présence d'ADN bactérien dans des zones autrefois considérées comme stériles, telles que le placenta, le liquide amniotique, les membranes fœtales et le sang du cordon ombilical. La question de la stérilité du placenta demeure cependant controversée, certaines études considérant le placenta comme totalement stérile et que l'ADN bactérien retrouvé ne serait que des contaminations [56] tandis que d'autres suggèrent que la colonisation bactérienne a déjà débuté *in utero* [57].

Dans les minutes qui suivent une naissance par voie basse, le nouveau-né est rapidement colonisé par le microbiote fécal et vaginal de la mère, ainsi que par les bactéries présentes dans l'environnement direct. Ce processus de colonisation est rapide, puisque seulement 48 heures après la naissance, le microbiote fécal de l'enfant contient déjà 10^8 UFC/g de fèces [58]. Lors d'une naissance par césarienne, le processus suit une dynamique similaire, mais le nouveau-né va d'abord être colonisé par des bactéries issues de la peau de la mère, et avec une importance plus marquée des bactéries de l'environnement [59,60].

Les premières bactéries qui s'implantent dans les premiers jours de vie sont des bactéries anaérobies facultatives telles que *Staphylococcus*, *Enterococcus* et Enterobacteriaceae (*Escherichia*) [15,61,62]. Rapidement, ces bactéries épuisent l'oxygène présent dans le tube digestif et réduisent le potentiel redox [15] favorisant ainsi l'implantation des bactéries anaérobies strictes telles que *Bifidobacterium*, *Clostridium* ou *Bacteroides*, ce qui conduit à une augmentation de la diversité bactérienne dans le tube digestif du nourrisson [63] **(Figure 8)**. *Bifidobacterium*, associé à l'alimentation principalement lactée des nouveau-nés, est plus abondante dans le microbiote intestinal des enfants que dans celui des adultes et diminue progressivement jusqu'à l'âge adulte [63] **(Figure 8)**.

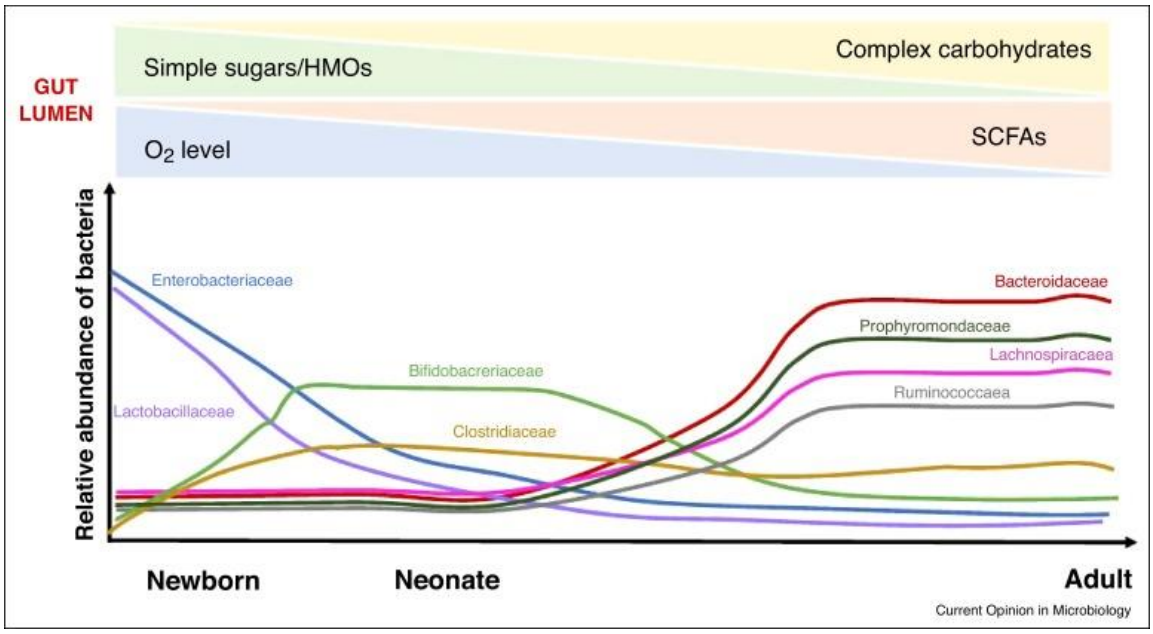


Figure 8 : Evolution des familles bactériennes majeures du microbiote intestinal de la naissance à l'âge adulte et évolution des conditions présentes dans la lumière de l'intestin [42]

Le microbiote intestinal des prématurés diffère de celui des enfants nés à terme. Chez les nouveau-nés prématurés, le microbiote intestinal est moins abondant, moins diversifié et composé de proportions plus élevées de bactéries anaérobies facultatives retrouvées couramment dans l'environnement des unités de soins intensifs néonatals [64] telles que *Enterobacter*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Klebsiella, Staphylococcus* avec une majorité de *S. aureus*, *S. haemolyticus* et *S. epidermidis,* ainsi que *Clostridium* avec comme espèces majoritaires *C. perfringens, C. butyricum*, *C. difficile* et *C. neonatale* découverte plus récemment [28,65] . À l'inverse, les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont rarement retrouvés dans le microbiote des enfants prématurés [66]. L'altération du microbiote intestinal chez les enfants prématurés semble être un phénomène précoce puisqu'elle est détectable dans les échantillons de méconium (premières fèces émises), avec des niveaux significativement plus faibles d'*Escherichia* que ceux des nourrissons nés à terme par voie basse [67].

II.4 Facteurs influençant la primo colonisation

De nombreux éléments peuvent influencer l'établissement du microbiote intestinal de l'enfant, parmi lesquels l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, l'environnement, le régime alimentaire ainsi que l'antibiothérapie de la mère et/ou de l'enfant **(Figure 9)**.

L'influence de l'âge gestationnel sur le microbiote intestinal des prématurés est peu étudiée. Cependant, une étude a montré que la colonisation par *Bifidobacterium* n'a lieu qu'au-dessus de 33 semaines d'âge gestationnel [68]. Ces résultats indiquent que l'implantation de ce taxon bactérien semble être liée à un certain degré de maturation digestive. Il a également été montré que la présence de ce genre bactérien permettait d'inhiber les agents pathogènes et notamment ceux impliqués dans l'ECUN. De plus, la diversité est plus importante chez les enfants avec un âge gestationnel élevé [69].

Le mode d'accouchement joue également un rôle important dans la formation du microbiote intestinal en début de vie. Chez les enfants nés à terme par césarienne, les microorganismes prédominants dans le microbiote seront majoritairement ceux de la peau ou de l'environnement, tels que *Staphylococcus, Propionibacterium* et *Corynebacterium*. La césarienne est également associée à une plus faible diversité du microbiote intestinal [40,69]. Il existe un lien entre césarienne et maladies telles que l'asthme, l'obésité et les allergies. Cependant, certaines études indiquent que les différences dans le microbiote causées par la césarienne peuvent être dues à l'utilisation d'antibiotiques lors de l'accouchement et aux complications pendant la grossesse [70]. Des études sur les enfants prématurés n'ont pas montré d'influence significative du mode d'accouchement sur le développement du microbiote au niveau du méconium [68,71] bien que certaines aient signalé un retard de colonisation par les *Bacteroides* [72]. Cependant, il est compliqué d'analyser l'influence du mode d'accouchement sur le microbiote intestinal des enfants prématurés sachant que la césarienne est le mode de naissance prédominant pour ces nourrissons [73].

Les facteurs environnementaux jouent également un rôle important. Une étude publiée en 1990 montre par exemple que *Lactobacillus* colonise plus lentement les enfants prématurés dans des couveuses fermées que dans des couveuses ouvertes [74].

Les antibiotiques sont également connus pour influencer le microbiote intestinal à la naissance, avec des études montrant une diminution de la présence de *Clostridium, Lactobacillus* et *Bifidobacterium* [67] suite à une administration d'antibiotiques chez les enfants prématurés. À

1 mois, les nourrissons dont les mères ont reçu des antibiotiques *intrapartum* avaient un microbiote intestinal différent de celui des nourrissons dont les mères n'avaient pas reçu d'antibiotiques. De plus, chez les nourrissons nés à terme, l'administration d'antibiotiques au cours des premières heures de vie réduit le niveau de *Bifidobacterium* intestinal dans les jours suivant l'administration et est liée à une augmentation des niveaux d'entérobactéries à 1 mois [75]. Une antibiothérapie prolongée est associée à une diminution d'espèces bactériennes dans les échantillons fécaux [76] ainsi qu'au développement du diabète, du surpoids et de l'eczéma [40].

L'alimentation a également un impact sur l'établissement du microbiote intestinal. Une colonisation retardée est observée lors de la nutrition parentérale [76]. De plus, la nutrition parentérale prolongée provoque une dysbiose du microbiote intestinal qui se caractérise principalement par une diminution de la diversité, une plus faible abondance de bactéries commensales ainsi qu'une prévalence accrue de bactéries à Gram négatif potentiellement pathogènes [77]. Elle entraîne également des modifications des muqueuses dans l'intestin (atrophie villositaire, altération de l'absorption des nutriments). Le microbiote des enfants nourris au lait maternisé (formules infantiles) diffère de celui des enfants nourris au lait maternel. Ils sont tous les deux dominés par *Bifidobacterium* avec également une dominance des *Bacteroides* chez les enfants nourris au lait maternisé [40]. Le lait maternel est considéré comme la meilleure forme de nutrition pour les prématurés et les enfants nés à terme pour la communauté microbienne intestinale. Les immunoglobulines (Ig) A du lait maternel contribuent à la régulation du système immunitaire du nourrisson. Les oligosaccharides du lait maternel (*Human Milk Oligosaccharides* ; HMO) peuvent encourager la croissance de microorganismes bénéfiques pour le nourrisson en servant de prébiotiques notamment pour les *Bifidobacterium*. Les HMO n'ont aucune valeur nutritionnelle pour le nourrisson, mais ils ont des effets prébiotiques qui favorisent la maturation intestinale, la motilité intestinale, l'immunité et améliorent la cognition [78]. Une étude indique que l'alimentation au lait de sa propre mère influence la structure de la composition de la communauté microbienne intestinale des prématurés et accroît la diversité du microbiote intestinal par rapport au lait maternel de donneur et aux préparations pour nourrissons [79].

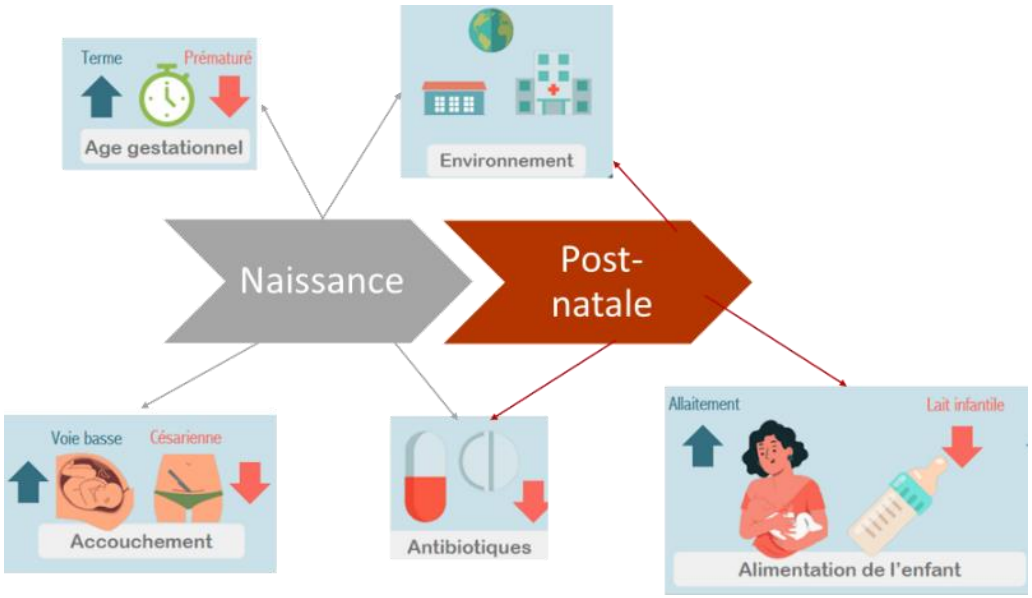


Figure 9 : Facteurs influençant la colonisation du nouveau-né

II.5 Activité métabolique du microbiote intestinal

Le métabolisme du microbiote intestinal désigne les processus biochimiques complexes qui se produisent au sein de la communauté microbienne présente dans l'intestin. Il joue un rôle crucial dans la digestion et le métabolisme des nutriments, ainsi que dans la régulation de divers processus physiologiques. Les plus importants sont la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) ainsi que la transformation des acides biliaires **(Figure 10)**.

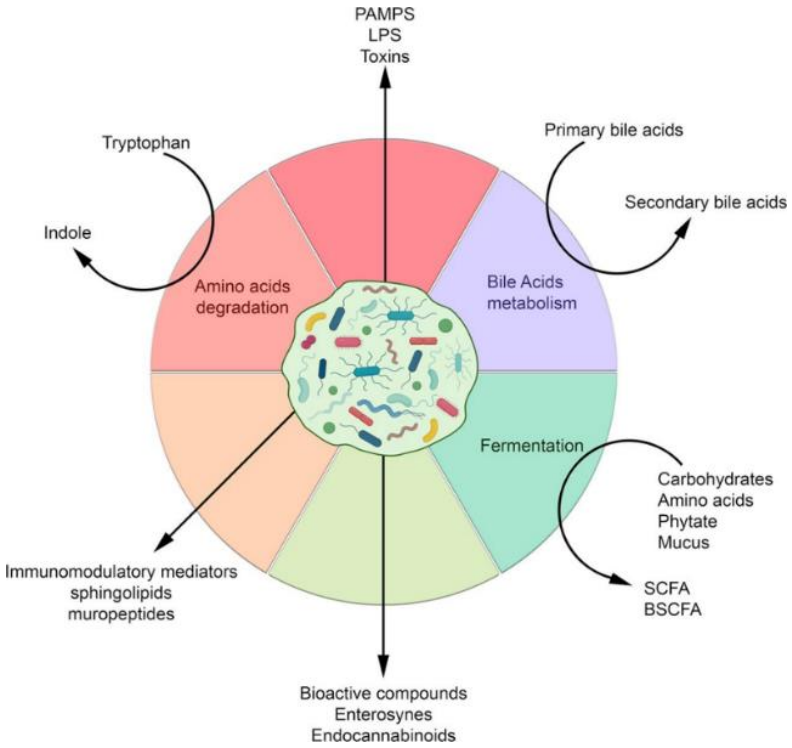


Figure 10 : Métabolites produits par le microbiote intestinal via différentes sources de nutriments. BSCFA, AGCC branché; LPS, lipopolysaccharides; PAMPs, Motif moléculaire associé aux pathogènes; SCFA, acides gras à chaine courte [80]

Les acides gras à chaîne courte sont produits par la fermentation bactérienne des fibres alimentaires, ainsi que des protéines et des peptides. Les principaux producteurs d'AGCC dans le microbiote intestinal sont des souches appartenant aux groupes *Clostridium* XIVa et IV, notamment *Roseburia*, *Eubacterium* et *Faecalibacterium prausnitzii* [31]. Les AGCC les plus courants sont l'acétate, le propionate, le valérate et le butyrate. En plus de ces principaux AGCC, des produits secondaires tels que le succinate et le lactate sont également générés pendant cette fermentation.

Le butyrate, l'un des AGCC, est utilisé comme principale source d'énergie par les cellules épithéliales du côlon. Les effets des AGCC sur la physiologie de l'hôte sont nombreux, notamment la régulation de l'expression des gènes via des modulations des marques épigénétiques, une possible diminution du risque d'asthme en agissant sur le système immunitaire [81], la régulation du transit intestinal [82], de la sécrétion d'insuline [83], du métabolisme hépatique (glucidique et lipidique) et du stockage d'énergie dans les adipocytes [84]. De plus, les AGCC peuvent moduler les fonctions cérébrales impliquées dans la régulation de l'appétit et la neurogenèse au cours du développement [82,85,86]

Une étude [87] a montré une corrélation positive entre la concentration d'AGCC dans les fèces et l'âge gestationnel chez les enfants prématurés. Cependant, le rôle des AGCC chez les prématurés est controversé. La production élevée d'AGCC dans la lumière intestinale pourrait être attribuée à une mauvaise motilité gastro-intestinale et à une malabsorption des glucides. Certains pathogènes bactériens entériques tels que *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *C. paraputrificum*, *C. butyricum* et *Klebsiella pneumoniae* ont été impliqués dans l'ECUN en augmentant la production de butyrate par fermentation du lactose. Ces résultats suggèrent qu'un excès d'AGCC produits par des bactéries pathogènes peut compromettre l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et augmenter l'inflammation métabolique dans l'ECUN. Par conséquent, des bactéries productrices d'AGCC telles que *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* pourraient contribuer à la régulation de l'homéostasie immunitaire intestinale [88].

Les bactéries présentes dans le microbiote sont également capables de transformer les acides biliaires primaires, produits par le foie, en acides biliaires secondaires tels que le deoxycholate, l'ursodeoxycholate et le lithocholate, qui ont des propriétés bactéricides contre certains pathogènes. Ces bactéries transforment les acides biliaires en déconjuguant les acides aminés glycine ou taurine, ainsi qu'en procédant à la déshydroxylation, la déshydrogénation et l'épimérisation du noyau du cholestérol. Des altérations des acides biliaires secondaires ont été associées à plusieurs maladies, telles que la cirrhose, les maladies inflammatoires de l'intestin et le cancer. En 2006, une étude a montré que certains membres du microbiote intestinal sont également capables de conjuguer les acides aminés aux acides biliaires, créant ainsi un nouvel ensemble d'"acides biliaires microbiens conjugués" [89]. Cette découverte révèle une nouvelle diversité des acides biliaires dans l'intestin des mammifères, mais les effets sur la physiologie de l'hôte et la dynamique microbienne restent en grande partie inconnus. L'activation des récepteurs aux acides biliaires chez l'hôte conduit à la synthèse d'agents antimicrobiens dans la lumière intestinale [89]. Une étude récente a montré que la production d'acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal était influencée par la composition du lait maternel, notamment la quantité de 2'-Fucosyllactose (2'-FL), un composant des HMO [78]. Ces dernières années, l'importance physiologique des acides biliaires secondaires a été réévaluée. Des études précliniques émergentes ont démontré que ces métabolites jouent un rôle clé dans la régulation de l'immunité systémique. Les acides biliaires secondaires agissent comme des ligands pour les récepteurs 1 des acides biliaires couplés aux protéines G (GPBAR1) et le récepteur farnésoïde X (FXR), présents dans les cellules épithéliales intestinales, les

macrophages, les cellules dendritiques et les cellules T tueuses naturelles du tissu lymphoïde associé au système gastro-intestinal (GALT). L'activation de ces voies par les acides biliaires secondaires exerce un effet anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion de cytokines médiée par NF-κB et l'activité de l'inflammasome NLPR3. Chez les prématurés, l'accumulation des acides biliaires est associée au développement de l'ECUN. Il y a une plus forte abondance d'acides biliaires secondaires dans les fèces des nourrissons nourris au lait maternisé par rapport à ceux nourris au lait maternel [90,91].

Le microbiote intestinal joue enfin un rôle essentiel dans la production de neurotransmetteurs tels que la dopamine, la noradrénaline, la sérotonine et l'histamine, suggérant qu'ils agissent en tant que molécules de signalisation dans l'axe intestin-cerveau. La dopamine, par exemple, semble être utilisée par les bactéries pour communiquer avec les cellules intestinales de l'hôte [92]. Un autre composé produit par le microbiote intestinal est l'indole, qui est dérivé du tryptophane. L'indole est connu pour ses effets neurodépresseurs. Ces interactions entre le microbiote intestinal et le système nerveux central sont de plus en plus étudiées pour mieux comprendre leur influence sur la santé mentale et le fonctionnement du cerveau.

Le côlon est le principal lieu de l'activité métabolique du microbiote intestinal. Les microorganismes qui le composent possèdent un potentiel enzymatique considérable, leur permettant de réaliser des transformations biochimiques aux effets multiples sur la santé de l'hôte.

III. Interactions hôte-microbiote

III.1 Évolution du système digestif impactant la digestion et l'absorption

Des données ont montré que la longueur de l'intestin augmente rapidement dans le dernier trimestre de grossesse : 25 cm à 20 semaines de gestation, 200 cm à 30 semaines de gestation et 275 cm à terme. Cette surface est en contact avec les aliments, les microbes et d'autres composants potentiellement antigéniques, et joue un rôle clé dans les processus de digestion et d'absorption [12]. La prématurité peut impacter ces processus, car les enzymes intestinales et la motilité ne sont pas encore fonctionnelles **(Figure 11)**.

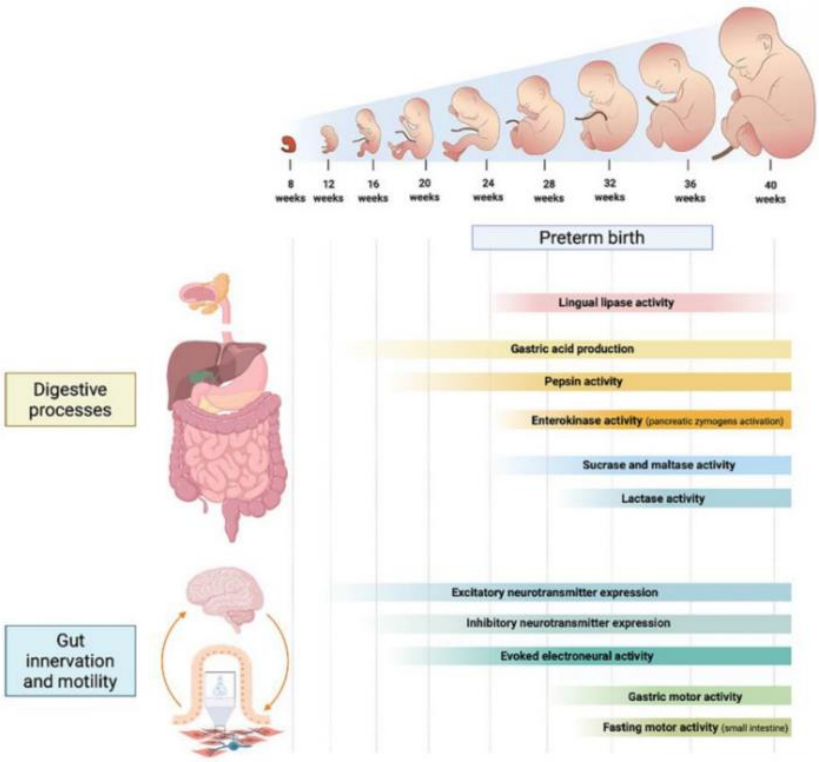


Figure 11 : Développement des processus digestifs et schéma de motilité au cours des semaines de gestation [12]

La lipase linguale est sécrétée par les glandes à la base de la langue ; son activité est plus faible à 26 semaines de gestation, culmine à 30-32 semaines et diminue avant le terme [12]. Après une naissance prématurée, la production d'acide gastrique est limitée par rapport aux nourrissons nés à terme [12].

Chez le nouveau-né prématuré, la digestion du lactose est limitée en raison du développement tardif de la lactase vers la 29ème semaine de gestation. Elle n'atteint son maximum que vers la 40ème semaine de gestation [13]. Cependant, la mise en place précoce d'une alimentation adaptée peut stimuler l'activité de la lactase intestinale chez ces prématurés. L'activité de la lactase sert de marqueur de maturité intestinale et peut avoir des implications sur les résultats cliniques. Il est important de déterminer si les effets du lait sur l'activité de la lactase sont dus à la plus grande concentration de lactose dans le lait maternel par rapport aux préparations pour nourrissons [93]. La plupart de l'activité de la lactase se trouve dans la partie moyenne à supérieure des villosités intestinales, tandis que la sucrase, la maltase et la glucoamylase se trouvent dans la partie moyenne des villosités.

L'insuline joue un rôle important dans la maturation intestinale et peut également contribuer à améliorer l'activité de la lactase après un accouchement prématuré. L'insuline est présente dans le liquide amniotique (jusqu'à 20 µU/mL) et une fois la kératinisation cutanée terminée (environ 26ème semaine de gestation), le liquide amniotique est la principale source d'exposition à l'insuline du tractus gastro-intestinal et joue un rôle dans le développement. La naissance prématurée interrompt brusquement ces processus importants de la vie fœtale et l'exposition locale à l'insuline du tractus gastro-intestinal avec des conséquences néfastes [12]. L'administration orale d'insuline chez les prématurés jusqu'à 28 jours après l'accouchement s'est avérée efficace pour doubler l'activité de la lactase. Une étude a démontré une augmentation de l'activité de la lactase et une réduction significative des résidus gastriques au cours du premier mois chez les prématurés traités avec de l'insuline orale par rapport à ceux non traités [94].

Une naissance prématurée induit une altération dans le métabolisme des acides gras et des acides biliaires [95]. Les acides biliaires sont synthétisés et excrétés par le foie via le système biliaire à des niveaux relativement faibles chez les prématurés de très faible poids de naissance par rapport aux nourrissons nés à terme. La réabsorption iléale biliaire est également plus faible chez les prématurés, ce qui entraîne une digestion des lipides moins efficace par rapport aux nourrissons nés à terme [12].

Chez les prématurés, la motilité gastrique est encore immature [96]. En particulier, les nouveau-nés prématurés nés avant 32 semaines d'âge gestationnel (grands prématurés) montrent des schémas d'activité électrique gastrique et de vidange moins développées, tandis que les

prématurés nés après 32 semaines de gestation ont des schémas d'activité électrique gastrique et de vidange plus similaires à ceux des nouveau-nés nés à terme [12]. L'activité motrice intestinale est également corrélée à l'âge gestationnel. De plus, un rôle de l'insuline est trouvé sur la motilité intestinale en démontrant une réduction des résidus gastriques au cours du premier mois chez les prématurés traités avec de l'insuline par voie orale [12].

Plusieurs études ont mis en évidence l'impact de l'immaturité et de la diversité plus faible du microbiote sur le développement de la fonction intestinale et l'anatomie des villosités intestinales, des cryptes et de la barrière intestinale [12]. L'interaction entre le développement gastro-intestinal et la colonisation microbienne est complexe : d'une part, les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles encore immatures de l'intestin prématuré prédisposent à une colonisation microbienne intestinale anormale, et d'autre part, cette dernière peut interférer avec le développement fonctionnel, immunitaire et neuronal du tractus gastro-intestinal.

III.2 Interaction du microbiote intestinal avec les cellules de la muqueuse intestinale au niveau du côlon

Le microbiote intestinal interagit avec les différentes cellules de la muqueuse intestinale de façon directe ou indirecte. La barrière épithéliale au niveau du côlon est composée d'une diversité de cellules qui se distinguent à la fois par leur localisation, mais également par leurs fonctions **(Figure 12)**. Elles interagissent entre elles et contribuent collectivement à préserver l'intégrité de la barrière.

Les cellules les plus abondantes sont les entérocytes (ou colonocytes). Elles jouent un rôle essentiel agissant comme une barrière physique, assurant l'absorption des nutriments et de l'eau, et fournissant des défenses contre les pathogènes. Ces cellules possèdent des récepteurs TLR (récepteurs du type Toll-like) qui leur permettent de reconnaître et de répondre aux composés bactériens. Les entérocytes situés à la base des cryptes métabolisent le glucose en lactate en anaérobie, tandis que les entérocytes du côté apical métabolisent en aérobie les produits bactériens tels que les AGCC [97].

Les cellules caliciformes (ou Goblet cells) jouent un rôle crucial dans la tolérance intestinale et l'induction d'une réponse immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale. Elles sont responsables de la production de mucus en sécrétant des mucines comme Muc2, principal composant de la couche de mucus [98] qui agit comme une barrière protectrice pour la

muqueuse. Le mucus recouvre l'épithélium intestinal, empêchant ainsi les bactéries de venir au contact direct avec la surface épithéliale. Dans le côlon, il existe deux couches de mucus, formant une bicouche protectrice. La première couche (couche externe) contient des bactéries de manière physiologique. Lorsque des stimuli microbiens activent les cellules caliciformes, les schémas d'expression des mucines peuvent être modifiés, entraînant une augmentation de l'épaisseur et une modification de la composition en mucine de la couche de mucus [99]. Des niveaux de mucus trop faibles peuvent augmenter la perméabilité de la barrière intestinale, la rendant plus perméable aux bactéries et aux substances indésirables. Dans l'intestin du nouveau-né, la couche de mucus est peu développée par rapport à l'intestin adulte et ce phénomène est augmenté dans le cas d'une naissance prématurée. Chez un enfant prématuré, la production de mucus sera inégale. Des études ont montré un lien entre les nouveau-nés atteints de ECUN et une altération de la couche de mucus et des cellules caliciformes [99]. Ceci suggère que le développement insuffisant de la couche de mucus peut contribuer à la vulnérabilité des nourrissons prématurés à cette maladie. Par ailleurs, certains membres de l'ordre des Clostridiales utilisent l'acide sialique associé à la mucine et le sucre fucose comme source d'énergie, ce qui favorise leur colonisation du tube digestif [100]. Les cellules caliciformes interagissent également avec les cellules dendritiques, ce qui contribue à l'induction de la tolérance envers les antigènes alimentaires et le microbiote intestinal, tout en favorisant une réponse appropriée du système immunitaire face aux pathogènes. Les cellules caliciformes jouent également un rôle essentiel dans la détection et la régulation du microbiote intestinal. Elles sécrètent la protéine de granule de zymogène 16 (Zg16), une protéine similaire aux lectines qui favorise l'agrégation des bactéries à Gram positif en se liant à leurs peptidoglycanes, ce qui empêche leur passage dans le mucus et contribue ainsi à la protection de la muqueuse intestinale. Un autre mécanisme de défense implique la sécrétion de la molécule pro-inflammatoire de type résistine β (RELMβ) par les cellules caliciformes. Cette molécule induit la mort des bactéries à Gram négatif en ciblant leurs membranes, participant ainsi à la protection de la muqueuse intestinale contre les pathogènes potentiellement dangereux [97].

Les cellules entéro-endocrines jouent un rôle important en tant que sécrétrices d'hormones dans l'intestin. Parmi elles, les cellules G produisent la gastrine, tandis que les cellules entérochromaffines produisent de la sérotonine [97]. Ces hormones ont un impact significatif sur la régulation de la composition du microbiote intestinal [100]. La gastrine est une hormone

digestive qui stimule la production d'acide gastrique par l'estomac, favorisant ainsi la digestion des aliments. La sérotonine, quant à elle, agit comme un neurotransmetteur et joue un rôle dans la régulation de diverses fonctions intestinales, telles que la motilité intestinale et la régulation de la perception de la douleur.

Les cellules tuft sont des cellules chimiosensorielles qui jouent un rôle essentiel à la fois dans la défense contre les helminthes (vers parasites) et dans le maintien de l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) [97]. Ces cellules sont impliquées dans la détection des signaux chimiques et jouent un rôle clé dans les réponses immunitaires de type 2, qui sont importantes pour la défense contre les infections parasitaires et pour la régulation des réponses inflammatoires dans les tissus. Les cellules tuft sont considérées comme des cellules sensorielles dans la muqueuse intestinale et respiratoire, et leur activation peut déclencher des cascades d'événements immunitaires qui aident à protéger l'organisme contre les parasites. Ces cellules sont très peu abondantes dans l'épithélium en comparaison aux autres types cellulaires [97].

Les cellules de Paneth sécrètent différents composés antimicrobiens, tels que des peptides antimicrobiens appelés défensines et des enzymes lysozymes. Ces substances ont des propriétés bactéricides et antiparasitaires, aidant à protéger l'intestin contre les pathogènes potentiels. En plus de leur action antimicrobienne, les cellules de Paneth contribuent également à maintenir l'équilibre du microbiote intestinal. Elles sécrètent des facteurs qui régulent la croissance des bactéries bénéfiques, contribuant ainsi à maintenir une communauté microbienne équilibrée dans l'intestin. Dans le côlon ces cellules sont peu abondantes, voire absentes. Les cellules de Paneth atteignent leur maturité vers la $10^{ème}$ semaine de gestation, mais les niveaux de libération d'alpha-défensine augmentent significativement à partir de la $29^{ème}$ semaine de gestation [101]. Cela signifie que les enfants nés prématurés avant la $29^{ème}$ semaine de gestation pourraient être plus susceptibles d'être colonisés par des pathogènes, car ils auraient moins de peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth à cette période précoce du développement.

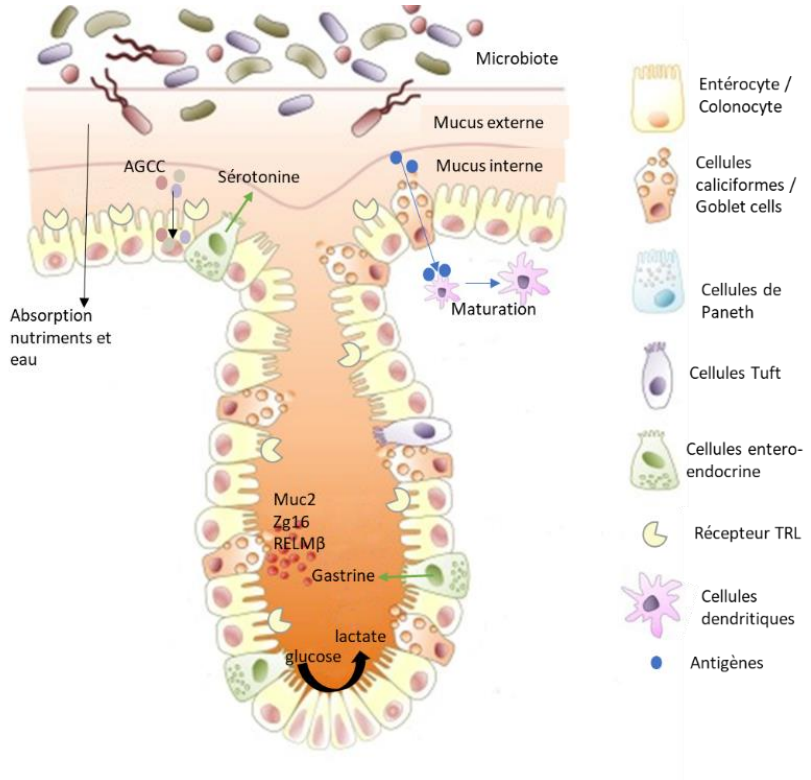


Figure 12 : Types cellulaires différents de l'épithélium du colon avec leur principales fonctions (Adaptation de [97]*)*

Les jonctions serrées (zonula occludens) jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, le contrôle de la perméabilité des cellules et le transport transépithélial de nombreuses molécules. Certaines souches bactériennes commensales favorisent la formation de ces jonctions, tandis que d'autres peuvent augmenter la perméabilité en agissant sur ces structures. Les principales protéines des jonctions serrées sont l'occludine et les claudines. Ces protéines s'associent au cytosquelette pour créer un système de support à travers la monocouche épithéliale, contribuant ainsi à la formation et au maintien de la barrière intestinale. Des études ont montré que ces protéines de jonctions serrées sont régulées à la baisse chez les enfants atteints d'ECUN, ce qui souligne leur rôle crucial dans la protection des nouveau-nés contre les pathologies intestinales [99]. L'interaction de certaines souches d'*Escherichia coli* adhérentes et invasives (AIEC) avec les protéines de jonctions serrées contribue à augmenter la perméabilité observée dans les maladies inflammatoires de l'intestin [102]. Les AGCC jouent également un rôle dans la réparation de la barrière intestinale [103]. L'expression des protéines des jonctions serrées diffère selon l'âge de l'individu. Par exemple, la claudine-2 est exprimée uniquement dans le côlon au stade fœtal et n'est pas présente chez

l'adulte [104]. Les jonctions serrées permettent un passage sélectif de molécules d'eau, d'ions, de petites et de grandes molécules, tandis qu'elles empêchent le passage de certaines protéines, lipides et peptides microbiens [105,106]. En contrôlant la perméabilité de l'épithélium intestinal, les jonctions serrées jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale et la protection contre les agents pathogènes et les substances indésirables.

Par rapport aux animaux axéniques, les animaux conventionnels présentent des caractéristiques distinctes au niveau de leur tube digestif. Ils ont une couche de mucus plus épaisse, une paroi plus fine et des villosités plus longues et plus fines [107]. Le microbiote très simplifié et peu diversifié du nouveau-né prématuré peut laisser supposer un effet barrière peu ou pas efficace favorisant les infections et les ECUN.

III.3 Impact du microbiote intestinal sur l'expression de gènes de l'hôte

L'impact du microbiote sur les cellules épithéliales a été étudié en utilisant des approches transcriptomiques comparant animaux axéniques et conventionnels. Environ 10% du transcriptome est affecté par la présence de bactéries chez les souris conventionnelles par rapport aux axéniques [108]. En ce qui concerne les fonctions biologiques affectées, environ 50% des catégories de la Gene Ontology (GO) dont l'expression est altérée est lié à l'immunité. Cela suggère que la présence du microbiote dans le tube digestif a un impact significatif sur la régulation de l'expression génétique liée à l'immunité chez les animaux conventionnels. En résumé, la présence du microbiote intestinal chez les animaux conventionnels induit des changements dans l'expression génétique, en particulier au niveau des cryptes intestinales, et ces modifications sont étroitement liées à des processus immunitaires essentiels pour le fonctionnement de l'intestin [108]. De plus, le contact avec le microbiote, mature ou immature, induit une prolifération de cellules indifférenciées (Ki67+) qui augmente la profondeur des cryptes dès le second jour de vie [109]. L'inoculation du microbiote mature provoque une augmentation de l'expression de transporteurs membranaires d'acides monocarboxyliques, de sodium et d'aquaporines. Cette interaction a été mieux comprise grâce à des expériences de colonisation avec des espèces bactériennes connues et en nombre restreint. La colonisation précoce par *Escherichia coli CEC15* provoque un remodelage épithélial affectant la structure, la

couche de mucus et les mouvements ioniques. Ces changements suggèrent que la colonisation par *E. coli CEC15* peut conduire à un état de l'épithélium intestinal plus favorable à la présence et au maintien d'une composition bactérienne équilibrée dans l'intestin [110].

La spécificité du dialogue hôte-microbiote repose donc sur des interactions spécifiques avec certaines espèces bactériennes. Dans une étude récente, des chercheurs ont réalisé des co-cultures de colonocytes humains avec des microbiotes provenant d'individus sains différents pendant quelques heures et ont analysé la réponse des colonocytes au niveau transcriptomique, ainsi que les variations de la composition du microbiote pendant l'expérience [111]. Une grande variabilité dans la réponse des colonocytes a été observée avec notamment un enrichissement pour les fonctions d'adhérence cellulaire. Les auteurs ont montré que certains genres bactériens tels que *Ruminococcus*, *Coprococcus* et *Streptococcus* sont associés à une modification de l'adhérence inter-cellulaire. La spécificité de l'interaction se manifeste même à l'échelle de l'espèce, car en modifiant la proportion de *Collinsella aerofaciens* dans des microbiotes sains, les auteurs ont pu faire varier l'expression de plusieurs dizaines, voire centaines, de gènes. De plus, il a été remarqué que l'expression génétique des colonocytes évolue rapidement au cours des 4 heures suivant la mise en contact avec le microbiote [111]. Ces résultats mettent en évidence la complexité et la spécificité des interactions entre le microbiote et l'épithélium intestinal, soulignant l'importance des différentes espèces bactériennes dans la régulation de la réponse épithéliale ainsi que pour la primo-colonisation.

Les AGCC modulent la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales pour renforcer les fonctions de barrières intestinales. Des études récentes ont suggéré que le butyrate réprime l'expression de l'hexokinase (HK2) et réduit la respiration mitochondriale, ce qui offre une voie thérapeutique pour l'inflammation du tractus gastro-intestinal [100]. De plus, HK, impliquée dans la première étape de la glycolyse, est fortement exprimée dans les cellules épithéliales et joue un rôle dans les réponses immunitaires, étant régulée positivement pendant l'inflammation.

Des études récentes ont mis en évidence des effets contrastés des acides biliaires sur les cellules épithéliales. Le DCA (acide deoxycholique) a été associé à l'inhibition de la prolifération des cellules en activant le récepteur farnésoïde X (FXR) et à l'inhibition de la réparation de la barrière intestinale. En revanche, l'UDCA (acide ursodésoxycholique) semble bénéfique pour la

réparation de la barrière épithéliale en agissant via la voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR). Ces découvertes soulignent l'importance de l'équilibre des acides biliaires dans la régulation de la fonction intestinale et de la barrière épithéliale, et ouvrent des perspectives intéressantes pour la compréhension et le développement de traitements potentiels liés à ces voies de signalisation [100].

Les métabolites dérivés du microbiote intestinal à partir du tryptophane jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre de la barrière intestinale. L'indole, produit par la conversion du tryptophane alimentaire par le microbiote, est reconnu par le récepteur aryl hydrocarbone (AhR) dans les cellules épithéliales intestinales, améliorant ainsi les fonctions de barrière intestinale en renforçant les jonctions serrées (Notch1) et en augmentant l'expression du récepteur IL-10, offrant ainsi une protection contre la colite chez les souris. D'autres métabolites dérivés de l'indole, tels que l'acide indole-3-propionique (IPA), ont également été identifiés comme renforçant la barrière intestinale en augmentant les produits de sécrétion des cellules caliciformes et les mucines. De plus, certains métabolites de l'indole, comme l'indole-3-éthanol, l'indole-3-pyruvate et l'indole-3-aldéhyde, ont été associés à la préservation des jonctions serrées et des protéines régulatrices dans la barrière intestinale via AhR. Des études ont montré que l'administration d'indole-3-carboxaldéhyde (ICA) protège la barrière intestinale en réduisant la translocation bactérienne transépithéliale grâce à la signalisation de l'interféron de type I (IFN1) dans la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). De plus, l'indole peut également réguler à la hausse l'expression de molécules associées à la jonction cellulaire (claudines, occludines) via l'activation du récepteur du prégnane X (PXR) [100]. Dans l'ensemble, l'activation de AhR, IFN1 et PXR dans les cellules épithéliales intestinales par l'indole améliore l'intégrité de la barrière intestinale.

En plus des métabolites du microbiote intestinal, certains composants bactériens, tels que la flagelline et le lipopolysaccharide (LPS), contribuent à la prolifération cellulaire et à la production de cytokines et de molécules antimicrobiennes dans les cellules épithéliales intestinales via les récepteurs de type NOD (NLR) et les récepteurs de type Toll (TLR) [100].

Pris ensemble, ces résultats indiquent que les métabolites du microbiote intestinal, les composants bactériens et l'adhésion bactérienne jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, la prolifération des cellules épithéliales intestinales et la protection contre les infections bactériennes dans le tractus gastro-intestinal.

III.4 Immunité intestinale

Le système immunitaire intestinal, également connu sous le nom de tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), est un organe lymphoïde secondaire essentiel pour la prise en charge des antigènes et le développement d'une réponse immunitaire dans l'intestin. Le GALT peut être présent dans l'épithélium intestinal, la lamina propria ou sous forme de follicules lymphoïdes tels que les plaques de Peyer [112]. Le GALT se caractérise par la diversité de cellules qu'il englobe, réparties le long de l'intestin et dans les différentes couches tissulaires, et impliquées dans l'immunité innée et adaptative.

La colonisation de surface de la muqueuse par des microorganismes et le développement du système immunitaire ont lieu simultanément au début de la vie. Le microbiote présent à la surface de la muqueuse peut influencer directement ou indirectement le système immunitaire pendant sa maturation. Peu après la naissance, les nourrissons possèdent une immunité innée assez bien développée, tandis que l'immunité adaptative se développera grâce aux anticorps transmis par le lait maternel. Le développement du système immunitaire intestinal est d'une importance capitale après la naissance, et il est étroitement lié à l'abondance et à la diversité du microbiote intestinal. Les cellules immunitaires se complexifient à mesure que le microbiote se diversifie et se développe [33]. Une étude menée sur des enfants prématurés a révélé que la présence accrue de *Klebsiella* dans le microbiote induisait une augmentation de l'expression des cellules YdT, de l'IL-17 et du VEGFA, tandis que la prédominance de *Staphylococcus*, *Enterococcus* ou *Escherichia* entraînait une expression plus élevée de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) et de PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) **(Figure 13)**. Le BDNF est une neurotrophine qui joue un rôle dans la croissance des cellules nerveuse ainsi que dans la régulation de l'humeur et du stress [113], tandis que le PDGF est un facteur de croissance des cellules sanguines et joue un rôle dans la cicatrisation des plaies et la régénération tissulaire en stimulant la division cellulaire [114]. Ces deux groupes de microbiotes étaient respectivement associés à des enfants présentant des lésions cérébrales graves et à ceux sans ou avec des lésions cérébrales faibles [115].

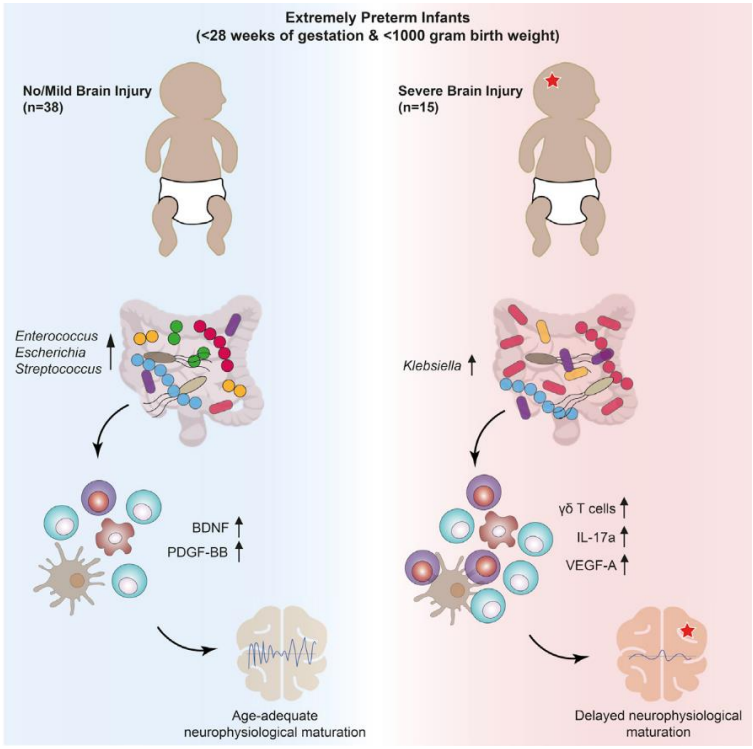


Figure 13 : Développement anormal de l'axe microbiote-système immunitaire-cerveau chez les nouveau-nés prématurés atteints de lésions cérébrales [115]

Les métabolites et composants bactériens ont un impact significatif sur l'immunité intestinale. Les métabolites bactériens peuvent agir directement sur la muqueuse intestinale ou entrer dans la circulation sanguine via les cellules épithéliales. Ces métabolites modulent la réponse immunitaire par divers mécanismes. Par exemple, la production d'AGCC influence le système immunitaire [40]. Certains métabolites se lient à des récepteurs spécifiques présents sur les cellules hôtes, tels que le récepteur d'hydrocarbure arylique (AhR), les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs de type Toll (TLR) et les récepteurs PXR. Les polyamines, comme la spermine, la putrescine et la spermidine, jouent un rôle dans la régulation de la transcription [40].

Les composants bactériens, tels que les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée en étant responsables de la détection, de la réponse et de la coordination des antigènes du soi et du non-soi. Ces PRR sont capables de reconnaître une variété de composants provenant de divers microorganismes tels que les champignons, les virus et les bactéries. Parmi ces composants se trouvent les peptidoglycanes, les lipopolysaccharides, les peptides formyl, les structures uniques d'acides nucléiques et la flagelline. Lorsque les PRR sont activés, ils déclenchent une cascade de signaux qui aboutit à la

libération de chimiokines, de facteurs apoptotiques et de cytokines. Ces réponses immunitaires sont essentielles pour lutter contre les infections et contribuent à la réponse inflammatoire en cas de maladie **(Figure 14)** [40].

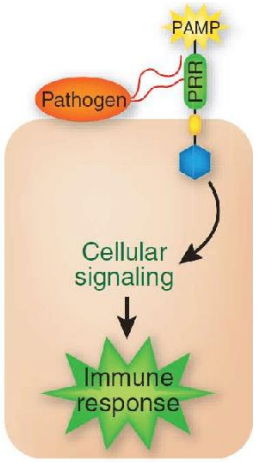


Figure 14 : Schéma représentant le système de PRR présent sur les cellules épithéliales aboutissant à une réponse immunitaire [116]

Le système immunitaire inné **(Figure 15)** constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes dans l'intestin, agissant de manière non spécifique. Parmi les acteurs clés figurent les macrophages, qui sont les principaux leucocytes présents dans la lamina propria intestinale, ainsi que les neutrophiles, qui représentent environ 50-60% des leucocytes sanguins [117]. Les neutrophiles possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs tels que les TLR et jouent un rôle important dans la défense contre les pathogènes microbiens via des mécanismes tels que la phagocytose et la dégranulation. Les neutrophiles présents chez les prématurés peuvent rencontrer des difficultés à migrer vers les sites d'infection en raison d'une réduction de l'expression des molécules d'adhésion telles que la L- et la E-sélectine [118]. Le contact des pathogènes avec les neutrophiles entraîne une production massive de radicaux libres d'oxygène (ROS) et la libération de granules contenant des peptides anti-microbiens (alpha-défensines et cathélicidines). La production de peptides anti-microbiens par le nourrisson est corrélée avec l'âge gestationnel [118]. Les cellules dendritiques jouent également un rôle crucial en détectant les microorganismes pathogènes, qu'ils soient microbiens ou fongiques, grâce à leurs récepteurs de reconnaissance de motifs tels que les TLR et les récepteurs cytoplasmiques de type NOD. Cette détection déclenche une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation du facteur de transcription NF-κB, entraînant la transcription et la production de médiateurs pro-inflammatoires, l'assemblage

d'inflammasomes et l'activation de voies de réparation épithéliale. D'autres cellules immunitaires innées présentes dans l'intestin comprennent les lymphocytes T innés associés à la muqueuse (MAIT) et les lymphocytes NK invariants (iNK). Lorsqu'ils sont activés par des bactéries, les MAIT induisent une activité cytolytique, tandis que les iNK produisent de l'IL-4 et de l'IFN-γ [119]. Le fœtus produit une quantité de facteurs solubles (immunoglobine, Ig) limitée de sorte qu'il dépende de l'approvisionnement maternel. L'IgG est transférée à travers le placenta depuis la circulation maternelle en grandes quantités après 32 semaines de gestation et augmente avec l'âge gestationnel. Les prématurés ont donc de faibles taux d'IgG maternelles circulantes pouvant entraîner une déficience de la phagocytose [118].

Contrairement à la réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative **(Figure 15)** se caractérise par sa haute spécificité et sa durabilité. Elle est orchestrée par les lymphocytes T et B, qui coopèrent entre eux et avec le système immunitaire inné pour assurer une réponse immune ciblée et efficace. La maturation de l'immunité adaptative se produit principalement après la naissance, de sorte que tous les nouveau-nés présentent des déficiences dans l'activation des cellules T et B par rapport aux adultes. Dans l'intestin, l'activation des lymphocytes T peut se produire directement dans la lamina propria ou les plaques de Peyer. Suite à leur activation, les lymphocytes T subissent une différenciation qui détermine le type de réponse immunitaire locale induite [120]. Au sein de l'intestin, les lymphocytes B jouent un rôle important en produisant des immunoglobulines A (IgA) qui peuvent migrer jusqu'à la lumière intestinale. Ces IgA neutralisent les pathogènes en les piégeant dans le mucus [31]. La présence du microbiote intestinal est essentielle, car elle influence la production d'IgA sécrétoires et l'expression accrue du récepteur pIgR dans le côlon. Cette interaction avec le microbiote intestinal contribue à renforcer la protection de la muqueuse intestinale contre les pathogènes [119].

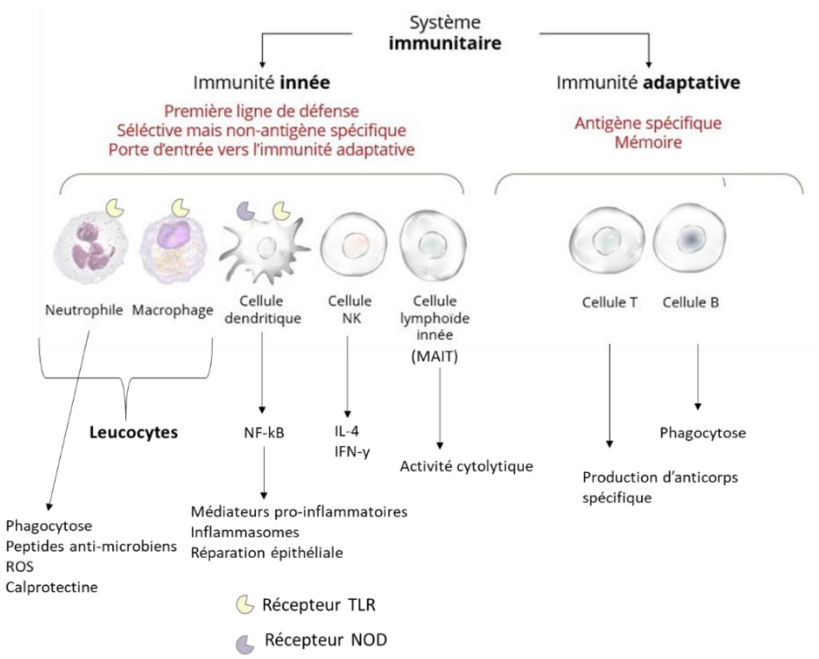


Figure 15 : Différentes cellules et leurs principales fonctions composant le système immunitaire intestinal

La calprotectine, produite par les leucocytes a également un rôle très important. Le complexe S100A8/S100A9 active les réponses immunitaires innées et favorise l'inflammation. La calprotectine peut déclencher la chimiotaxie des neutrophiles et l'adhésion endothéliale. De plus, elle exerce une activité antimicrobienne qui a été largement étudiée [121]. Le complexe S100A8/A9 permet la chélation de divers ions de métaux de transition qui sont cruciaux pour les bactéries intestinales invasives et commensales, car participant à des fonctions enzymatiques bactériennes, à l'homéostasie cellulaire et aux cascades de signalisation [121]. De nombreux microorganismes ont acquis la capacité de surmonter et d'échapper à la privation de métaux induite par le complexe grâce à l'expression de transporteurs de métaux de haute affinité ou d'altérations métaboliques. Néanmoins, le déficit en S100A8/S100A9 chez la souris altère le microbiote intestinal, et les souris dépourvues de S100A9 présentent une sensibilité à l'infection à *Streptococcus pneumoniae*. De plus, certaines études ont montré que les concentrations fécales de calprotectine sont physiologiquement élevées chez les enfants de moins de 4 ans par rapport aux adultes [121–124]. Par ailleurs, des niveaux élevés de S100A8 et S100A9 sont contenus dans le lait maternel, indiquant un rôle de ces molécules dans la formation du système immunitaire des nouveau-nés. Il a été démontré que S100A8 et S100A9 régulent la programmation de l'immunité intestinale et que des niveaux élevés de calprotectine fécale sont associés à la colonisation intestinale par un microbiote favorable chez les nouveau-nés [121].

III.5 Développement de l'axe intestin-cerveau

La prématurité est connue pour avoir des conséquences sur le développement cognitif à court et long terme. Les enfants nés prématurés sont plus sujets, entre autres, aux lésions cérébrales, aux troubles de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), aux troubles du spectre autistique (TSA), du comportement alimentaire et de l'apprentissage [125,126].

L'axe intestin-cerveau est un concept de recherche émergent qui met en évidence les interactions étroites et complexes entre le système nerveux entérique de l'intestin et le système nerveux central du cerveau [127]. La régulation de la fonction du système nerveux central (SNC) s'effectue via le développement et la maturation des systèmes immunitaire et endocrinien. Les cellules neuro-immunes communiquent avec les microorganismes intestinaux et leurs métabolites au cours du développement du cerveau (neurotransmetteurs, acides gras à chaîne courte, métabolites du tryptophane ou autres acides aminés, peptidoglycanes...) [128]. Notamment, certains métabolites bactériens sont connus pour avoir des effets précis. La nicotinamide-N-oxide permet d'améliorer la fonction cognitive, l'indole (produit du tryptophane) permet de soulager l'anxiété et les AGCC permettent le développement du cerveau fœtal et d'atténuer les déficits comportementaux et les troubles cognitifs [129]. De plus, le nicotinamide-N-oxide a été montré comme supprimant la progression de l'encéphalite à herpès simplex [129]. De plus, certains de ces métabolites peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) et affecter la neurogenèse et la myélinisation [128]. Le microbiote intestinal et les cellules jouent également un rôle en produisant des neurotransmetteurs essentiels aux processus neurodéveloppementaux et à la neurophysiologie tels que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), la dopamine, l'acide glutamique, la 5-hydroxyryptamine (5-HT), la noradrénaline et l'histamine [128,129]. Les cellules endocrines peuvent transmettre des informations au cerveau en libérant des hormones ou agir directement sur le nerf vague via le glutamate ou le 5-HT car le nerf vague permet une activation directe du système nerveux entérique vers le SNC [129]. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) joue un rôle particulièrement important dans l'axe intestin-cerveau et est associé aux troubles anxieux et au stress **(Figure 16)**. Dans l'autre sens, les signaux peuvent également influencer les niveaux d'inflammation et de stress oxydatif dans le cerveau des nourrissons en particulier chez les prématurés, ce qui a des implications importantes pour le développement neurologique et la susceptibilité aux maladies neurologiques [130]. Les signaux du cerveau peuvent moduler la

motilité intestinale, la sécrétion de mucus et d'enzymes digestives, ainsi que la composition du microbiote.

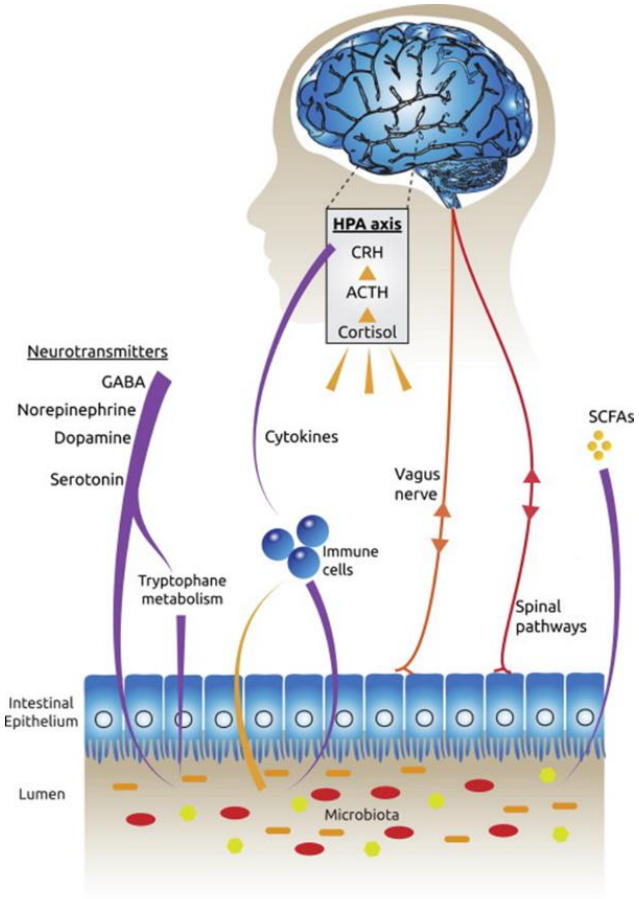


Figure 16 : Voies de l'axe intestin-cerveau [131]

En l'absence de colonisation mature au début du développement, des modèles murins présentent des déficits immunitaires importants, des troubles sévères du développement cérébral, des troubles du comportement, des déficits d'apprentissage et de mémoire des anomalies dans la structure et la fonction cérébrale [128]. Ces effets peuvent persister plus tard dans l'enfance et à l'âge adulte, ce qui souligne l'importance d'un microbiote sain pendant les phases clés du développement neurologique [130]. Une étude menée chez des nourrissons âgés d'un an a montré une association négative entre des niveaux élevés de *Veillonella*, *Dialister* et *Clostridiales*, des niveaux faibles de *Bacteroides* dans le microbiote intestinal, et le développement du cortex préfrontal et l'amygdale, qui sont des structures cérébrales régulant le comportement de peur [132]. Une supplémentation par *Lactobacillus rhamnosus GG* et *Lactobacillus reuteri* chez les nourrissons peut réduire l'incidence du TSA et du TDAH en grandissant [130,133]. Les nourrissons d'un an ayant un microbiote intestinal à dominance

Bacteroides ont un développement cognitif favorable à 2 ans par rapport à ceux à dominance Firmicutes ou Proteobacteria [134]. Une augmentation de l'abondance de *Bifidobacterium* est associée à des niveaux accrus de cyclohexadienyl déshydratase, un précurseur de la dopamine, ainsi qu'à des réponses neuronales réduites pour récompenser l'anticipation, qui constitue une caractéristique du TDAH [135]. Les altérations de la composition du microbiote intestinal et la présence réduite d'AGCC ont été identifiées comme des facteurs significatifs contribuant aux troubles cognitifs chez les rats prématurés [136]. Le groupe présentant des troubles cognitifs montrait une diminution de la diversité du microbiote intestinal, une augmentation de l'abondance des Proteobacteria, de *Oligella*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus* et *Enterococcus* tandis que l'abondance de *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* et *Alistipes* était significativement plus faible. La supplémentation en *Enterococcus faecalis* peut limiter la production de corticostérone médiée par l'axe HTA, supprimer la réponse au stress et stimuler l'activité sociale chez les souris tandis que des prébiotiques comme l'oligosaccharide de mannane peuvent réguler à la hausse la noradrénaline pour améliorer la mémoire ou la cognition [129]. Les métabolites microbiens produits dans l'intestin peuvent augmenter la production de ROS dans la microglie de la souris, inhiber l'activité mitochondriale et l'accumulation d'ATP et limiter l'expression des gènes liés à la sénescence dans la microglie cérébrale [129]. *Clostridium butyricum* permettrait quant à lui de soulager les troubles cognitifs [129].

Chez les enfants nés prématurés, cet axe joue un rôle crucial dans le développement neurologique, la santé intestinale et la régulation du système immunitaire. Leurs systèmes nerveux central et entérique régulent les fonctions digestives qui ne sont pas entièrement développées. Cela les rend particulièrement vulnérables à diverses complications de santé, y compris les problèmes intestinaux et neurologiques. Le microbiote intestinal devient une communauté stable en même temps que le développement du système nerveux au cours des 2-3 premières années de vie [137]. De plus, il a été montré qu'il influence le développement du cerveau et du comportement de l'hôte. De ce fait, un concept est proposé pour considérer la maturité du microbiote comme un facteur prédictif du développement neurologique [138]. Les enfants prématurés sont à risque d'obtenir des scores réduits aux tests cognitifs et leur immaturité à la naissance est directement proportionnelle aux scores cognitifs moyens à l'âge scolaire. Une étude montre que les altérations de la communauté microbienne intestinale peuvent être associées à un risque de neurodysplasie chez les nouveau-nés prématurés. Au

total, 94 nouveau-nés ont été inscrits et divisés en quatre groupes en fonction de l'âge gestationnel et des résultats neurodéveloppementaux. Une abondance relative plus élevée de *Streptococcus* et une abondance relative plus faible de *Bifidobacterium* et *Veillonella* à 3 mois étaient associées à de mauvais résultats neurodéveloppementaux chez les prématurés, alors qu'il n'y avait aucune différence dans la composition microbienne intestinale pour les nourrissons nés à terme [139]. De plus, les souris colonisées avec des échantillons fécaux d'enfants prématurés développent un profil métabolique marqué par des niveaux accrus de plusieurs analogues d'acylcarnitine avec une maturation cérébrale retardée, des déficits de locomotion, d'anxiété et de troubles de la mémoire [140].

La nutrition des prématurés joue également un rôle essentiel dans l'axe intestin-cerveau. La relation entre l'allaitement précoce et exclusif au lait maternel et la réduction des comorbidités néonatales est bien connue et le lait maternel est considéré comme l'aliment contenant le plus de nutriments riches tels que les acides gras polyinsaturés à chaîne longue, contribuant à la neurogenèse pour les enfants nés à terme [130]. Ce mode d'alimentation est bénéfique pour le développement du langage à 12 et 18 mois et le développement cognitif à 18 mois et permet des résultats de développement neurologique optimaux via un mécanisme de régulation de la structure du microbiote intestinal.

IV. Exposomes des enfants prématurés

IV.1 Importance de la compréhension de l'exposome des enfants prématurés

L'exposome, défini par l'Institut national de la santé environnementale et l'Institut national de la sécurité et de la santé au travail comme la mesure de toutes les expositions d'un individu au cours de sa vie, est un concept important dans un contexte de recherche sur le microbiote. Cela inclut toutes les interactions entre l'environnement et l'organisme en développement qui peuvent influencer la santé et le développement des enfants prématurés tout au long de leur vie. Les prématurés sont souvent plus vulnérables aux influences de l'environnement en raison de leur développement incomplet. Leur exposome peut être influencé par divers facteurs, tels que l'environnement intra-utérin (alimentation, exposition de la mère aux produits chimiques),

les soins néonataux (médicaments, interventions médicales, dispositifs médicaux) ou l'environnement postnatal.

Comprendre l'exposome des enfants prématurés est essentiel pour appréhender l'ensemble des facteurs qui peuvent influencer leur santé et leur bien-être tout au long de leur vie. Des recherches approfondies dans ce domaine permettent de mieux cerner les risques potentiels et d'identifier les facteurs qui peuvent être modifiés ou atténués pour améliorer les résultats de santé à long terme des enfants prématurés. Comprendre ces interactions entre l'environnement et le développement des enfants prématurés est crucial pour optimiser leur santé, leur bien-être et leur qualité de vie tout au long de leur parcours de vie.

IV.2 Exposition chimique

Une étude exploratoire récente a rapporté que les nouveau-nés de l'USIN étaient exposés au bisphénol A (BPA) et aux parabènes [141] via des équipements par voie inhalatrice, cutanée, orale et parentérale.

Le bisphénol A **(Figure 17)** est une substance chimique de synthèse utilisée depuis plus de 50 ans dans un grand nombre d'applications industrielles. Ses deux principales utilisations ont longtemps été la fabrication de plastique et de résines époxydes. Il est aussi utilisé comme composant d'autres polymères et résines [142]. Comme les enfants nés prématurés sont pris en charge dans des couveuses, ont une assistance respiratoire, une alimentation par voie entérale, ils sont donc en contact fréquent avec du plastique. Le BPA était un produit chimique largement utilisé dans la fabrication de plastiques et de résines, notamment dans la production des biberons en plastique, de revêtements intérieurs de conserves alimentaires, de jouets en plastique et d'autres produits courants. Il était également présent dans certains matériels médicaux, tels que les tubes de perfusion et les dispositifs médicaux (cathéters, tubulures et contenants pour l'alimentation et les médicaments). Les enfants prématurés sont donc en contact régulier avec ce produit chimique [141]. Une étude a montré des concentrations de BPA 16 à 32 fois plus élevées chez les nourrissons hospitalisés que chez les nourrissons et les enfants en bonne santé [143].

Le BPA peut migrer des contenants alimentaires sous l'action de la chaleur et du pH [144]. De plus, il peut être absorbé par la peau s'il est présent dans les produits de cosmétiques ou de soins médicaux tels que les adhésifs médicaux. Une fraction du BPA absorbé peut être stockée

dans le tissu adipeux blanc, puis se libérer lentement dans le sang et finalement dans l'urine [145]. L'impact du BPA sur le microbiote intestinal a largement été étudié. Par exemple, *Akkermansia* et *Methanobrevibacter* [146] sont impactés négativement par la présence de BPA et les Proteobacteria [147] voient leur abondance augmenter. La diversité alpha du microbiote intestinal est également diminuée par la présence de BPA. Récemment, une étude a montré que le BPA pouvait être métabolisé par le microbiote intestinal. Sous exposition continue au BPA, les abondances de nombreux genres microbiens intestinaux étaient significativement corrélées avec la proportion de BPA ou de ses métabolites dans le sang, l'urine et les fèces des rats [147].

Cependant, les recherches sur l'impact spécifique du BPA sur les enfants prématurés sont encore limitées. Les préoccupations concernant l'exposition au BPA ont conduit à des mesures réglementaires récentes visant à restreindre son utilisation dans certains produits et matériaux, en particulier ceux destinés aux nourrissons et aux jeunes enfants. Depuis 2015, l'usage du BPA est proscrit dans la composition des contenants alimentaires (biberons, bouteilles). Le BPA est aujourd'hui considéré comme perturbateur endocrinien et des études montrent son impact néfaste sur le développement du cerveau, du système reproducteur et immunitaire et sur la naissance prématuré [142,148,149]. Les fabricants de produits pour bébés ont également développé des alternatives sans BPA. Cependant, le BPA est souvent remplacé par le Bisphénol S (BPS) **(Figure 17)** encore peu étudié. Des études ont montré que la quantité de BPS ingérée qui accède à la circulation sanguine générale est environ 100 fois supérieure à celle du BPA. Le BPS est éliminé plus lentement de la circulation sanguine (vitesse environ 3.5 fois inférieure que le BPA), ce qui conduit à des concentrations de BPS dans le sang environ 250 fois supérieures à celles du BPA [150]. L'impact du BPS sur le microbiote intestinal n'est pas bien connu.

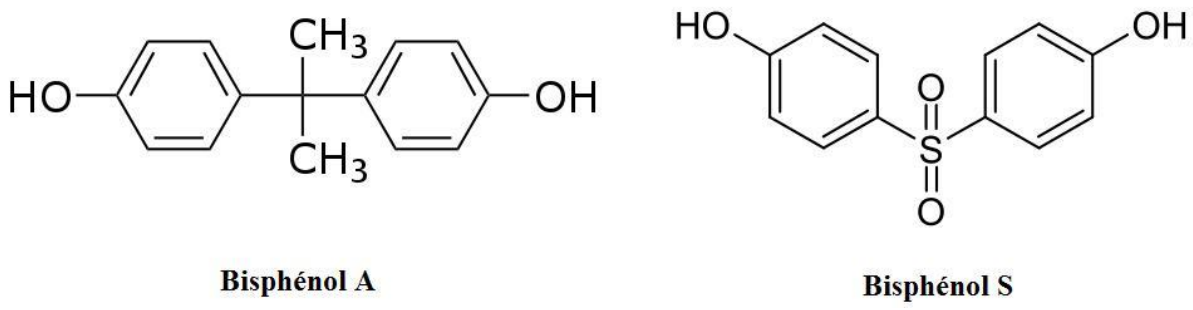


Figure 17 : Structure chimique du bisphénol A et du bisphénol S

Les parabènes sont utilisés comme conservateurs dans les produits pharmaceutiques en raison de leurs propriétés bactéricides et fongicides. Des études ont montré des associations entre plusieurs parabènes et la naissance prématurée, en plus d'effets endocriniens possibles et d'une fonction pulmonaire réduite chez les enfants [141]. Une étude a détecté des niveaux urinaires de parabènes plus élevés chez les prématurés hospitalisés que chez des adultes.

IV.3 Exposition médicamenteuse

Les enfants prématurés sont également exposés à de nombreux médicaments. L'impact des médicaments sur le microbiote intestinal des nouveau-nés prématurés est un sujet d'intérêt croissant dans la recherche pédiatrique. Les enfants prématurés sont particulièrement vulnérables en raison de leurs systèmes immunitaires sous-développés et de leur tractus gastro-intestinal immature. Par exemple, les enfants faisant partie de la cohorte EPIPAGE 2 sont exposés à de nombreux médicaments tels que de la morphine, des antibiotiques, des corticoïdes, des antiacides, de la caféine, des tranquillisants ou encore des antifongiques. Cependant, certains médicaments donnés à la mère peuvent se retrouver chez l'enfant. La dompéridone **(Figure 18)** est un antiémétique. Il peut être administré à la mère pour activer la lactation. De fait, l'un des effets secondaires de cette molécule est l'amélioration de la production de lait en augmentant les niveaux de prolactine au niveau de l'hypophyse par blocage de la dopamine[151]. Il arrive donc régulièrement qu'elle soit prescrite chez les mères d'enfants prématurés ou grands prématurés qui ne tètent pas encore afin que celles-ci puissent tirer leur lait [152]. La dompéridone est responsable du syndrome du QT long induit par les médicaments et de la mort cardiaque subite [153]. Depuis 2019, la dompéridone ne doit plus être utilisée chez le jeune enfant. Elle a la capacité de traverser le placenta et de petites quantités sont excrétées dans le lait maternel [154], ce qui implique une potentielle transmission chez le nourrisson.

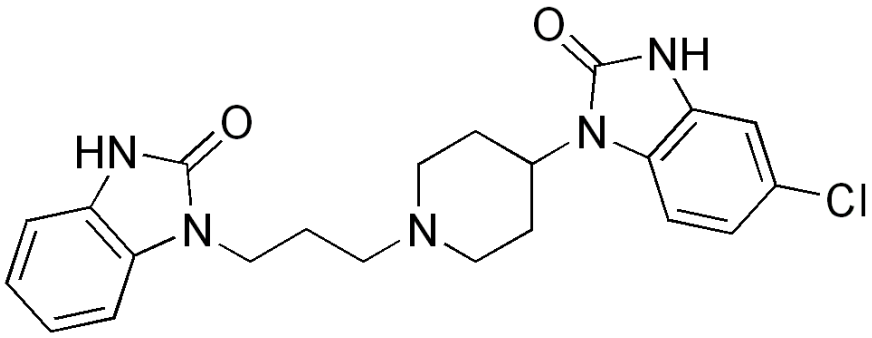


Figure 18 : Structure chimique de la dompéridone

Les excipients sont des substances inertes ajoutées aux médicaments pour faciliter leur formulation et leur administration, mais leurs effets sur le microbiote délicat des intestins des prématurés suscitent des inquiétudes **(Figure 19)**. Les excipients sont particulièrement importants dans les produits pharmaceutiques destinés aux enfants, car ils jouent un rôle essentiel dans la préparation de formulations pédiatriques adaptées. Dans une étude de prévalence dans 89 unités néonatales de soins intensifs de 21 pays européens, des excipients potentiellement nocifs ont été trouvés dans 31 % des ordonnances et administrés à 63 % des nourrissons [141].

L'utilisation d'excipients dans les médicaments administrés à ces nourrissons peut altérer la composition et la fonction de leur microbiote intestinal, ce qui peut entraîner des problèmes de santé. Des études ont montré que certains excipients, tels que le polysorbate 80 (PS80) et le propylène glycol, peuvent perturber l'équilibre du microbiote intestinal chez les prématurés. Le polysorbate 80 induit une dysbiose et une prolifération des bactéries dégradant le mucus chez les souris. Ces souris développent des colites. Les modifications du microbiote intestinal dépendantes de PS80 étaient également responsables d'altérations comportementales et neurales spécifiques au sexe chez la souris [155]. Ces excipients peuvent agir comme substrats pour des bactéries spécifiques du microbiote, favorisant ainsi la croissance de microorganismes potentiellement nuisibles et réduisant l'abondance de ceux qui sont bénéfiques. Il n'y a pas de limites acceptées à l'échelle de l'industrie sur les niveaux sûrs des polysorbate (PS) en tant qu'excipients dans les formulations pédiatriques pour l'administration de produits médicamenteux contenant de la PS, en particulier pour la voie parentérale d'administration aux nouveau-nés et aux nourrissons. Cependant, récemment, une étude a montré la toxicité de ce produit de façon doses dépendante, selon l'âge et le poids de naissance [156].

De plus, certains excipients ont été liés à une augmentation de la perméabilité intestinale [157]. Cela peut permettre à des substances nocives de traverser la paroi intestinale et de pénétrer dans le sang, déclenchant ainsi une inflammation et compromettant le fonctionnement du système immunitaire. Le microbiote intestinal altéré chez les nouveau-nés prématurés peut également affecter l'absorption des nutriments et leur métabolisme, pouvant potentiellement influencer leur croissance et leur développement. De plus, les changements dans le microbiote peuvent perturber la production d'AGCC. Les effets des excipients sur le microbiote intestinal peuvent influencer le métabolisme des médicaments, entraînant une efficacité et une sécurité variables chez les prématurés [158]. L'absorption et la biodisponibilité de certains médicaments peuvent être affectées par les interactions avec les bactéries intestinales, ce qui complique davantage le traitement médical chez cette population vulnérable.

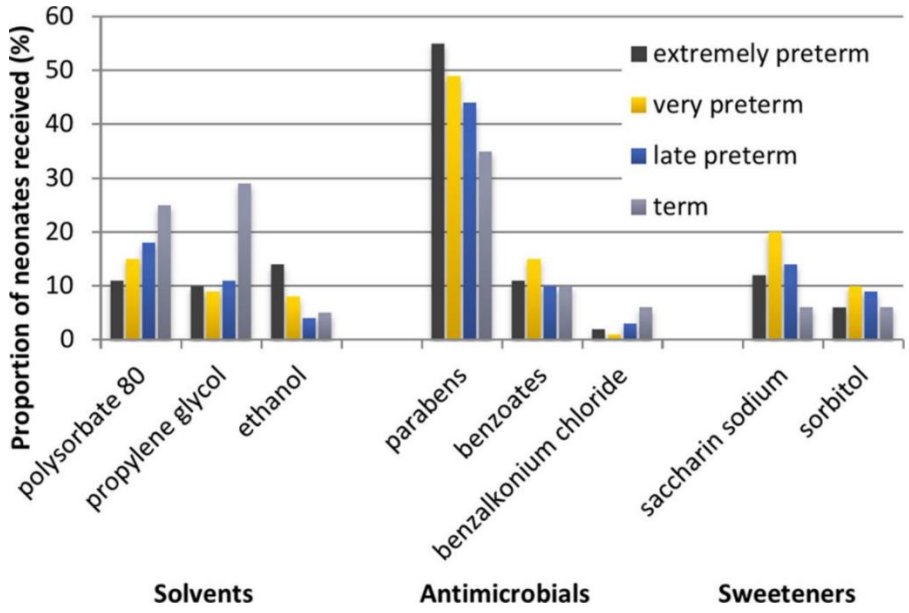


Figure 19 : Description de l'administration de 8 excipients potentiellement nocifs chez 726 nouveau-nés [158]

En conclusion, l'impact des médicaments sur le microbiote intestinal des nouveau-nés prématurés est une question complexe et multifacette. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les effets spécifiques des différents excipients et leurs interactions avec le microbiote intestinal dans cette population vulnérable.

OBJECTIFS

Il existe un dialogue permanent entre les microorganismes et les cellules intestinales de l'hôte. C'est un échange complexe qui influence la santé et le bien-être. Comprendre cette interaction permettrait d'explorer de nouvelles pistes pour améliorer la santé digestive, renforcer le système immunitaire et même influencer des aspects comme la cognition. Étudier chez les nouveau-nés prématurés les associations entre le microbiote intestinal, l'hôte, les variables périnatales et le développement cognitif à 2 ans pourrait permettre de définir des biomarqueurs de l'immaturité intestinale. Il serait alors possible de la moduler (antibiotiques, probiotiques, transplantation fécale) pour améliorer le pronostic à court et/ou long terme des grands prématurés **(Figure 20)**.

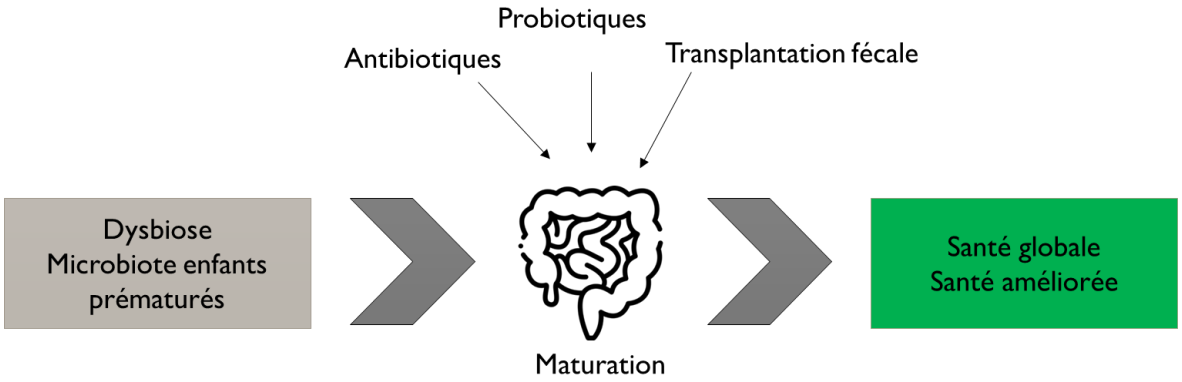


Figure 20 : Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse vise à déterminer en quoi la **communication/interaction entre l'hôte et le microbiote intestinal est différente en fonction des profils microbiens/entérotypes chez les enfants grands prématurés à 1 mois de vie** de la cohorte EPIPAGE 2. Il s'agit d'identifier les variations dans ces interactions et de déterminer si les nourrissons grands prématurés présentent un **défaut de maturation digestive globale**. Cette recherche offre l'opportunité de mieux comprendre comment le microbiote et l'hôte interagissent chez les nourrissons grands prématurés, ce qui pourrait éventuellement conduire à des interventions ciblées pour favoriser leur développement digestif et leur bien-être général.

Plus spécifiquement, les objectifs majeurs de mon travail de thèse étaient les suivants :

1. Avoir une meilleure connaissance de la **mise en place du dialogue microbiote-hôte** impliqué dans la maturation intestinale chez l'enfant. Nous cherchons à décrire les mécanismes précis par lesquels les microorganismes intestinaux interagissent avec l'hôte, en particulier pendant les phases cruciales de maturation intestinale de l'enfance. Nous visons à identifier des facteurs qui favorisent ou pénalisent la maturation intestinale normale.
2. Décrire la **réponse de l'hôte dans ce dialogue** en analysant des échantillons de fèces par une approche non invasive. Nous voulons comprendre comment le profil d'expression de l'hôte est influencé par la présence et la diversité des microorganismes intestinaux et comment cela peut avoir des répercussions sur la santé et le métabolisme.
3. Déterminer dans quelle mesure un **modèle non invasif**, basé sur des échantillons de fèces de la cohorte EPIPAGE 2, est approprié et pertinent pour mieux comprendre les dynamiques de communication entre le microbiote et l'hôte. Sachant que les fèces sont principalement constituées de microorganismes du côlon, ce modèle semble prometteur.
4. Examiner **l'impact de xénobiotiques** spécifiques et pertinents sur la mise en place de ce dialogue et les éventuels effets sur la santé.

Pour répondre à ces objectifs nous avons utilisé des approches méta-omiques permettant de décrire les interactions entre l'hôte et le microbiote, nous permettant de :

- Analyser la diversité du microbiote intestinal et du métabolisme intestinal global
- Analyser le transcriptome de l'hôte à partir de fèces et la réponse *in vitro* de cellules du côlon aux surnageants bactériens
- Isoler des souches aérobies et anaérobies provenant d'échantillons de fèces congelés de la cohorte
- Analyser la réponse des bactéries aux xénobiotiques

À travers ces méthodes intégratives, notre étude se donne pour but de jeter une lumière nouvelle sur la complexité des échanges entre l'hôte et le microbiote, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents et de leurs implications pour la santé.

MATERIELS ET METHODES

I. Cohorte et échantillons

Nous avons voulu effectuer des analyses sur des échantillons prélevés de manière non invasive pour les nourrissons grands prématurés et avons concentré nos travaux sur des échantillons de fèces du projet EPIFLORE adossé à la cohorte d'enfants grands prématurés EPIPAGE 2.

Pour ce travail de thèse, nous avons concentré nos analyses sur un groupe de 73 enfants. En nous basant sur les entérotypes décrits dans les travaux publiés en 2020 [28], nous avons déterminé 3 clusters. Ces entérotypes étaient associés à différents développements cognitifs à l'âge de 2 ans, évalués par un score du questionnaire Ages & Stages Questionnaires (ASQ). Les entérotypes 4, 5 et 6 (caractérisés par *Enterococcus*, *Staphylococcus* et une faible charge bactérienne, respectivement) regroupaient les nouveau-nés prématurés avec les moins bons résultats (Cluster C), l'entérotype 3 (enrichi en *Escherichia*) rassemblait les nourrissons avec les meilleurs résultats (Cluster A), et enfin, les entérotypes 1 et 2 (enrichis en *Clostridium* et *Klebsiella/Enterobacter*) regroupaient les nourrissons avec des résultats hétérogènes (Cluster B). De plus, ces entérotypes regroupés dans un cluster étaient également regroupés au niveau de la composition bactérienne. Nous avons sélectionné 20 échantillons de chacun de ces clusters et 13 échantillons de l'entérotype 6 (caractérisé par une faible biomasse bactérienne) qui n'a pas été analysé en composition microbienne ni en métabolomique. La sélection de ces échantillons s'est réalisée en excluant les enfants atteints de ECUN. Tous les enfants avaient un cathéter central et étaient vivants à la fin de l'étude. Nous avons analysé les échantillons prélevés à environ 1 mois de vie. Le méconium avait également été prélevé, mais il est plus compliqué à analyser (premières fèces du nourrisson) car il héberge un microbiote avec une faible biomasse et contient de fortes concentrations d'inhibiteurs de PCR [159]. Il n'est pas considéré comme des fèces au sens traditionnel, car n'étant pas une excrétion des déchets de la digestion, mais une accumulation d'acides biliaires, de sécrétions pancréatiques, de cellules épithéliales et de résidus de liquide amniotique avalé. Le méconium commence à se former à la fin du premier trimestre de la grossesse et est généralement expulsé par le nourrisson au cours de ses premiers jours de vie [159].

De nombreuses variables ont été collectées durant l'étude :

- Les variables périnatales : âge gestationnel, poids de naissance, sexe, grossesse multiple, nationalité, IMC de la mère, contexte et mode d'accouchement, administration d'antibiotiques à la mère ou l'enfant, mode de nutrition (sein, lait maternel), ruptures prématurées des membranes, pratique du peau à peau, utilisation d'insuline, intubation, surfactant, Augmentin, remplissage.
- Les variables « outcome » : mortalité ou morbidité, le score d'ASQ, transit intestinal (régulier ou non), le score d'APGAR (évaluation du nourrisson par un professionnel de santé dès la naissance).

II. Analyse du microbiote intestinal d'enfants grands prématurés âgés d'un mois

Nous avons analysé le microbiote intestinal via le séquençage du gène codant l'ARNr 16S mais également, pour certains échantillons, via une méthode de métagénomique shotgun. Notre objectif était d'identifier les taxons et souches bactériennes présentes, car de nombreuses fonctions biologiques sont spécifiques aux souches et varient au sein d'une même espèce, notamment chez *Escherichia coli*, où peuvent coexister des pathogènes, des commensaux et même des probiotiques.

La diversité alpha a été analysée via les indices de Shannon et de Simpson. Ce sont deux mesures utilisées en écologie pour évaluer la diversité d'une communauté microbienne. Ces indices permettent de quantifier la richesse spécifique (nombre d'espèces différentes) ainsi que l'équitabilité (répartition relative des individus entre les différentes espèces) au sein de la communauté. L'indice de Shannon est une mesure de la diversité spécifique d'une communauté. Il est calculé en prenant en compte la proportion d'individus de chaque espèce présente dans la communauté. L'indice de Simpson est une mesure de la concentration d'individus dans quelques espèces dominantes par rapport à la diversité totale de la communauté. Un indice de Simpson plus élevé indique une concentration plus importante d'individus dans quelques espèces dominantes, tandis qu'un indice plus proche de zéro indique une répartition plus équilibrée des individus entre les différentes espèces. Ces deux indices sont largement utilisés pour comparer la diversité entre différentes communautés

écologiques et pour évaluer l'impact des perturbations environnementales sur la biodiversité. Ils fournissent des informations importantes sur la structure des communautés et leur stabilité.

Pour l'analyse de la diversité beta, l'indice de Bray-Curtis a été utilisé. C'est une mesure de similarité ou de dissimilarité entre deux échantillons ou communautés écologiques qui permet de comparer la composition des espèces ou des variables environnementales entre différentes zones géographiques, écosystèmes ou échantillons. Il est basé sur la différence relative des abondances des espèces ou des variables entre les échantillons. Il est notamment utilisé dans les études de biodiversité, d'écologie marine, d'écologie végétale, ainsi que dans les études sur la diversité microbienne et le microbiote.

Nous avons également réalisé des isolements bactériens à l'aide de différents milieux sélectifs à partir des échantillons de fèces congelés **(Tableau 1)** envoyés pour analyse en métagénomique shotgun. Nous avons pu isoler la plupart des espèces retrouvées en analyse métagénomique shotgun.

Milieu de culture	Genres bactériens recherché
Bile-Esculine-Azide (BEA)	*Enterococcus*
Eosine au bleu de méthylène (EMB)	*Enterobacter, Escherichia*
Chapman (MSA)	*Staphylococcus*
McClung Toabe (MCT)	*Clostridium*
BD™ Bifidobacterium (BDB)	*Bifidobacterium*
De Mann, Rogosa et Sharpe (MRS)	*Bifidobacterium, Clostridium*

Tableau 1 : Milieux de culture utilisés afin d'isoler un ou plusieurs genre(s) bactérien(s) spécifique(s)

III. Analyse du métabolome fécal d'enfants grands prématurés âgés d'un mois

L'analyse des métabolites a été réalisée par méthode LC-MS (Chromatographie Liquide - Spectrométrie de Masse) par un prestataire de services (Metabolon). Elle combine la séparation des composés chimiques par chromatographie liquide (LC) avec la détection et l'identification de ces composés par spectrométrie de masse (MS). Dans la chromatographie liquide (LC), les échantillons sont dissous dans un solvant liquide et séparé par une colonne. Les différentes molécules se séparent en fonction de leurs interactions avec la phase stationnaire de la

colonne, ce qui permet de séparer les composés présents dans l'échantillon. Une fois les composés séparés, ils sont acheminés vers le spectromètre de masse (MS) qui mesure leur rapport masse/charge (m/z) et produit des spectres de masse. Ces spectres permettent d'identifier les composés présents dans l'échantillon en fonction de leurs masses et de leurs fragments caractéristiques.

Cette technique permet une détection sensible et sélective des composés présents dans un échantillon, ce qui en fait un outil précieux pour la découverte de biomarqueurs, l'étude des voies métaboliques, la pharmacocinétique des médicaments, l'analyse des protéines, entre autres applications.

La méthode LC-MS présente de nombreux intérêts et avantages. Elle offre une détection très sensible et sélective des composés présents dans un échantillon. Elle permet d'identifier des composés à des concentrations très faibles, ce qui est particulièrement utile pour détecter des métabolites, des biomarqueurs ou des contaminants dans des échantillons complexes comme des fèces. Elle peut détecter une large gamme de composés, qu'il s'agisse de petites molécules organiques, de protéines, de peptides, de lipides, de métabolites ou de médicaments. La chromatographie liquide permet une excellente séparation des composés présents dans un échantillon, ce qui évite les interférences et améliore la résolution des analyses. La LC-MS peut également être utilisée pour quantifier les composés présents dans un échantillon.

L’analyse de ces métabolites est réalisée par différents outils. MetaboAnalyst est un outil puissant pour l'analyse des données métabolomiques, permettant le prétraitement, l'analyse statistique, la visualisation et l'interprétation des données métaboliques. Il propose une variété de méthodes statistiques, des outils de visualisation et d'annotation des métabolites, ainsi que des analyses de voies métaboliques. MetOrigin est un outil bio-informatique utilisé pour identifier les sources spécifiques de métabolites et déterminer leur origine dans un échantillon. MetOrigin est particulièrement utile pour identifier les métabolites d'origine endogène et exogène, tels que les métabolites produits par le métabolisme humain et/ou bactérien ou encore ceux provenant d'aliments ou de médicaments. L'outil aide à comprendre la contribution relative de différentes sources métaboliques dans un échantillon, ce qui peut être important pour l'interprétation des données métabolomiques et pour étudier les interactions entre l'organisme hôte et son environnement.

IV. Analyse du transcriptome fécal de l'hôte

Le transcriptome de l'hôte en réponse aux différentes bactéries composant le microbiote intestinal a été analysé de deux façons.

La première a été la création d'une bibliothèque de gènes d'intérêt provenant de l'hôte présents dans les échantillons de fèces des enfants. Nous avons ainsi opté pour l'analyse transcriptomique en envoyant des échantillons d'ARNm extraits. La transcriptomique NGS (Next-Generation Sequencing ; RNA-seq) est une approche qui permet d'analyser l'expression génique à grande échelle. Dans le contexte de la transcriptomique fécale, cette méthode permet d'identifier et de quantifier les ARN issus de l'hôte en réponse à la composition du microbiote intestinal. En utilisant le NGS, il est possible d'obtenir des informations précises sur les niveaux d'expression des gènes, les voies métaboliques actives et les interactions entre les microorganismes et l'hôte.

La seconde méthode était basée sur une lignée de cellules cancéreuses de colon (HT29) exposées aux bactéries majoritaires des différents entérotypes chez les enfants grands prématurés. Il est important de noter que ces souches bactériennes n'ont pas été isolées directement des échantillons de fèces, mais étaient des souches commerciales.

V. Communautés synthétiques, création d'amorces qPCR et exposition au xénobiotique et à *Candida albicans*

Des communautés synthétiques ont été créées à partir des souches bactériennes extraites des fèces d'enfants prématurés et identifiées par séquençage d'amplicons. À partir des données de métagénomique shotgun, les communautés bactériennes sont reproduites *in vitro* selon les ratios retrouvés dans le microbiote d'enfants prématurés. Nous avons ainsi reproduit une communauté correspondant à l'entérotype *Enterococcus*. Les pourcentages de chaque espèce bactérienne sont calculés dans 2 ml de milieu mGAM qui sont transférés dans des flacons anaérobies de type pénicilline contenant soit 20 ml de mGAM, soit 15 ml mGAM (75%) + 5ml de milieu YM (25%). Les communautés synthétiques sont mises en culture puis repiquées toutes les 24h pendant 3 jours. Elles sont incubées à 37°C sous agitation à 80 tours par minute. Deux échantillons de 1 ml sont prélevés à 24h, 48h et 72h, centrifugés pendant 3 minutes à 21 300 rpm. Les culots sont récupérés pour l'extraction d'ADN et d'ARN.

Des amorces qPCR sont créées sur Primer3 (version 4.1.0) afin d'amplifier spécifiquement les espèces suivantes : *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* de l'entérotype *Enterococcus*. La reconnaissance de l'espèce bactérienne ciblée par l'amorce a été vérifiée sur BLAST et sur le RDP.

Afin d'évaluer l'impact de *Candida albicans*, des bisphénols A et S ainsi que de la dompéridone, ces derniers sont ajoutés dans le milieu de culture des communautés synthétiques bactériennes, représentatives de l'entérotype *Enterococcus*. Pour *C. albicans,* 2 µl sont ajoutés afin de correspondre à l'abondance réelle de ce champignon au sein du microbiote qui est de 0,1%. Pour la dompéridone, 0,05 mg est dilué dans 50 ml d'eau stérile, puis 140 µl sont injectés dans le milieu à J1, J2 et J3, afin de respecter l'apport quotidien de 0,14 µg. Pour les bisphénols A et S, 1mg est dilué dans 10ml d'eau stérile, puis respectivement 454 µl et 165 µl sont injectés dans le milieu à J1, J2 et J3. Chaque condition est réalisée en triplicat.

VI. Bio-informatique et analyses statistiques

Les analyses de bio-informatiques ont été réalisés à l'aide du logiciel FROGS (outils MIGALE) développé par l'INRAE ainsi qu'à l'aide de script Bash pour la création de la table d'abondance de la transcriptomique. Les analyses de biostatistiques ont été faites via les outils Rstudio ou Python.

Les tests statistiques sont réalisés selon les critères suivants **(Figure 21)** :

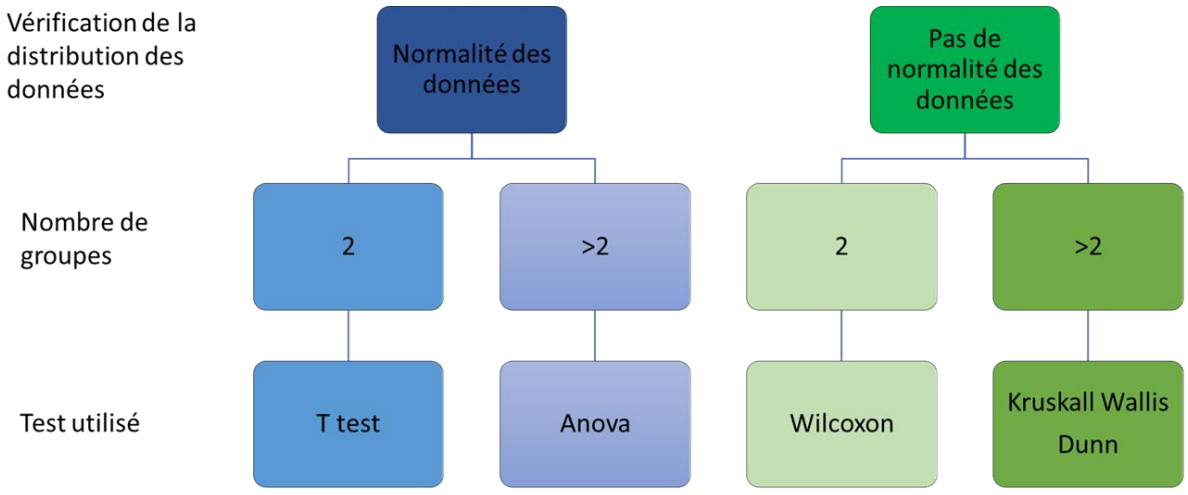


Figure 21 : Conditions d'utilisation des tests statistiques

La significativité affichée sur les graphiques correspondra à : * = Pval <0.05; ** = Pval <0.01; *** = Pval <0.001.

RESULTATS

Chapitre 1 : **Associations de variables cliniques et des genres majoritaires du microbiote intestinal dans la cohorte des 60 enfants nés grands prématurés à 1 mois d'âge.**

Les résultats de ce chapitre sont des résultats non publiés.

Chapitre 2 : **Le transit intestinal précoce chez les nourrissons prématurés est associé à des signatures fonctionnelles du microbiote intestinal à l'âge de 1 mois.**

Ce chapitre comporte un article en cours de préparation. Il a fait l'objet d'une présentation sous forme de poster lors du congrès de la Société Française de Microbiologie.

Chapitre 3 : **Dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte : impact de la naissance prématurée sur le cycle de l'acide citrique (TCA) et l'immunité chez les nourrissons âgés d'1 mois.**

Ce chapitre comporte un article soumis au journal Gut Microbes.

Chapitre 4 : **Impact de la composition du microbiote intestinal sur les grandes voies métaboliques microbiennes chez les grands prématurés âgés d'un mois**

Les résultats de ce chapitre sont des résultats non publiés.

Chapitre 5 : ***Escherichia* dans le microbiote intestinal des enfants grands prématurés à 1 mois impacte les cellules épithéliales qui expriment la calprotectine et la cathélicidine**

Les résultats de ce chapitre sont des résultats non publiés. Une partie de ces résultats ont fait l'objet d'un poster lors de la journée de l'école doctorale.

Chapitre 6 : **Impact de xénobiotiques et de *Candida albicans* sur le microbiote intestinal des enfants grands prématurés**

Ce chapitre comprend des résultats non publiés qui ont fait l'objet d'un projet de stage de Master 2 qui a été réalisé par Solène Blin que j'ai co-encadré.

CHAPITRE 1 :
Association de variables cliniques et des genres majoritaires du microbiote intestinal dans la cohorte de 60 enfants nés grands prématurés à 1 mois d'âge

1. Introduction

Étudier l'impact des variables périnatales sur le microbiote intestinal des enfants prématurés est essentiel pour de nombreuses raisons.

- Le microbiote intestinal influence la santé et le bien-être des enfants prématurés et comprendre comment certaines variables périnatales influencent sa composition peut aider à identifier des facteurs qui favorisent un microbiote sain et équilibré chez ces nourrissons.
- Le microbiote intestinal est étroitement lié au développement du système immunitaire chez les enfants prématurés. Une colonisation adéquate de l'intestin peut contribuer à la maturation du système immunitaire, aidant ainsi à lutter contre les infections et à réduire le risque de maladies inflammatoires.
- Comprendre comment l'alimentation et la nutrition des enfants prématurés influencent leur microbiote intestinal permet d'optimiser les stratégies d'alimentation pour favoriser une colonisation bactérienne bénéfique et soutenir leur croissance et leur développement.

Les variables périnatales importantes pour les prématurés incluent leur âge gestationnel, leur poids à la naissance, leur état de santé à la naissance, les complications médicales, la nutrition, les soins intensifs néonatals, les pratiques usuelles des centres hospitaliers, ect…

Les recherches sur l'impact de ces variables périnatales sur le microbiote intestinal ouvrent des pistes pour le développement de stratégies thérapeutiques personnalisées ou de précision, telles que les probiotiques ou les prébiotiques, afin de restaurer ou de maintenir un microbiote équilibré chez les enfants prématurés. Étudier l'impact des variables périnatales sur le microbiote intestinal des enfants prématurés contribuera à enrichir notre compréhension des interactions complexes entre l'hôte et les microbes, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherche en médecine et en santé publique. En somme, en approfondissant nos

connaissances sur les facteurs périnatales qui influencent le microbiote intestinal des enfants prématurés, nous visons à améliorer leur santé, prévenir les complications et développer des interventions personnalisées pour promouvoir leur bien-être et leur santé à court et long terme.

Les travaux collaboratifs de l'équipe PhylHom (projet ANR EPIFLORE, coordination MJ Butel) ont précédemment décrit la stratification d'une population d'enfants nés prématurés (n=577) en cinq entérotypes comprenant des bactéries détectables par séquençage d'amplicons [28] dans le microbiote intestinal des enfants grands prématurés: i) entérotype *Clostridium* ii) entérotype *Klebsiella/Enterobacter* iii) entérotype *Escherichia/Shigella* iv) entérotype *Enterococcus* et v) entérotype *Staphylococcus*. Un 6ème entérotype regroupe les échantillons avec une quantité de bactéries trop faible pour être détectée. D'autre part, une analyse en coordonnées principales permet de regrouper ces entérotypes en clusters par la similarité d'abondance des OTUs. Ces entérotypes étaient associés à différents développements cognitifs à l'âge de 2 ans, évalués par un score du questionnaire « Ages & Stages Questionnaires » (ASQ). Les entérotypes *Enterococcus*, *Staphylococcus* et l'entérotype à faible charge bactérienne regroupaient les nouveau-nés prématurés avec les moins bons résultats (Cluster C), l'entérotype *Escherichia* rassemblait les nourrissons avec les meilleurs résultats (Cluster A), et enfin, les entérotypes *Clostridium Klebsiella/Enterobacter* regroupaient les nourrissons avec des résultats hétérogènes (Cluster B). Le Cluster C comprenant les entérotypes *Enterococcus* et *Staphylococcus* avait également une diversité plus faible que les autres et il est connu qu'une faible diversité dans la première année de la vie est liée à l'apparition d'allergie au cours de la vie [160,161].

2. Résultats

Relation entre le microbiote intestinal à 1 mois et le développement neurologique global à 2 ans chez les grands prématurés

Le développement neurologique de l'enfant est analysé sous la forme d'un questionnaire (ASQ ; Ages and Stages Questionnaire) rempli par les parents de l'enfant à 2 ans. Ce questionnaire permet d'évaluer différents domaines du développement de l'enfant tels que la communication (compétences linguistiques de l'enfant), la motricité globale (utilisation des grands muscles du corps), la motricité fine (coordination des mains et doigts), la résolution de problèmes (comment l'enfant joue et résout des problèmes) et la sociabilité (interactions avec les autres et compétences d'auto assistance). L'interprétation de l'ASQ s'appuie sur des scores dans chaque domaine ainsi que le score total. Chaque compétence est notée sur 60 et le score total sur 300 [162]. Un score total inférieur à 185 est défini comme non optimal [162]. Nous avons précédemment mis en évidence une abondance relative plus élevée des bactéries du genre *Escherichia* dans le microbiote intestinal d'enfants ayant un score total de l'ASQ supérieur à 185 à l'âge de 2 ans (**Figure 22A**) [28] [Patin *et al* in review, Chapitre 3]. De plus, nous avons observé une corrélation positive entre le score ASQ et l'abondance relative d'*Escherichia* (**Figure 22B**).

Afin d'affiner l'analyse, nous avons étudié plus spécifiquement les associations avec les différents domaines évalués par l'ASQ. Les proportions du genre *Enterobacter* étaient plus élevées dans le groupe d'enfants avec un score ASQ supérieur à la moyenne du test pour la communication à 2 ans (p=0.02) (**Figure 22C**) tandis que le genre *Escherichia* était plus représenté dans les groupes avec un score supérieur à la moyenne pour la résolution de problème (p=0.006), la motricité globale (p=0.03) et fine (p=0.06) et la sociabilité (p=0.05) (**Figure 22D-G**). Le genre *Escherichia* était corrélé positivement avec les scores de résolution de problème (r=0.38, p=0.0027), de motricité globale (r=0.3, p=0.025) et fine (r=0.26, p=0.047) et de sociabilité (r=0.3, p=0.022). Le genre *Enterobacter* n'était pas corrélé avec le score de communication (r=0.2, p=0.9) (**Figure 22H**).

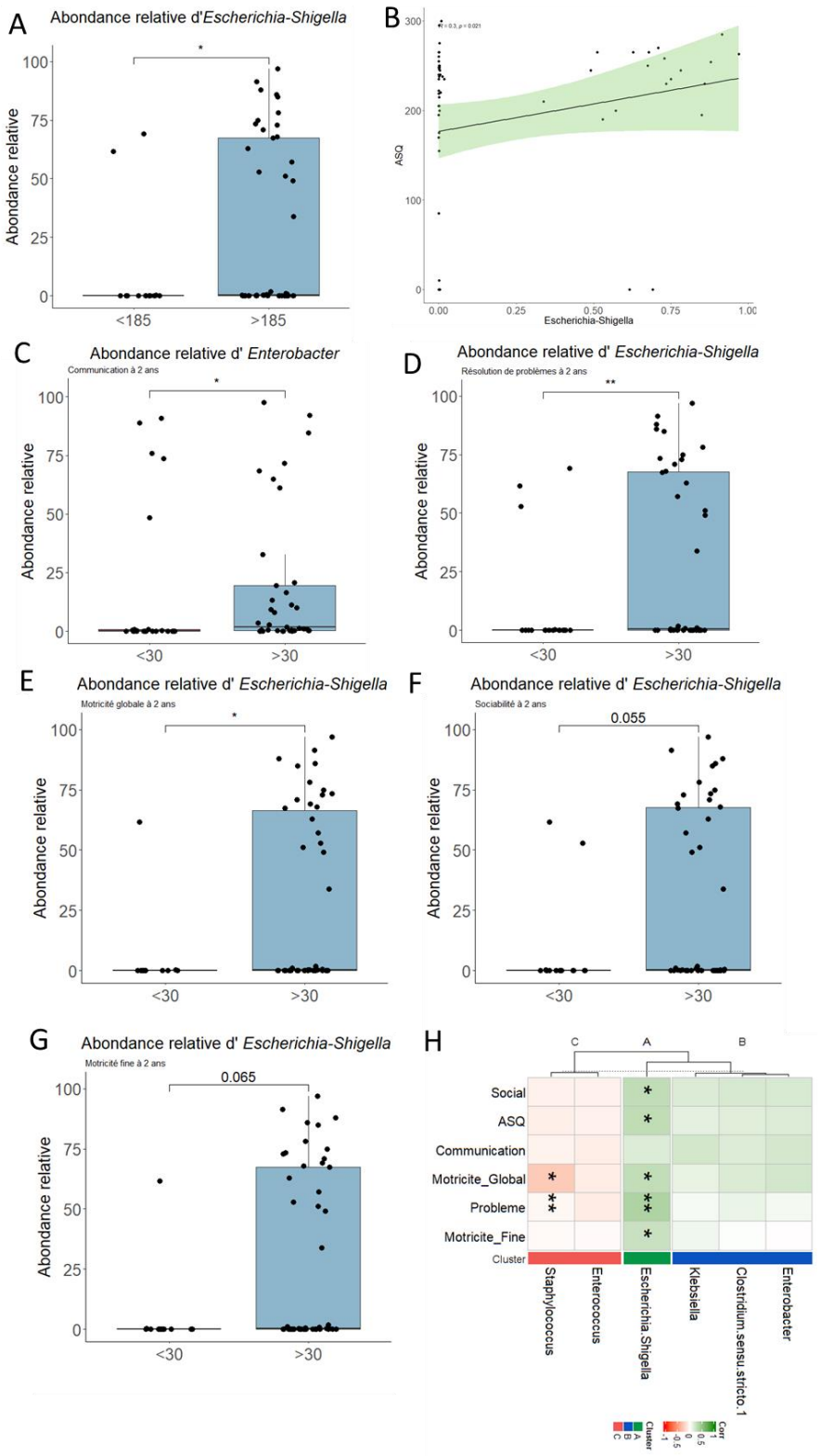


Figure 22 : Relation entre le microbiote intestinal et le développement neurologique à 2 ans

A-B/ Abondance relative et corrélation de Spearman d'Escherichia/Shigella en fonction de l'ASQ total. C-G/ Abondance d'Enterobacter dans la communication et d'Escherichia/Shigella dans la résolution de problème, la motricité globale, la sociabilité et la motricité fine à 2 ans. E/ Corrélations de Spearman entre les genres des entérotypes, l'ASQ total et les domaines d'analyses de l'ASQ.

Impact de l'âge gestationnel sur l'abondance d'*Escherichia* et de *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal des grands prématurés à 1 mois

Les enfants de la cohorte étudiée sont nés avec un âge compris entre 25 et 31 semaines d'aménorrhée (SA), les classant comme très grands prématurés et grands prématurés. Ils ont été répartis en trois sous-groupes : i) AGN1 : entre 25 et 26 SA, ii) AGN2 : entre 27 et 29 SA et iii) AGN3 : entre 30 et 31 SA.

Nous avons constaté une abondance relative plus élevée de *Staphylococcus* dans le microbiote des grands prématurés nés à un stade de gestation plus précoce (AGN1) par rapport à ceux nés à un stade de gestation plus tardif (AGN2 et AGN3) (p=0.0067 et p=0.0043 respectivement) (**Figure 23A**). À l'inverse, une plus grande abondance d'*Escherichia* était retrouvée dans le microbiote intestinal des grands prématurés à 1 mois du groupe AGN2 par rapport à AGN1 (p=0.048) (**Figure 23B**).

Parmi les genres majoritairement détectés dans le microbiote intestinal de ces enfants [28], *Staphylococcus* est corrélé négativement (r=-0.29, p=0.0015) et *Escherichia* a une tendance à une corrélation positive (r= 0.16, p= 0.034) avec l'âge gestationnel (**Figure 23C**).

Nous n'avons pas observé de différences significatives de la diversité α entre ces trois groupes d'âge gestationnel ni de différences d'abondance relative pour *Staphylococcus* et *Escherichia* entre les 3 groupes d'âges gestationnels au sein de chaque cluster.

En outre, afin de déterminer plus précisément le lien entre les variables périnatales de naissances et les espèces microbiennes, nous avons isolé des souches bactériennes directement des fèces d'enfants de la cohorte. Parmi les isolats de *Staphylococcus*, nous n'avons identifié que l'espèce *S. epidermidis*, qui est une espèce commensale de la flore cutanée.

Il existe également un lien entre l'âge gestationnel et le mode d'accouchement (césarienne ou voie basse). Dans le cadre de nos travaux, les enfants nés par césarienne représentaient 52% des enfants du groupe AGN1, 55% de ceux du groupe AGN2, et 89% du groupe AGN3. Les enfants du groupe AGN1 nés par césarienne présentaient une abondance relative de *Staphylococcus* plus élevée que les enfants nés par voie basse (p=0.002). Pour les enfants des groupes AGN2 et AGN3, on observe la même tendance, mais non significative (**Figure 23D**).

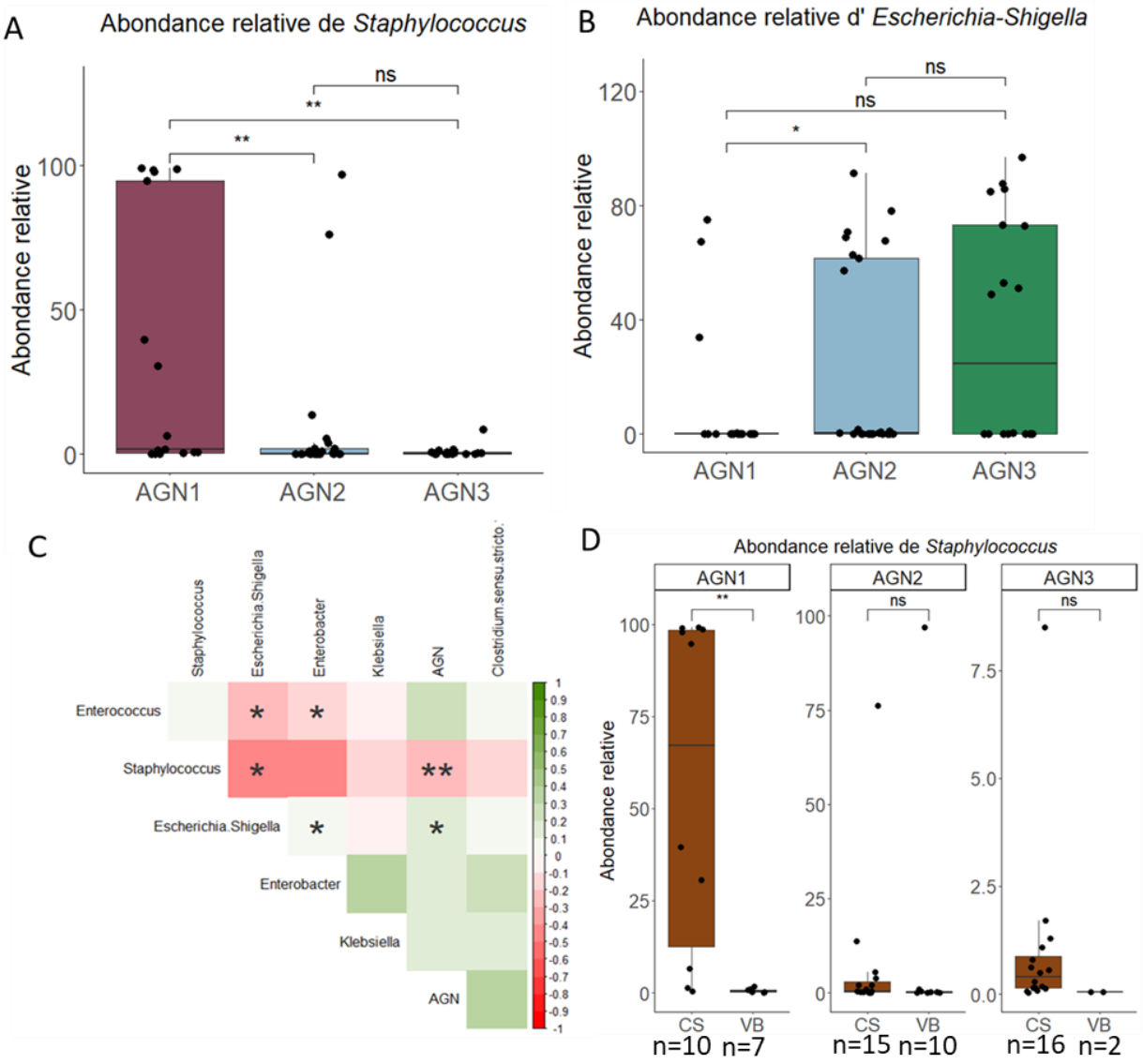


Figure 23 : L'âge gestationnel impacte le microbiote intestinal des grands prématurés à 1 mois

A/ Abondance relative de Staphylococcus en fonction de l'âge gestationnel dans le microbiote intestinal des enfants grands prématurés.
B/ Abondance relative de Escherichia/Shigella en fonction de l'âge gestationnel dans le microbiote intestinal des enfants grands prématurés.
C/ Corrélation de Spearman entre les genres bactériens majoritaires des entérotypes et l'âge gestationnel des enfants grands prématurés.
D/ Abondance relative de Staphylococcus en fonction du mode d'accouchement pour les âges gestationnels différents.

Impact significatif de l'accouchement par césarienne sur l'augmentation de *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal à 1 mois des grands prématurés

Nous savons que le mode d'accouchement à un impact sur la quantité de *Staphylococcus* en fonction de l'âge gestationnel. Nous avons voulu savoir si *Staphylococcus* était le seul genre du microbiote à être modifié par cette variable.

Nous avons observé une plus grande abondance de *Staphylococcus* dans le microbiote des enfants nés par césarienne (p=0.0083) (**Figure 24A**). De plus, il y avait une abondance relative plus élevée de *Staphylococcus* dans le microbiote des enfants nés par césarienne dans le Cluster A (p=0.0089), ainsi qu'une tendance à la hausse dans le Cluster C (p=0.066) (**Figure 24B).** Il est intéressant de noter que même chez les enfants présentant un microbiote à entérotype *Escherichia/Shigella* (Cluster A) ou *Staphylococcus* (Cluster C), le fait de naître par césarienne entraîne une plus grande abondance de *Staphylococcus*. En revanche, un entérotype *Clostridium/Enterobacter/Klebsiella* (Cluster B) n'entraîne pas de différence significative dans l'abondance de *Staphylococcus* (p=0.82).

On retrouvait plus d'*Escherichia/Shigella* dans le microbiote intestinal à 1 mois des grands prématurés nés par voie basse (**Figure 24C**). Cependant, il n'y avait pas de différence pour l'abondance de ce genre dans le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne ou voie basse au sein de chaque cluster (**Figure 24D**).

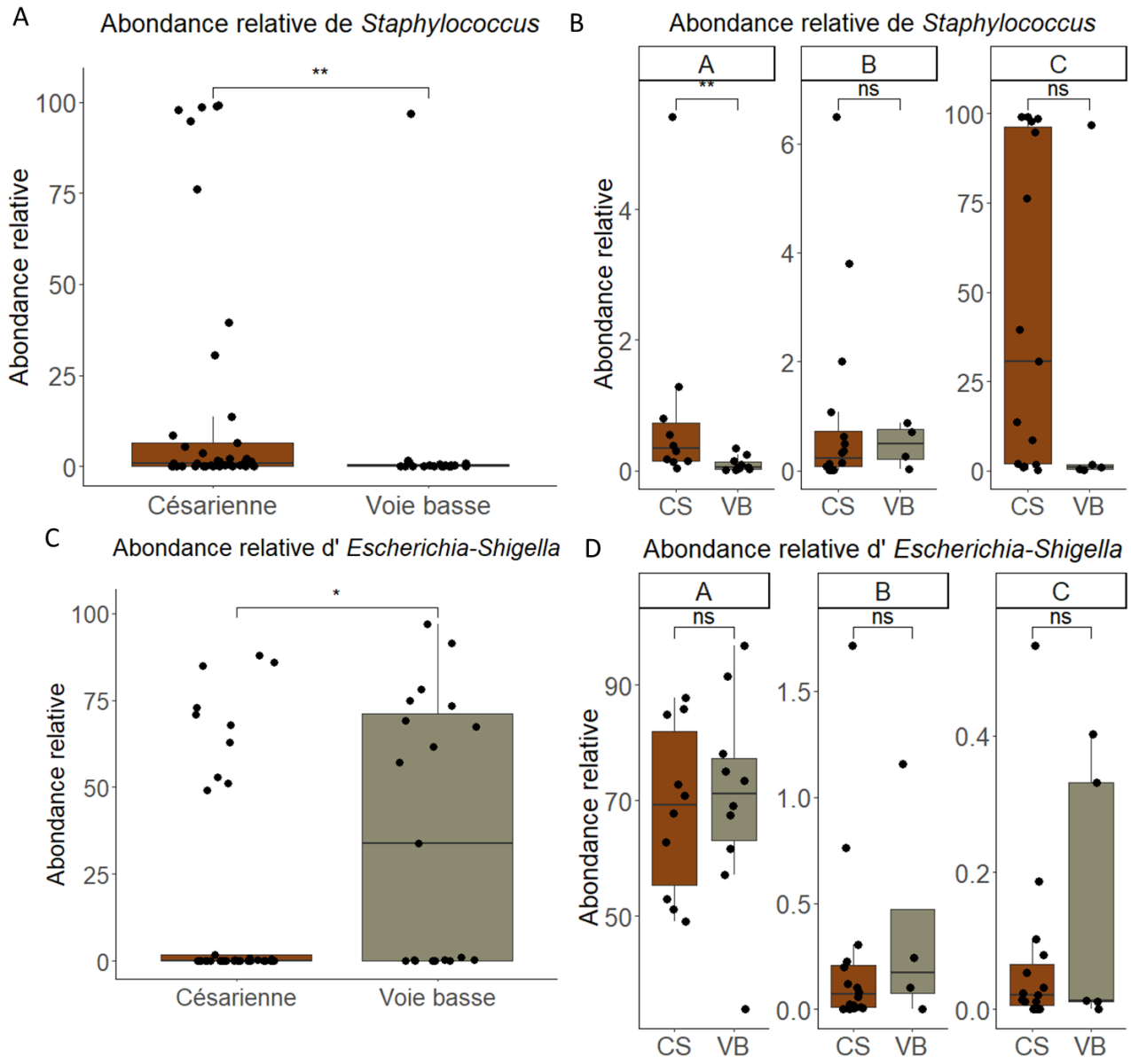


Figure 24 : Abondances relatives de Staphylococcus et Escherichia en fonction du mode d'accouchement

A/ Abondance relative de Staphylococcus en fonction du mode d'accouchement B/ Abondance relative de Staphylococcus par cluster en fonction du mode d'accouchement C/ Abondance relative d'Escherichia-Shigella en fonction du mode d'accouchement D/ Abondance relative d'Escherichia-Shigella par cluster en fonction du mode d'accouchement. (CS : Césarienne ; VB : Voie basse).

Association entre le poids de naissance et l'abondance d'*Escherichia* à 1 mois dans le microbiote intestinal des grands prématurés

Le poids des enfants à la naissance est un critère important pour la survie des enfants. Les nourrissons prématurés sont classés par poids à la naissance. Pour cette analyse, nous avons stratifié les enfants en faible poids de naissance (<1000g), poids de naissance moyen (compris entre 1000g et 1499g) et haut poids de naissance (>1500g) [3].

Nous avons constaté une abondance relative plus élevée d'*Escherichia* dans le groupe d'enfants ayant un poids de naissance élevé par rapport aux poids moyens et faibles (p=0.022 et p=0.049) (**Figure 25A**). De plus, nous avons observé une corrélation positive entre l'abondance relative de ce genre bactérien et le poids de naissance (r=0.35, p=0.0062) (**Figure 25B**). Nous avons regardé si l'appartenance à un cluster impactait ce résultat, mais nous n'avons pas trouvé de différences par cluster pour *Escherichia* en fonction du poids de naissance (**Figure 25C**). Nous avons observé une abondance relative d'*Escherichia* plus élevée dans le microbiote des grands prématurés avec un poids de naissance plus élevé pour l'âge gestationnel le plus haut (**Figure 25D**). Les autres genres bactériens n'étaient pas retrouvés différemment représentés dans le microbiote à 1 mois en fonction du poids de naissance ni corrélés avec le poids.

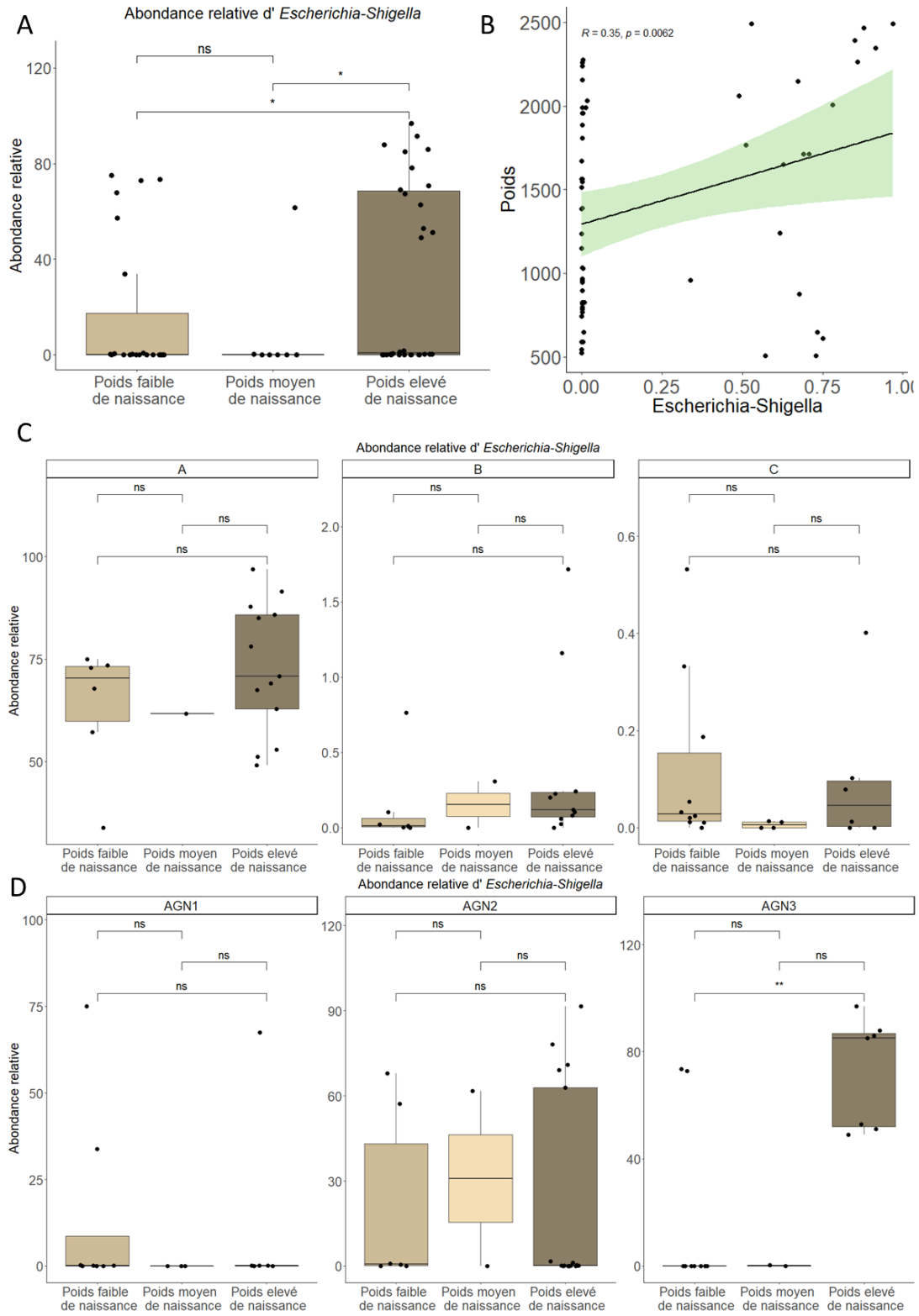


Figure 25 : Abondance relative d'Escherichia en fonction du poids de naissance

A/ Abondance relative de Escherichia/Shigella dans le microbiote des enfants à 1 mois en fonction du poids de naissance.
B/ Corrélation de Spearman entre le poids de naissance (variables aléatoires en fonction des groupes) et l'abondance relative d'Escherichia/Shigella à 1 mois.
C-D/ Abondance relative d'Escherichia/Shigella pour les poids de naissance par cluster (C) et âge gestationnel (D).

Colonisation accrue de *Clostridium* dans le microbiote intestinal à 1 mois des grands prématurés n'ayant pas reçu d'antibiothérapie secondaire

Les antibiotiques sont utilisés en traitement préventif et thérapeutique chez les enfants prématurés pour éviter les infections par des bactéries pathogènes ou pathogènes opportunistes lors des procédures invasives qu'ils doivent subir. Près de 80% des prématurés au sein des USINs reçoivent une antibiothérapie [163]. Il s'agit donc d'une variable importante à prendre en compte et nous avons voulu comprendre l'impact de l'antibiothérapie secondaire sur la composition du microbiote intestinal à 1 mois de vie.

Une plus forte abondance de *Clostridium* est observée dans le microbiote intestinal à l'âge d'un mois chez les enfants qui n'ont pas reçu d'antibiothérapie secondaire (p=0.0059) (**Figure 26A**). Pour exclure tout effet lié à l'appartenance à un cluster, nous avons examiné les résultats de manière spécifique pour chacun d'entre eux. Nous avons constaté de façon similaire une plus forte abondance relative de *Clostridium* dans le microbiote intestinal des enfants sans antibiotiques pour les Clusters A (p=0.026) et B (p=0.046), mais pas pour le Cluster C où très peu de bactéries du genre *Clostridium* semblent être présentes (**Figure 26B**).

Des données obtenues par analyse des OTUs ont montré une abondance relative plus importante de *Clostridioides difficile* dans le microbiote intestinal des enfants prématurés de la cohorte EPIPAGE2 ayant reçu des antibiotiques [164]. Lors des isolements bactériens sur un échantillon de la cohorte appartenant au Cluster A n'ayant pas reçu d'antibiotiques, nous avons identifié par séquençage du gène codant l'ARNr 16S deux espèces de *Clostridium* : *C. perfringens* et *C. butyricum*. Les résultats de métagénomique shotgun pour cet échantillon ont quant à eux bien indiqué la présence de ces deux espèces, mais également de *C. difficile*.

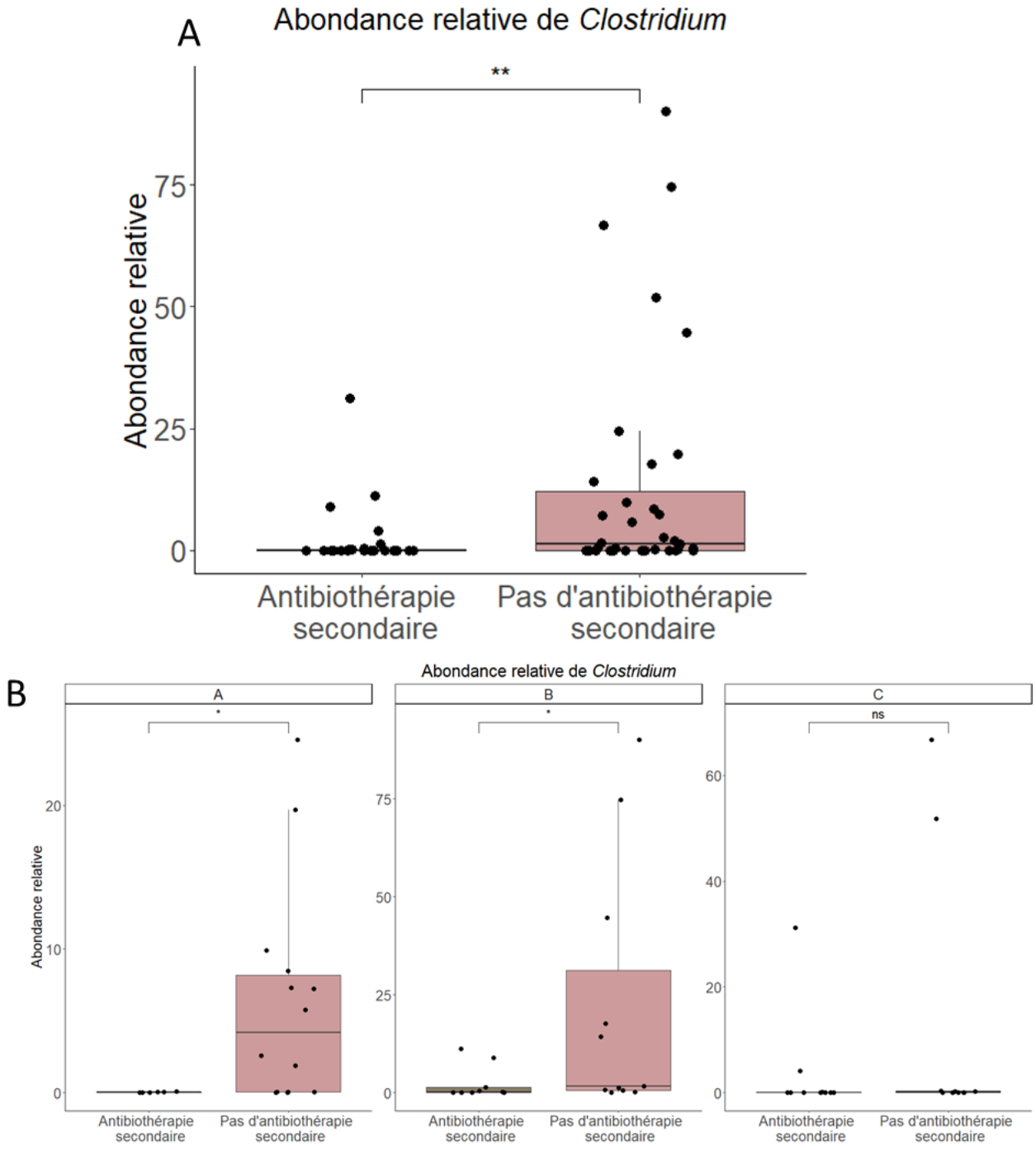


Figure 26 : Abondance de Clostridium en fonction de la prise d'antibiotiques des enfants grands prématurés

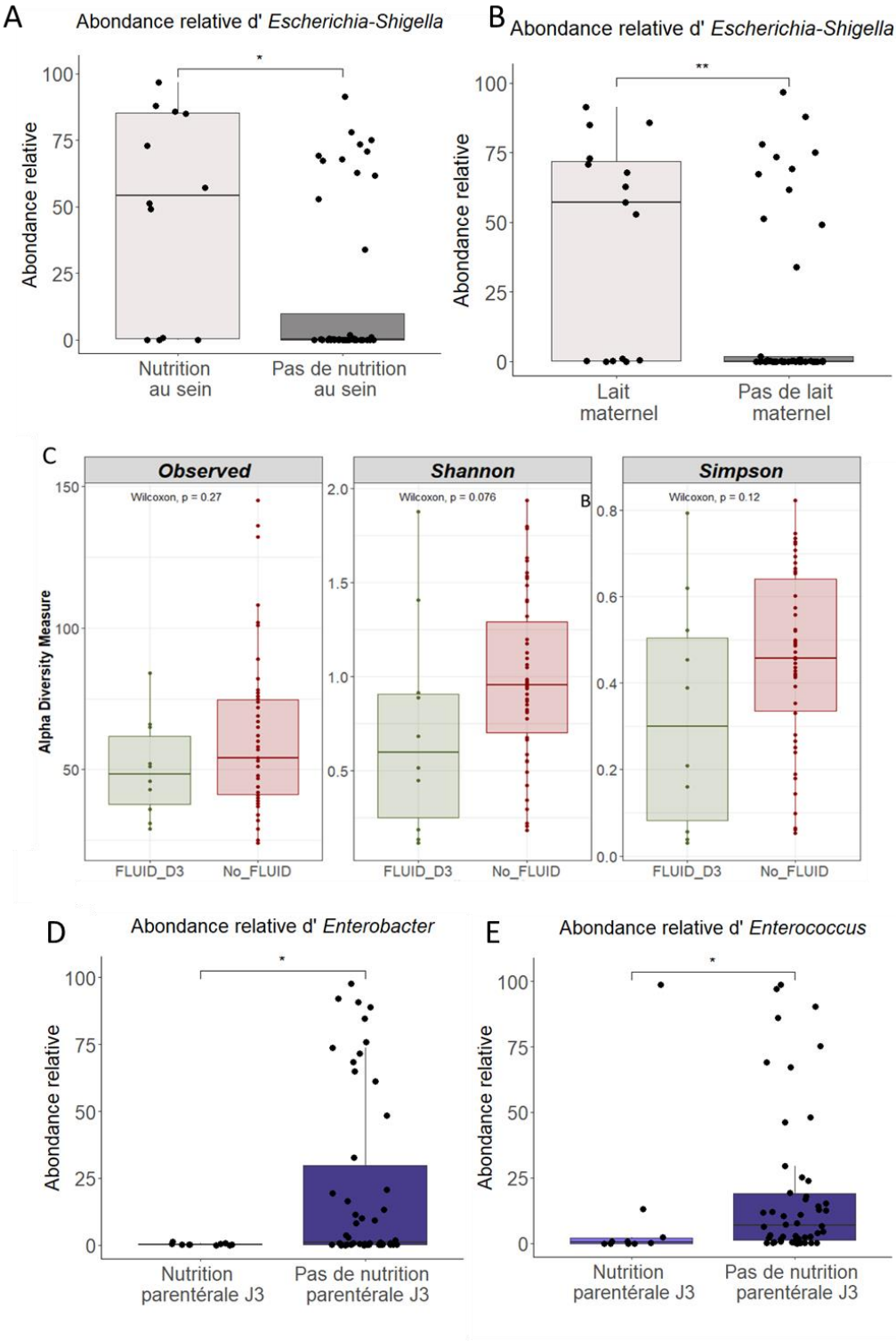
A/ Abondance relative de Clostridium dans le microbiote intestinal des grands prématurés à 1 mois de vie en fonction de la prise ou non d'antibiotique postnatale secondaire.
B/ Abondance relative de Clostridium dans le microbiote intestinal des enfants grands prématurés à 1 mois de vie en fonction de leur appartenance aux clusters.

Impact de la nutrition parentérale et entérale au 3ème jour de vie sur la composition et la diversité du microbiote à 1 mois des grands prématurés

Le lait maternel est reconnu comme le meilleur aliment pour les nouveau-nés, qu'ils soient prématurés ou non, en raison de ses nombreux avantages pour leur santé et leur développement [165,166]. Le lait maternel est riche en nutriments essentiels, en anticorps et en facteurs de croissance qui aident à renforcer le système immunitaire du prématuré et à favoriser sa croissance et son développement optimal [167]. Le lait maternel est également plus facilement digestible par les prématurés par rapport aux formules infantiles, ce qui peut réduire le risque de complications digestives. Il peut être administré par voie orale, à travers l'allaitement au sein ou par l'utilisation de biberons spéciaux pour les bébés prématurés. Dans certains cas, lorsque le bébé n'est pas encore capable de téter, le lait maternel peut être administré par sonde naso-gastrique. Cependant, dans certaines situations, la nutrition parentérale peut être nécessaire pour fournir une nutrition adéquate aux prématurés dont le système digestif est encore en développement. La nutrition parentérale, qui consiste à administrer une solution nutritive spécialement formulée par voie intraveineuse, est une pratique courante dans les unités de soins néonatals. Cette solution contient des glucides, des protéines, des lipides, des vitamines, des minéraux et d'autres nutriments essentiels pour soutenir la croissance et le développement du prématuré. Cependant, elle peut provoquer des effets indésirables comme une inflammation intestinale, une hépatite ou une septicémie [67,168].

Les enfants ayant eu accès au sein aux jours 7 ou 28 ainsi qu'à du lait maternel aux jours 3 ou 7 avaient une abondance plus élevée d'*Escherichia* dans leur microbiote à 1 mois (p=0.014 et p=0.0069 respectivement) (**Figure 27A-B**).

Le remplissage vasculaire (ou expansion volémique) est une méthode de nutrition par voie parentérale qui consiste à perfuser un soluté dans la circulation sanguine via une voie veineuse afin d'augmenter la volémie. Les données périnatales ont montré une tendance à une diversité à 1 mois plus faible chez les grands prématurés ayant été nourris avec remplissage au 3ème jour de vie (Indice de Shannon ; p=0.07) (**Figure 27C**). On observait une proportion plus faible d'*Enterobacter* et d'*Enterococcus* dans le microbiote à 1 mois des enfants ayant une nutrition parentérale à trois jours de vie (p=0.016 et p=0.014 respectivement) (**Figure 27D-E**).



<u>Figure 27</u> : Impact du mode de nutrition sur le microbiote intestinal des enfants grands prématurés

A-B/ Abondance relative d'Escherichia/Shigella en fonction de l'allaitement au sein au J7 ou J28 (A) et lait de mère au J3 ou J7 (B).
C/ Richesse et diversité en fonction du remplissage.
D-E/ Abondance relative d'Enterobacter (D) et d'Enterococcus (E) en fonction du remplissage.
FLUID_D3 : Remplissage ; No_FLUID : Pas de remplissage

3. Discussion

Nous n'avons observé aucune différence significative dans la diversité ou la composition du microbiote intestinal à 1 mois de vie pour les grands prématurés en fonction des variables suivantes : rupture prématurée des membranes, peau à peau, prise d'insuline, apport de protéines au jour 7, allaitement maternel à la sortie, première extubation, surfactant, antibiothérapie maternelle, indice de masse corporelle de la mère, contexte de prématurité, et catécholamines. La pratique du peau à peau était pourtant retrouvée associée à une plus forte appartenance à l'entérotype *Escherichia* [28] dans la totalité des échantillons de l'étude EPIFLORE (n=577).

Les genres bactériens les plus impactés par les variables périnatales sont *Escherichia* et *Staphylococcus*. Ces deux genres, qui décrivent deux des six entérotypes retrouvés chez les enfants grands prématurés à 1 mois, sont corrélés entre eux de manière négative. Des études sur la totalité des échantillons de l'étude EPIFLORE (n=577) ont montré un impact négatif de l'appartenance à l'entérotype *Staphylococcus* sur le développement cognitif à 2 ans, ainsi que sur la mortalité et la morbidité et un impact bénéfique de l'appartenance à l'entérotype *Escherichia/Shigella* [28]. Dans cette sous-cohorte, nous avons observé un impact similaire pour *Escherichia*, bénéfique pour le développement cognitif à 2 ans, mais aucune relation significative n'a été retrouvée pour *Staphylococcus*.

Le genre *Escherichia* est retrouvé de manière plus abondante et présente une corrélation positive avec les différents domaines cognitifs évalués lors de l'ASQ, à l'exception de celui de la communication. En 2022, Guzzardi *et al* ont démontré que la présence de *Bifidobacterium* dans le méconium était associée positivement au développement neurologique à l'âge de 3 ans [169]. Cependant, nous n'avons pas trouvé de liens entre *Bifidobacterium* et les scores de l'ASQ. Ceci pourrait être expliqué par les faibles proportions de ce genre détecté dans nos échantillons. *Escherichia* pourrait cependant être bénéfique à 1 mois pour un meilleur développement cognitif dans tous les domaines de l'ASQ, à l'exception de la communication à l'âge de 2 ans. De même, bien que les proportions de *Staphylococcus* ne soient pas corrélées avec le score total de l'ASQ, notre analyse suggère que ce genre bactérien pourrait être défavorable pour les domaines de la résolution de problème et de la motricité globale.

Par ailleurs, un âge de naissance plus tardif, un accouchement par voie basse ou un poids de naissance plus élevé sont des caractéristiques qui se rapprochent d'un enfant né à terme, et toutes ces variables sont corrélées positivement avec une plus forte abondance d'*Escherichia/Shigella* dans le microbiote intestinal des grands prématurés à 1 mois.

Heida *et al* ont mis en évidence qu'un enfant prématuré ayant un poids de naissance supérieur à 1095g présente un microbiote intestinal enrichi en *Escherichia* à 1 mois de vie en comparaison à des enfants prématurés avec un poids de naissance inférieur à 1095g [170]. Il est par ailleurs reconnu que l'âge gestationnel impacte le poids de naissance [171,172]. Un enfant né plus tardivement aura généralement un poids plus élevé. Ce résultat suggère que l'âge gestationnel et le poids de naissance agissent de manière similaire et synergique, ayant un impact conjoint sur le résultat observé, et qu'un enfant né plus tardivement avec un poids plus élevé aura une abondance plus importante d'*Escherichia* dans son microbiote intestinal à 1 mois. Cette observation semble cohérente, car un microbiote intestinal d'enfants nés à terme a besoin d'une colonisation initiale par *Escherichia* pour établir son futur microbiote. Nous avons également constaté une augmentation de l'abondance relative d'*Escherichia/Shigella* chez les enfants présentant un poids élevé parmi les différentes catégories d'âge gestationnel (AGN1, AGN2 et AGN3), avec une plus forte augmentation de cette abondance relative dans le microbiote intestinal des enfants présentant un poids élevé avec un âge gestationnel plus élevé (AGN3), par rapport à ceux nés aux stades de gestation plus précoces (AGN1 et AGN2).

La nutrition au lait maternel dès le plus jeune âge permet également une colonisation plus importante d'*Escherichia*. Le genre *Escherichia* est retrouvé en abondance dans le microbiote des enfants ayant eu accès au lait maternel en comparaison à ceux ayant accès au lait maternisé [173]. Le lait maternel comprend des HMO (Human Milk Oligosaccharides) qui servent de substrats aux bactéries du microbiote intestinal avec notamment le L-fucose qui est un des monomères de HMO présent abondamment dans le tractus digestif. Il permet la prolifération de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* et également *Escherichia* [173].

Un âge de naissance plus précoce et un accouchement par césarienne entraînent une augmentation de l'abondance de *Staphylococcus* à 1 mois de vie ainsi que des corrélations négatives entre ces variables et *Staphylococcus*. Une étude de 2010 a montré que plus un enfant est né tôt et plus le risque d'accouchement par césarienne est grand dans 18 pays, dont la

France [174] indiquant un lien évident entre ces deux variables. Dans nos résultats, le mode d'accouchement semble avoir une influence plus importante que l'âge gestationnel sur la composition du microbiote intestinal à 1 mois. Le microbiote intestinal des enfants avec un âge gestationnel plus faible est connu pour être plus colonisé par *Staphylococcus* [175]. Ces découvertes mettent en évidence l'importance du mode d'accouchement dans la composition du microbiote intestinal des grands prématurés et suggèrent que les proportions élevées de *Staphylococcus* chez certains enfants soient plutôt liées au mode d'accouchement.

Le mode d'accouchement par césarienne et un âge gestationnel précoce ont en commun la proximité du microbiote cutané des personnes environnantes. Il est connu qu'un enfant né par césarienne a un microbiote enrichi en *Staphylococcus* et notamment *S. epidermidis* [176], car son premier contact microbien n'est pas le microbiote vaginal de la mère, mais la peau de ses parents et du personnel soignant. L'espèce de *Staphylococcus* retrouvée dans nos souches isolées des fèces de grands prématurés de la cohorte se trouve être *S. epidermidis,* espèce la plus fréquemment isolée de la flore cutanée. Une hypothèse plausible de sa localisation dans le microbiote intestinal à 1 mois des grands prématurés est que les enfants nés plus précocement requièrent davantage de manipulations médicales en raison de problèmes de santé, ce qui les expose davantage au microbiote cutané, dont *S. epidermidis*. Cette espèce de *Staphylococcus* a longtemps été considérée comme commensale, car elle est présente de manière omniprésente sur la peau. Cependant, la mortalité due à la septicémie causée par cette bactérie varie de 1.9% à 9.4% dans la population néonatale. Son rôle a été sous-estimé par rapport à un autre pathogène, *S. aureus*, qui est mieux documenté [177]. *S. epidermidis* a la capacité de former des biofilms sur les dispositifs médicaux dans les 24 heures suivant l'invasion. La dispersion de ces biofilms par les dispositifs médicaux peut entraîner des inflammations ou des septicémies, ce qui pourrait expliquer la présence de *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal des nourrissons prématurés les plus jeunes plus exposés aux dispositifs médicaux (sonde d'alimentation…). De plus, les séquelles à court et à long terme chez les survivants de la septicémie à *S. epidermidis* comprennent une déficience neurodéveloppementale et une paralysie cérébrale [178]. Ces résultats soulignent l'importance de mieux comprendre le rôle de *S. epidermidis* dans le contexte du microbiote intestinal des enfants prématurés et de ses conséquences potentielles sur leur santé à long terme.

Il a été démontré que le gain de poids au sein des USINs est corrélé négativement avec *Staphylococcus* et *Klebsiella* [179]. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence aucune

corrélation significative entre ces genres et le poids de naissance même si les corrélations entre *Klebsiella* ou *Staphylococcus* étaient négatives. Néanmoins, on observe une corrélation négative entre *Escherichia* et la quantité de *Staphylococcus*, ce qui suggère que lorsque la présence d'*Escherichia* est plus élevée chez les enfants ayant un poids de naissance élevé, la proportion de *Staphylococcus* pourrait tendre à diminuer.

D'autres genres bactériens sont influencés par des variables périnatales. Une antibiothérapie secondaire induit une diminution de la présence des *Clostridium* dans le microbiote à 1 mois, notamment *Clostridium perfringens* et *Clostridium butyricum*. *Clostridium perfringens* est présent au sein des USINs et est connu pour contenir peu de gènes de résistance aux médicaments, ce qui en fait un candidat sensible aux antibiotiques [180] expliquant sa diminution dans le microbiote intestinal des enfants ayant eu une antibiothérapie secondaire. *Clostridium butyricum* est quant à lui bénéfique pour la santé et est testé comme probiotique dans un contexte de maladies intestinales. Cette espèce permettrait d'inhiber la prolifération de certaines bactéries (*Clostridioides difficile, Helicobacter pylori* et *Escherichia coli* résistante aux antibiotiques), ne possède pas de gènes produisant des toxines et peut inhiber la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques [181]. L'antibiothérapie secondaire diminuant l'abondance relative de *Clostridium* et notamment *Clostridium butyricum* pourrait permettre une colonisation par des bactéries pathogènes.

L'impact du mode de nutrition a également été étudié. Une nutrition parentérale entraîne une augmentation de la présence d'*Enterococcus* et d'*Enterobacter*, ainsi qu'une réduction de la diversité microbienne. Cette observation peut être attribuée à l'absence de nutrition par voie digestive, ce qui retarde la diversité et le développement du microbiote intestinal. Des études antérieures ont montré une augmentation de l'abondance relative d'*Enterococcus* et des Enterobacteriaceae dans le microbiote intestinal des enfants bénéficiant d'une nutrition entérale par rapport à ceux ayant reçu une nutrition parentérale [182]. Il a été constaté que *Enterococcus faecium* pourrait jouer un rôle dans l'amélioration de la croissance, l'absorption d'autres nutriments et la régulation de l'immunité [183,184].

4. Conclusion

La composition du microbiote intestinal à 1 mois est fortement influencée par les interventions reçues par l'enfant au cours des premières semaines de vie, mais surtout par les conditions de naissance. Étant donné que le microbiote intestinal joue un rôle crucial dans la santé de l'enfant à long terme, il est essentiel de prendre en compte toutes les variables pouvant modifier ce microbiote en début de vie.

La présence d'*Escherichia/Shigella* à 1 mois semble être bénéfique pour le développement de l'enfant, contrairement à la présence de *Staphylococcus*. L'appartenance à l'un ou l'autre de ces clusters est liée à des variables telles que l'âge gestationnel, le mode d'accouchement ou le poids de naissance, qui ne peuvent pas être modifiés. Cependant, il est important de considérer la nutrition entérale au lait maternel comme une variable significative pouvant influencer positivement le microbiote.

L'utilisation de probiotiques ou prébiotiques pourrait être des pistes intéressantes à explorer pour moduler le microbiote intestinal à 1 mois, et ce dès la naissance, ainsi qu'améliorer le développement de l'enfant, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leur efficacité et leur sécurité chez les prématurés.

CHAPITRE 2 :
Le transit intestinal précoce chez les nourrissons prématurés est associé à des signatures fonctionnelles du microbiote intestinal à l'âge de 1 mois.

1. Introduction

Nous avons déterminé précédemment que l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, le poids de naissance, l'antibiothérapie secondaire, la nutrition parentérale et la nutrition entérale au lait maternel sont des variables pouvant influencer le microbiote intestinal à 1 mois. Il semble donc intéressant d'étudier la relation entre les genres d'intérêts façonnant les entérotypes et d'autres facteurs périnataux plus qualitatifs de santé tels que la qualité du transit intestinal à 1 semaine de vie.

Le transit intestinal est une variable importante pour la maturation intestinale et joue un rôle clé dans la croissance, le développement et le bien-être général des enfants prématurés ainsi que dans la nutrition, car il permet l'absorption des nutriments essentiels présents dans leur alimentation [185]. On considère que le transit est régulier lorsqu'il y a l'émission d'au moins une fèces par jour. Un transit intestinal irrégulier est courant chez les nourrissons prématurés en raison du développement immature du système gastro-intestinal [186]. L'étude de modèles murins axéniques a mis en évidence que l'absence de bactéries était associée à un transit intestinal irrégulier par rapport aux modèles conventionnels indiquant un lien entre microbiote et transit intestinal [187]. De plus, une colonisation par *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* a permis de réguler le transit gastro-intestinal chez ces modèles axéniques [187].

Le microbiote intestinal pourrait affecter la motilité intestinale via les métabolites et molécules d'origine microbienne. Les acides gras à chaîne courte (AGCC), les lipopolysaccharides (LPS), les acides biliaires secondaires et le méthane peuvent affecter la motilité colique via les voies neurales et humorales [185]. Un transit intestinal irrégulier est associé à un profil méthanogène et à un catabolisme protéique bactérien accru c'est-à-dire une augmentation de *Methanobrevibacter* et une réduction de *Faecalibacterium prausnitzii* ainsi qu'une production accrue de produits finaux du catabolisme des protéines microbiennes (p-crésol, indole) chez l'adulte. Un transit irrégulier s'accompagne d'un changement du métabolisme énergétique

microbien vers la fermentation des protéines. Cela peut entraîner une augmentation des métabolites potentiellement néfastes pour la santé métabolique (acides gras à chaîne ramifiée (BCFA), l'ammoniac et les dérivés aromatiques des acides aminés) [185].

Inversement, le transit peut influencer la composition du microbiote intestinal et sa fonctionnalité. Les premières études humaines sur le transit colique accéléré ou retardé ont montré que l'abondance microbienne augmentait avec l'accélération ou diminuait avec le transit retardé [185].

Cet article en préparation s'inscrit dans l'objectif d'avoir une meilleure connaissance de la mise en place du dialogue microbiote-hôte impliqué dans la maturation intestinale chez l'enfant et vise à déterminer le lien entre la qualité du transit intestinal et les profils de microbiote chez le nouveau-né prématuré.

Ces résultats ont été présentés sous forme de poster lors du congrès de la Société Française de Microbiologie en Octobre 2022.

2. Article

Early intestinal transit in preterm infants is associated with microbiome functional signatures at 1 month of age

Constance Patin,[1] Céline Monot[1], Laetitia Martin-Marchand[2], Pierre-Yves Ancel[2,3], Marie-José Butel[3,4]Jean-Christophe Rozé[5], Patricia Lepage[1]*

Affiliations :

[1] Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute ; Domaine de Vilvert, 78350, Jouy-en-Josas, France.

[2] Université de Paris Cité, Center for Epidemiology and Statistics/CRESS U1153/EPOPé Team, Paris, France & Clinical Investigation Center P1419, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France ;

[3] FHU PREMA « Fighting prematurity », 75006, Paris, France;

[4] UMR-S INSERM U1139, 3PHM, Faculté de Pharmacie, Université de Paris Cité, 75006, Paris, France ;

[5] Neonatal Department, INSERM-CHU Clinical Investigation Center 1413, et UMR-INRA1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes University Hospital, Nantes, France

***Corresponding author**

Patricia Lepage
PhylHom Lab, Micalis Institute,
INRAE
Domaine de Vilvert
78350 Jouy-en-Josas
France
Phone 33 1 34 65 20 09
Email: patricia.lepage@inrae.fr

Keywords: Transit, preterm infants, gut microbiome, sequencing, metabolomic

Abstract

Slower intestinal transit has been observed in preterm infants which may be associated with delay in enteral feeding in these neonates and health consequences. We previously reported the existence of six specific enterotypes in the gut microbiome of very preterms and established a robust link between belonging to these enterotypes and the infant's clinical and neurodevelopmental outcomes. Microbial functions associated with these outcomes have not been studied so far. The objective of the present work is to evaluate a potential association between intestinal transit and gut microbiome in very-preterm infants.

Very preterm infants (median gestational age = 28 weeks; n=60) were selected from the EPIPAGE2 French national cohort with more than 40 clinical variables referenced including regular (≥1 stool each day after the first stool in the first week of life; n=31) or irregular (n=29) intestinal transit in these infants. Fecal samples at 1 month of age were analyzed for microbiome composition, diversity (via 16S rRNA gene sequencing) and metabolic functions (global metabolomic via LC/MS) and compared between regular and irregular transit groups.

Overall microbial composition and diversity did not differ between intestinal transit groups yet several genera were significantly more abundant in infants with regular transit than in irregular transit. These genera related to *Escherichia, Clostridium* and *Faecalibacterium*. Overall 1,040 metabolites were detected and 856 were annotated. Fifty metabolites significantly differed between infants with regular and irregular intestinal transit. Two microbial metabolites, namely 3-indoxyl sulfate and trimethylamine-N-oxide, showed significant differences between the two groups. These metabolites allow for a clear distinction between the two groups through a Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLSDA). At 1 month of age, the microbiome of very preterm infants may still present hallmarks of early intestinal transit defect.

Introduction

Preterm birth rate (as defined by a birth before 37 weeks of pregnancy) ranges between 5 and 20% depending on the country, being higher in low-income countries. In France, approximately 55,000 children are born preterm per year and in 2019, 7% of births were premature [1,2]. Many complications are associated with prematurity in both the short or and long term.

Organs are present but immature due to developmental interruption in utero. Lungs often lack surfactant, which helps the pulmonary alveoli stay open [3]. The digestive tract is underdeveloped both in size and functions [4] with reduced digestive and absorption capacity, prolonged gastric emptying time, and limited intestinal motility compared to full-term infants [5]. A large majority of preterm newborns are affected by gastroesophageal reflux, constipation due to delayed gastric emptying, prolonged intestinal transit and delayed passage of meconium [6].

The intestinal transit of infants, especially preterm, is extremely important as it plays a key role in their growth, development, and overall well-being. Regular and efficient intestinal transit helps with the absorption of essential nutrients development [8], and plays a role in preventing intestinal and respiratory infections in infants, which is particularly crucial for preterm infants whose immune system is still developing. Regular bowel movements help to avoid discomfort and abdominal pain. Yet, irregular intestinal transit is a common condition in preterm infants due to immature gastrointestinal. [9].

Another key feature of the digestive tract is its microbiome, a complex ecosystem composed of 10^{13} microorganisms playing major roles in human health. Intestinal transit can have an impact on the gut microbiota composition [10,11], contributing to strengthening the infant's immune system and protecting them against infections as well as reducing the risk of developing necrotizing enterocolitis (NEC). The gut microbiota is established during the first 3 years of life and continues to evolve throughout the entire life. Environmental factors have an important impact on the gut microbiome during the first 1,000 days, with potential repercussions on adult health, which has been referred to as the DOHaD concept: Developmental Origin of Health and Disease [12].

Microorganisms colonize the gut at birth and the mode of delivery in children born at full term will induce a different primary colonization [13]. In full-term infants, the predominant bacteria found in the microbiota of c-section-born children will mainly be skin microorganisms such as

Staphylococcus. Vaginally born children are predominantly colonized by fecal bacteria such as *Enterobacteriaceae* and *Bacteroides*. During the first days of life, an infant's microbiota establishes itself, depending notably on their diet, the capacity of their immune system, and the competition between bacteria. Early colonizing bacteria such as *Escherichia coli* consume the oxygen present in the digestive tract to create the hypoxic environment of a healthy intestine [14], promoting the growth of strictly anaerobic microorganisms. In preterm infants, the intestinal microbiota is different. It is less abundant and diverse than full-term infants, and colonizing bacteria are often detected on the surfaces of NICUs (Neonatal Intensive Care Unit) [15]. The observed higher proportions of facultative anaerobic bacteria in the first days of life in preterm neonates could be caused by the respiratory assistance given to these infants, which hinders the development of strictly anaerobic bacteria [16]. Several articles describe the microbiota of preterm infants at one month of age as enriched in *Enterobacter*, *Escherichia*, *Enterococcus*, and *Klebsiella* [17,18], but also in *Clostridium* and *Staphylococcus* [17].

Early colonization of the gut by a complex microbiota is a crucial process that can have a significant impact on the long-term development of the immune system, metabolic health, and intestinal functions. The different microbial colonization between infants born full-term and preterm infants can have important implications for their long-term health. Studies have shown that imbalances in the intestinal microbiota, especially during the first 3 years of life, may be associated with long-term health issues such as chronic inflammatory diseases, allergies, metabolic disorders, and even neurological disorders [14,19]. For premature children, whose microbiota is often less diversified and less abundant, the long-term consequences can be more frequent and pronounced [20].

We previously showed that very-preterm infants (born before 31 weeks of gestation) can be stratified into 6 enterotypes or clusters based on the gut microbiome composition at one month of age [17]. Five enterotypes are driven by one dominant bacterial genus (*Clostridium* (Enterotype 1), *Enterobacter/Klebsiella* (Enterotype 2), *Escherichia* (Enterotype 3), *Enterococcus* (Enterotype 4) and *Staphylococcus* (Enterotype 5)). One enterotype is characterized by a very low bacterial load (Enterotype 6). Belonging to these enterotypes at one month of age is associated with a different cognitive development in these children at the age of 2 years, as evaluated by an Ages & Stages Questionnaire score (ASQ). Enterotypes 4, 5 and 6 grouped preterm infants with the worst outcome (Cluster C). Enterotype 3 grouped infants with the best

outcome (Cluster A). Outcome in infants from enterotypes 1 and 2 was heterogeneous (Cluster B).

In the present work, we aimed to understand the interactions between the microbiota and the quality of intestinal transit and more specifically to i) evaluate the impact of intestinal transit quality during the first week of life on the gut microbiome at 1 month of age in preterm infants, and to ii) decipher whether a potential signature of intestinal transit in the first week of life might be detectable with a non-invasive method, on the gut microbiome at 1 month of life.

Material and Methods

Population study and samples collection

We selected 60 preterm infants from the French national cohort EPIPAGE2 [21]. Infants were born between 25 and 31 weeks of gestation and fecal samples were collected at approximately 21 days – 1 month of age and stored at -80°C until further analysis within the EPIFLORE project. Intestinal transit was evaluated by clinicians during the first week of life as regular (≥1 stool each day after the first stool in the first week of life) (n=31 children) and irregular otherwise (n= 29 children). None of the selected children developed ECUN or severe morbidities.

Microbiome analyses

Total fecal DNA was extracted from the 60 samples as described previously [22]. Concentration and integrity of the nucleic acids were determined visually after electrophoresis on a 1% agarose gel. The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced, and sequences were analyzed as previously published [17].

Fecal metabolome analyses

Global metabolomic analyses were performed on aliquots of 50mg of frozen fecal samples with LC-MS method (Metabolon Durham, USA). Acquisition, quality control and metabolites identification and quantification were performed. This normalization modified data for mean is zero and the standard deviation is equal to one. A total of 1,040 metabolites were detected and 856 were annotated. Uncharacterized metabolites were excluded from the analyses.

Bioinformatic and biostatistical analyses

For microbiome analysis, preprocess, clustering, chimeras removal, and operational taxonomic unit (OTU) affiliation were performed using FROGS "Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution" [23]. Preprocess kept 678 511 sequences. Clustering using Swarm led to 172 446 OTUs. The chimera removal uses VSEARCH and kept 162 315 clusters. The taxonomic affiliation was performed with the SILVA database and RDP database and 100% of OTUs were affiliated with 3,91% OTUs just affiliated with a phylum. After filtering and affiliation, 1,534 OTUs were found.

Analysis and visualization of microbiome communities was conducted in RStudio with Phyloseq package to import sample data and calculate alpha- and beta-diversity metrics.

Statistical and graphical analyses were performed with RStudio. Correlations and visualizations were assessed with the Hmisc, corrr packages and ComplexHeatmap [24] packages. Correlations >0.3 or <-0.3 were selected if pval<0.05. Boxplots were performed with packages ggstatsplot and ggplot2 on Rstudio with parameters of non-parametric tests (Kruskall-Wallis). Heatmap was performed with the package ComplexHeatmap [24].

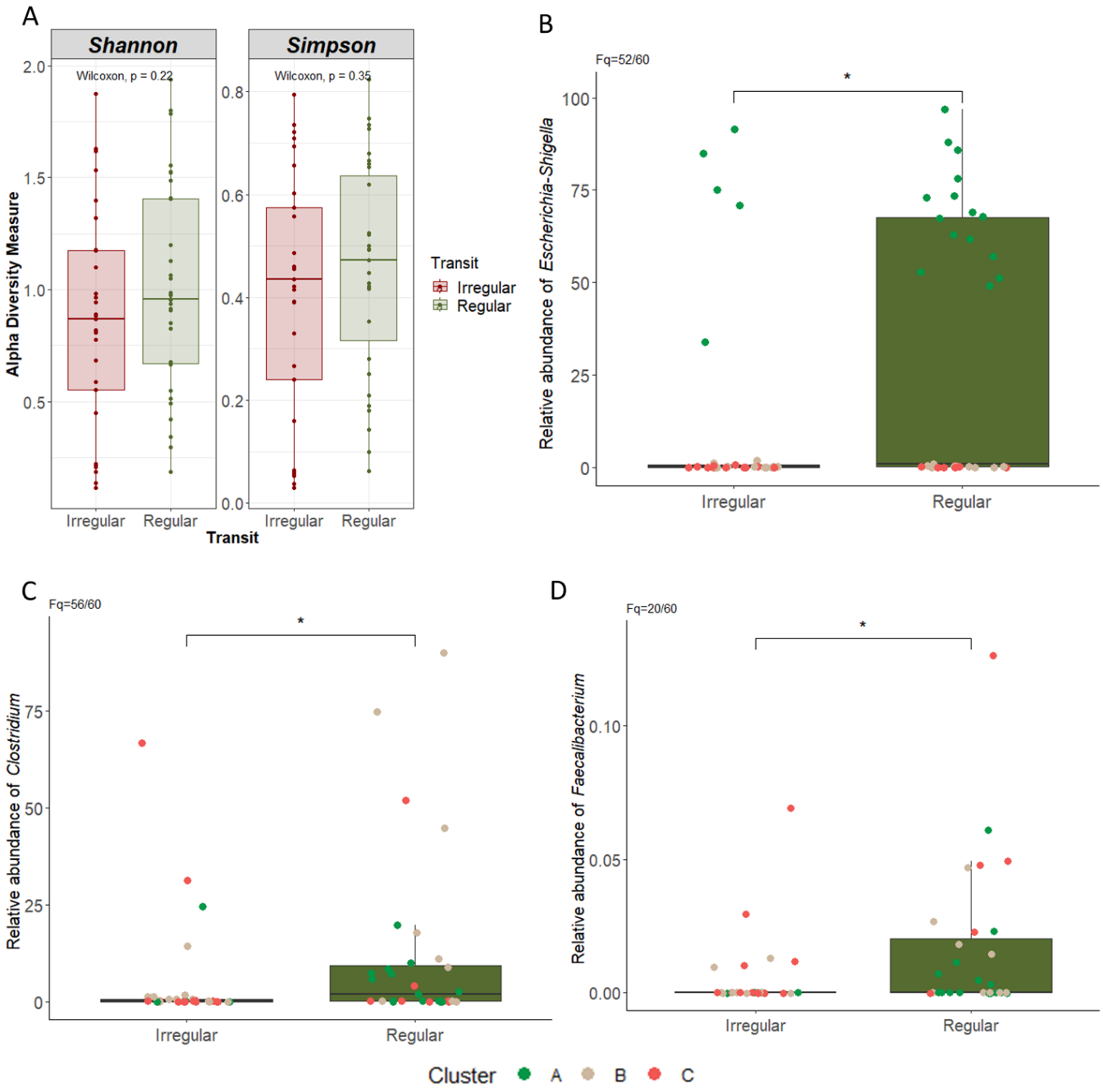
For metabolomic analyses, the Metaboanalyst [25] and MetOrigin [26] software were used for PCA, PLSDA analysis and metabolite provenance respectively.

Results

Escherichia, *Clostridium* and *Faecalibacterium* are more abundant in the gut of very-preterm infants with early regular transit

There were no differences in microbial diversity assessed by both the Shannon and Simpson indices between the two intestinal transit groups **(Figure 1A).**

Moreover, out of 93 bacterial genera found in the composition of the gut microbiome at 1 month, three genera were observed in higher relative abundance in the gut microbiome at 1 month of very preterm infants with regular transit at 1 week: *Escherichia/Shigella*, *Clostridium* and *Faecalibacterium* **(Figure 1B-D)**. The prevalence of each genus in the cohort is respectively 52/60, 56/60 and 20/60.



<u>Figure 1:</u> Fecal microbiome composition in 1-month-old infants depending on early intestinal transit.

A/ Shannon and Simpson diversity indices in infants with regular or irregular transit during the 1st week of life.
B/ Relative abundance of Escherichia/Shigella genus in infants with regular (in green) or irregular (in red) transit during the 1st week of life.
C/ Relative abundance of Clostridium genus in infants with regular (in green) or irregular (in red) transit during the 1st week of life.
D/ Relative abundance of Faecalibacterium genus in infants with regular (in green) or irregular (in red) transit during the 1st week of life.

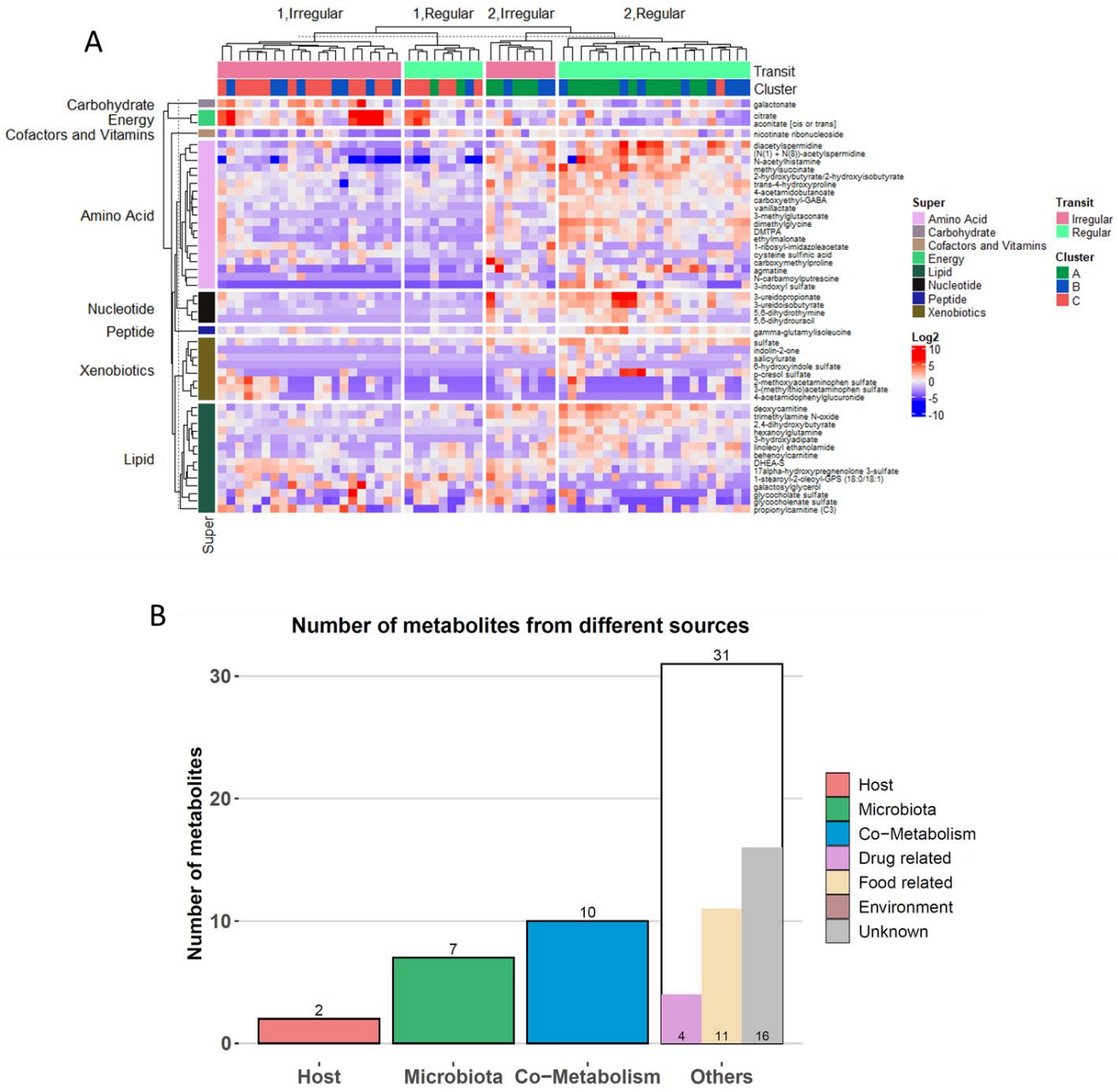
Early intestinal transit in very-preterm infants is associated with specific metabolic signatures at 1 month of age.

Out on 1,040 detected fecal metabolites, 50 metabolites were differentially present depending on early intestinal transit (Wilcoxon, $p < 0.05$). These fecal metabolites were distributed among diverse metabolic super-pathways: amino acids (n=19), carbohydrates (n=1), cofactors and vitamins (n=1), energy (n=2), lipids (n=14), nucleotides (n=4), peptides (n=1) and xenobiotics (n=8).

Non-a priori clustering was performed using the k-means method on these 50 metabolites and revealed the existence of two groups referred to as group 1 (n= 30 infants) and group 2 (n= 30 infants). In addition, a separation according to transit quality is indicated graphically **(Figure 2A).**

Group 1 included most samples from very-preterm infants with irregular transit from microbial Clusters B and C, but also a small number of samples from very-preterm infants with regular transit, mainly from Clusters B and C, and two samples from Cluster A. Group 2 included most samples from very-preterm infants with regular transit from Clusters A and B and one sample from Cluster C, as well as a small number of samples from very preterm infants with irregular transit from Clusters A and B **(Figure 2A)**. This clustering indicates a relationship in the abundance of these metabolites not only within the transit group but also based on the microbiota composition. Infants from Group 1 exhibited higher concentrations of fecal metabolites related to energy and carbohydrates pathways, while those from Group 2 had higher concentrations of fecal metabolites related to amino acids, nucleotides, xenobiotics, cofactors, and enzyme pathways **(Figure 2A)**.

Ten of these 50 metabolites originated from the co-metabolism between microbiome and host, seven originated essentially from the microbiota and two from the host. The other metabolites ad an unknown origin, from food or drugs **(Figure 2B)**.



<u>Figure 2</u>: Fecal metabolites associated with early intestinal transit

A/ Heatmap of the abundance (in log2) of the 50 fecal metabolites differentially represented in the 2 transit groups (regular in green vs irregular in red). Metabolites are classified by super pathway. Samples are statistically separated by k-means clusterisation in 2 groups (1 and 2) and colored by transit groups and microbial enterotype-based clusters.

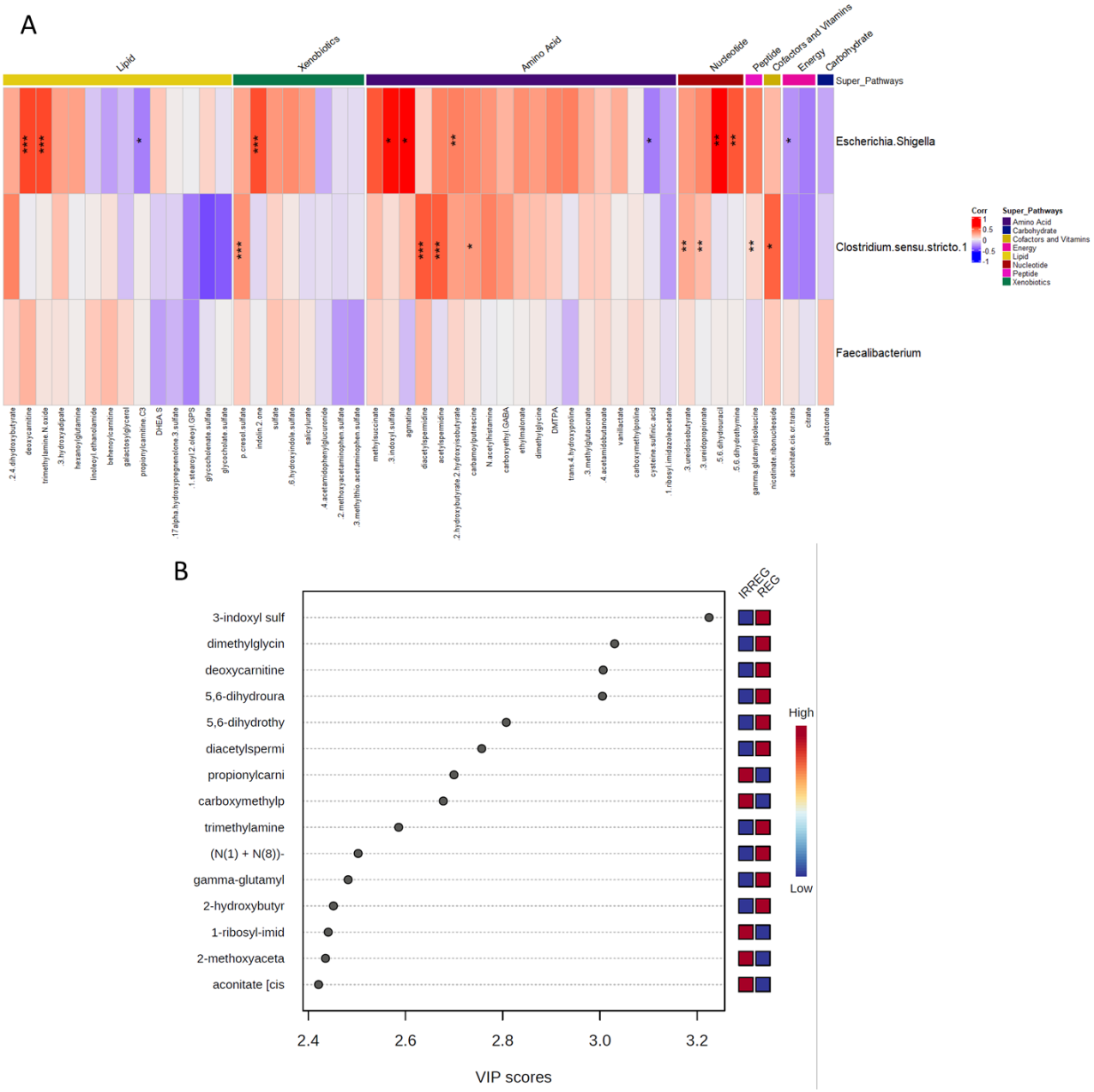
B/ Origin of the 50 fecal metabolites (analysis performed by metorigin).

Microbial metabolites 3-indoxyl-sulfate and trimethylamine-N-oxide are correlated with *Escherichia* proportions.

We analyzed the correlations of the three differentially found bacterial genera within the intestinal microbiota of children with regular or irregular transit with these metabolites. Relative abundance of *Escherichia* at 1 month correlated positively with 8 metabolites found elevated in the group of infants with regular transit in the first week of life ($r > 0.30$, $p < 0.05$) and negatively with 3 metabolites found elevated in the feces of infants with irregular transit ($r < -0.30$, $p < 0.05$) **(Figure 3A)**. *Clostridium* positively correlated with 6 metabolites associated with early regular transit. *Faecalibacterium* did not correlate with any metabolites that were differentially present in the two transit groups.

Orthogonal partial least squares discriminant analysis (O-PLSDA) highlighted fifteen metabolites discriminating between the two transit groups. All of them are included in the 50 differentially represented metabolites **(Figure 3B)**. Moreover, out of the 17 metabolites correlating with *Escherichia* or *Clostridium*, 11 discriminated between the two transit groups using O-PLSDA, with a VIP score ranging from 2.4 to 3.2. Eight of them correlated with *Escherichia* : 3-Indoxyl-sulfate ($r = 0.62$, $p = 1.01E10^{-2}$), trimethylamine-N-oxide ($r = 0.53$, $p = 1.96E10^{-4}$), 5-6-dihydrouracil ($r = 0.6$,$p = 5.73E10^{-3}$), deoxycarnitine ($r = 0.54$,$p = 5.26E10^{-5}$), 5-6-dihydrothymine ($r = 0.5$,$p = 1.61E10^{-3}$), 2-hydroxybutyrate/2-hydroxyisobutyrate ($r = 0.38$,$p = 4.14E10^{-3}$), aconitate (cis or trans) ($r = -0.27$,$p = 4.32E10^{-2}$), propionylcarnitine (C3) ($r = -0.32$, $p = 3.67E10^{-2}$). Three of them correlated with *Clostridium*: diacetylspermidine ($r = 0.49$, $p = 6.94E10^{-8}$) and N (1) + N (8) acetylspermidine ($r = 0.48$, $p = 4.81E10^{-6}$)

3-Indoxyl-sulfate and trimethylamine-N-oxide were the only metabolites with a confirmed microbial origin. Deoxycarnitine may originate from co-metabolism and gamma-glutamylisoleucine from food. The origin of the others cannot be determined.



<u>Figure 3</u>: Correlations between main gut microbiome genera associated with regular intestinal transit and metabolites differentially represented in transit groups.

A/ Heatmap of the Spearman correlations between Escherichia, Clostridium or Faecalibacterium and the 50 metabolites, sorted by super-pathways.

B/ Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of metabolites that discriminate the two transit groups. VIP score: variable importance plot.

Discussion

We characterized the fecal microbiome of very preterm infants at 1-month-old based on the quality of their transit during their first week of life. The quality of the transit in very preterm infants at 1 week is an important criterion considered by clinicians to assess the maturity of the intestine and the digestive health of children and has an impact on the intestinal microbiome at 1 month.

High proportions of *Escherichia*, *Clostridium*, and *Faecalibacterium* were found in the microbiome of 1-month-old infant's microbial signatures of an early regular transit in very-preterm infants. These genera are also considered to be signatures of a more mature microbiome, especially *Escherichia*. *Escherichia* is predominantly represented in the group with regular transit. This result support the fact that transit quality at 1 week could influence the composition of the microbiota at 1 month.

Few studies have investigated the link between intestinal transit and intestinal microbiota in preterm infants. However, in adults, it is known that intestinal microbiota may regulate intestinal motility through the myenteric plexus. In mice, spore-forming bacteria, such as *Clostridium*, promote the synthesis of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the colonic chromaffin cells and affect intramuscular neurons and gastrointestinal motility by upregulating 5-HT receptors on submucosal neurons and increasing 5-HT levels in the blood. 5-HT stimulates the local intestinal nerve reflex and acts on the vagal motor afferent nerve to regulate contractile activity [26]. In humans, the intestinal microbiota can stimulate intestinal motility through the production of metabolites, thus influencing transit time [27]. The present LC-MS metabolomic analysis did not allow the detection of 5-HT in the feces of infants but it could possibly explain the abundance of *Clostridium* in infants with regular transit.

Escherichia and *Clostridium* were correlated with fecal metabolites, but only *Escherichia* was correlated with two metabolites that are exclusively microbial: 3-Indoxyl-sulfate and trimethylamine-N-oxide.

3-Indoxyl-sulfate is a sub-product of indole metabolism produced by commensal intestinal bacteria. Tryptophan is metabolized to indole via the tryptophanase enzyme produced mainly by some microbiome bacteria, including *Escherichia* [28]. Indole is metabolized to 3-Indoxyl-sulfate which is an AhR ligand. They have a role in protecting against intestinal inflammation. 3-Indoxyl-sulfate is a marker of indole production [29]. Indole improves interleukin-22 (IL22)

production. Indole and its derivatives also promote intestinal immune homeostasis by activating AhR to protect the intestinal barrier [28]. Activation of the AhR pathway in intestinal epithelial cells is necessary to protect stem cells and maintain the integrity of the intestinal barrier [28]. In mice, loss of AhR in enteric nervous system (ENS) neurons present in the gut induced irregular transit [30]. The gut microbiota and its metabolites affect intestinal motility by regulating the AhR receptor: a recent study has shown that the AhR signal in the intestinal nerve circuit connects the gut microbiota and intestinal nerve function, playing a significant role in regulating intestinal motor function [26]. This supports the correlations we detected between 3-indoxyl-sulfate and Escherichia associated with regular intestinal transit.

Trimethylamine-N-oxide (TMAO) is metabolized by the enzymes from several microbiome genera from choline, betaine or carnitine [31]. Carnitine is a major component of breast milk. From choline, Cut C/D enzymes are used to metabolize TMAO, while from carnitine, the cntA/B enzyme is used. Recently, the YeaW/X pair has been described. These enzymes are all present in *Escherichia* and *Clostridium* [32]. TMAO is metabolized in the liver with FMO3 and excreted in the urine. However, 4% of TMAO production is excreted in the feces, thanks to the FMO1 gene, present in small quantities in epithelial cells [33].

3-Indoxyl-sulfate and trimethylamine-N-oxide are usually detected in urine, but the feces of very preterm infants are recollected in diapers, which might also contain urine.

The impact of *Clostridium* and AhR ligand producers such as *Escherichia* on intestinal motility has been previously highlighted [26]. However, we more specifically focus on the longer-term impact of intestinal transit during the first week of life on the intestinal microbiota at one month of age. Our results suggest that regular transit, i.e regular intestinal motility, could lead to a more abundant presence of commensal or even beneficial strains of *Clostridium* and *Escherichia*. It would be interesting to study the microbiota of infants with regular transit at one week of age to analyze whether an higher abundance of *Escherichia*, *Clostridium*, and *Faecalibacterium* could already be detected in the microbiome of preterm neonates at one week of age.

Conclusion

While additional experiments are needed to explain the role and impact of TMAO and 3-indoxyl sulfate on the maturation of the digestive system in very preterm infants, our data indicate that intestinal transit quality during the first week of life induces a different bacterial and functional composition of the gut microbiome at 1 month of age.

We previously demonstrated that preterm infants presenting a microbiome enriched in *Escherichia* have a better clinical outcome at two years [16]. As soon as transit irregularities are detected, this microbial signature could offer the possibility to regulate the microbiota, aiming to achieve a functional microbiota at 1 month, meeting the optimal criteria for positive outcomes at two years.

References

1 Bagein G, Costemalle V, Deroyon T, et al. L'état de santé de la population en France.

2 Preterm birth. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth

3 Respiratory Distress Syndrome (RDS) in Premature Babies - Health Encyclopedia - University of Rochester Medical Center. https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P02371

4 Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: Implications for nutrition support. Nutr Clin Pract 2007;22:159–73. doi:10.1177/0115426507022002159

5 Indrio F, Neu J, Pettoello-Mantovani M, et al. Development of the Gastrointestinal Tract in Newborns as a Challenge for an Appropriate Nutrition: A Narrative Review. Nutrients 2022;14. doi:10.3390/NU14071405

6 Lucchini R, Bizzarri B, Giampietro S, et al. Feeding intolerance in preterm infants. How to understand the warning signs. J Matern Fetal Neonatal Med 2011;24 Suppl 1:72–4. doi:10.3109/14767058.2011.607663

7 So KW, Ng PC. Erythromycin and gastrointestinal dysmotility in preterm infants. East J Med 2010;15:146–50.

8 Müller M, Canfora EE, Blaak EE. Gastrointestinal Transit Time, Glucose Homeostasis and Metabolic Health: Modulation by Dietary Fibers. Nutrients 2018;10. doi:10.3390/NU10030275

9 Di Mauro A, Neu J, Riezzo G, et al. Gastrointestinal function development and microbiota. Ital J Pediatr 2013;39:1–7. doi:10.1186/1824-7288-39-15

10 Tian H, Chen Q, Yang B, et al. Analysis of Gut Microbiome and Metabolite Characteristics in Patients with Slow Transit Constipation. Dig Dis Sci 2021;66:3026–35. doi:10.1007/S10620-020-06500-2

11 Charles MA, Delpierre C, Breánt B. Le concept des origines développementales de la santé - Évolution sur trois décennies. médecine/sciences 2016;32:15–20. doi:10.1051/MEDSCI/20163201004

12 Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. Nat Commun 2019 101 2019;10:1–12. doi:10.1038/s41467-019-13014-7

13 Laforest-Lapointe I, Arrieta MC. Patterns of Early-Life Gut Microbial Colonization during Human Immune Development: An Ecological Perspective. Front Immunol 2017;8:1. doi:10.3389/FIMMU.2017.00788

14 Toubon G, Butel MJ, Rozé JC, et al. Very Preterm Children Gut Microbiota Comparison at the Neonatal Period of 1 Month and 3.5 Years of Life. Front Microbiol 2022;13:919317. doi:10.3389/FMICB.2022.919317/BIBTEX

15 Henderickx JGE, Zwittink RD, Renes IB, et al. Maturation of the preterm gastrointestinal tract can be defined by host and microbial markers for digestion and barrier defense. Sci Rep 2021;11. doi:10.1038/S41598-021-92222-Y

16 Rozé JC, Ancel PY, Marchand-Martin L, et al. Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices and Preterm Newborn Gut Microbiota and 2-Year Neurodevelopmental Outcomes. JAMA Netw Open 2020;3:1–14. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.18119

17 Aguilar-Lopez M, Dinsmoor AM, Ho TTB, et al. A systematic review of the factors influencing microbial colonization of the preterm infant gut. Gut Microbes 2021;13:1–33. doi:10.1080/19490976.2021.1884514

18 Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: Implications for nutrition support. Nutr Clin Pract 2007;22:159–73. doi:10.1177/0115426507022002159

19 Short and Long-Term Effects of Preterm Birth | UK Healthcare. https://ukhealthcare.uky.edu/wellness-community/health-information/short-long-term-effects-preterm-birth
20 L'étude Epipage 2. https://epipage2.inserm.fr/index.php/fr/l-etude/199-qu-est-ce-qu-epipage-2
21 Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, et al. Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Appl Environ Microbiol 1997;63:2802–13. doi:10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997
22 Escudié F, Auer L, Bernard M, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 2018;34:1287–94. doi:10.1093/bioinformatics/btx791
23 Gu Z. Complex heatmap visualization. iMeta 2022;1:1–15. doi:10.1002/imt2.43
24 Chong J, Soufan O, Li C, et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nucleic Acids Res 2018;46:W486–94. doi:10.1093/nar/gky310
25 Yu G, Xu C, Zhang D, et al. MetOrigin: Discriminating the origins of microbial metabolites for integrative analysis of the gut microbiome and metabolome. iMeta 2022;1:1–13. doi:10.1002/imt2.10
26 Ma TR, Xue XL, Tian H, et al. Effect of the gut microbiota and their metabolites on postoperative intestinal motility and its underlying mechanisms. J Transl Med 2023 211 2023;21:1–11. doi:10.1186/S12967-023-04215-2
27 Nicola Procházková, Gwen Falony, Lars Ove Dragsted, Tine Rask Licht, Jeroen Raes, Henrik M Roager 5Nicola Procházková, Gwen Falony, Lars Ove Dragsted, Tine Rask Licht, Jeroen Raes HMR. Advancing human gut microbiota research by considering gut transit time. 2023.
28 Li X, Zhang B, Hu Y, et al. New Insights Into Gut-Bacteria-Derived Indole and Its Derivatives in Intestinal and Liver Diseases. Front Pharmacol 2021;12. doi:10.3389/FPHAR.2021.769501
29 Philippe C, Szabo de Edelenyi F, Naudon L, et al. Relation between Mood and the Host-Microbiome Co-Metabolite 3-Indoxylsulfate: Results from the Observational Prospective NutriNet-Santé Study. Microorganisms 2021;9. doi:10.3390/MICROORGANISMS9040716
30 Stockinger B, Shah K, Wincent E. AHR in the intestinal microenvironment: safeguarding barrier function. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2021;18:559–70. doi:10.1038/s41575-021-00430-8
31 Borum PR, Chapman JJ, Macey MJ, et al. Human Milk Carnitine. Hum Lact 2 1986;:335–7. doi:10.1007/978-1-4615-7207-7_29
32 Rath S, Heidrich B, Pieper DH, et al. Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota. Microbiome 2017;5:1–14. doi:10.1186/S40168-017-0271-9
33 Shanmugham M, Bellanger S, Leo CH. Gut-Derived Metabolite, Trimethylamine-N-oxide (TMAO) in Cardio-Metabolic Diseases: Detection, Mechanism, and Potential Therapeutics. Pharm 2023, Vol 16, Page 504 2023;16:504. doi:10.3390/PH16040504

3. Discussion / conclusion

Le microbiote intestinal des enfants grands prématurés présentant un transit régulier était caractérisé par la présence de 2 métabolites microbiens et 3 genres bactériens : le 3-indoxyl-sulfate et le triméthylamine-N-oxide (TMAO) et *Escherichia*, *Clostridium* et *Faecalibacterium*. Les deux métabolites étaient corrélés positivement avec l'abondance d'*Escherichia*.

Le 3-indoxyl-sulfate, dérivé de l'indole, est produit par le tryptophane via la tryptophanase retrouvée chez *Escherichia*. C'est un ligand du récepteur AhR qui joue un rôle dans la protection contre l'inflammation intestinale et est un marqueur de la production d'indole qui protège la barrière intestinale. La délétion de AhR dans les neurones du système nerveux entérique de souris entraîne un transit irrégulier [188]. Le 3-indoxyl-sulfate a été démontré comme bénéfique sur le transit chez les souris.

Le triméthylamine-N-oxyde (TMAO) est métabolisé majoritairement à partir de la carnitine (composant majeur du lait maternel) chez les nourrissons. Les enzymes cntA/B sont nécessaires pour métaboliser le TMAO à partir de la carnitine. Or ces enzymes sont toutes présentes chez *Escherichia* et *Clostridium* pouvant expliquer la corrélation entre TMAO et *Escherichia* [189].

Clostridium est connu pour favoriser la synthèse de 5-HT dans le côlon affectant les neurones intramusculaires et la motilité intestinale. Il agit sur le nerf afférent moteur vagal pour réguler l'activité contractile. Le 5-HT est fréquemment identifié par la méthode LC-MS/MS [190,191]. Bien qu'ayant employé une méthode similaire, nous n'avons pas réussi à détecter le 5-HT. Cependant, cela pourrait être une piste pour expliquer l'abondance de *Clostridium* chez les nourrissons ayant un transit régulier.

De plus, un transit intestinal irrégulier est associé à une réduction de l'abondance de *Faecalibacterium* [185] confirmant nos résultats.

Nos résultats indiquent que la qualité du transit intestinal à 1 semaine de vie se répercute sur la composition et les fonctions du microbiote intestinal jusqu'à l'âge d'un mois. Un transit régulier, c'est-à-dire une motilité intestinale efficace, à 1 semaine de vie pourrait conduire à une présence plus abondante de souches de *Faecalibacterium*, *Clostridium* et d'*Escherichia* ainsi qu'une abondance plus élevée de 3-indoxyl-sulfate et de TMAO. Nous savons que le Cluster A, dominé par *Escherichia*, est associé au meilleur pronostic à deux ans. Cette signature

microbienne pourrait permettre, dès la détection d'irrégularités de transit, de moduler le microbiote afin d'obtenir un microbiote fonctionnel à un mois, répondant aux critères favorables pour un bon pronostic à deux ans. Il serait intéressant d'étudier si une signature de la qualité du transit peut être observée sur une plus longue période, à trois ou six mois et si ces différentes sont détectées dès la première semaine.

CHAPITRE 3 :
Dialogue entre le microbiote intestinal et l'hôte : impact de la naissance prématurée sur le cycle de l'acide citrique (TCA) et l'immunité chez les nourrissons âgés d'1 mois.

1. Introduction

Cet article tend à répondre à 3 objectifs de ma thèse : avoir une meilleure connaissance de la mise en place du dialogue microbiote-hôte impliqué dans la maturation intestinale chez l'enfant tout en décrivant une réponse de l'hôte, à l'aide de méthodes non invasives. L'étude du dialogue hôte-microbiote présente de nombreux intérêts. Elle permet de comprendre comment les microorganismes influencent le développement, la physiologie et la santé globale des grands prématurés. En étudiant comment certaines bactéries ou certains métabolites du microbiote influencent la santé, nous pourrions envisager le développement de thérapies basées sur des modulations du microbiote pour rétablir ou maintenir un équilibre sain du microbiote. L'analyse du microbiote peut de plus aider à identifier des signatures spécifiques d'immaturité intestinale ou des biomarqueurs prédictifs de risques pour la santé.

Cet article a été soumis au journal Gut Microbes (ID : 236693659) et est en cours d'évaluation.

2. Article

Crosstalk between the gut microbiome and host: Impact of preterm birth on TCA cycle and immunity in 1-month-old infants

Constance Patin,[1] Céline Monot[1], Laetitia Marchand-Martin[2], Pierre-Yves Ancel[2,3,4], Marie-José Butel[4,5]Jean-Christophe Rozé[6], Patricia Lepage[1]*

Affiliations :
[1] Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute ; Domaine de Vilvert, 78350, Jouy-en-Josas, France.
[2] Université de Paris Cité, Center for Epidemiology and Statistics/CRESS U1153/EPOPé Team, Paris, France
[3] Clinical Investigation Center P1419, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France ;
[4] FHU PREMA « Fighting prematurity », 75006, Paris, France;
[5] UMR-S INSERM U1139, 3PHM, Faculté de Pharmacie, Université de Paris Cité, 75006, Paris, France ;
[6] Neonatal Department, INSERM-CHU Clinical Investigation Center 1413, et UMR-INRA1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes University Hospital, Nantes, France

***Corresponding author**
Patricia Lepage
PhylHom Lab, Micalis Institute,
INRAE
Domaine de Vilvert
78350 Jouy-en-Josas
France
Phone 33 1 34 65 20 09
Email: patricia.lepage@inrae.fr

Number of Figures: 6

Number of Tables: 1

Supplementary materials: Yes

Summary

Preterm birth is the leading cause of death in children under 5 years of age worldwide. Therefore, it is important to understand their short- and long-term consequences. While the association between preterm birth and short-term health has been widely studied, its association with long-term outcomes is vaguely known. Preterm refers to infants born alive before 37 weeks of gestation, and very-preterm refers to infants born before 32 weeks of gestation. In preterm and very-preterm infants, the gut microbiota is highly variable and often represents the microbiota found on the surface of the neonatal intensive care unit environment.

The objective of this study was to better understand the crosstalk between gut enterotypes and the host at 1 month of age in very preterm infants (EPIPAGE2 cohort). Infants were grouped according to the 2-year outcome based on the age and stage questionnaire (ASQ). We performed a meta-omic study on fecal samples from very-preterm infants at 1 month of age and integrated data on the fecal microbiota, metabolome, and transcriptome via 16S ribosomal RNA gene sequencing, LC-MS, and transcriptomics of the host.

The gut microbiota of very-preterm infants at 1 month is associated with host immune markers (CAMP), 2-year outcomes based on ASQ score, and different metabolomic pathways, notably the energy pathway due to the presence of various nicotinamide adenine dinucleotides (NAD+). The microbiome at 1 month could be a noninvasive biomarker of gut immaturity. *Escherichia* and *Staphylococcus* were found to be the best indicators of maturity and immaturity, respectively. *Escherichia* may help the process of intestinal maturation in preterm infants.

Keywords: Microbiota, metabolomic, transcriptomic, prematurity, NAD, Krebs cycle, immune response, *Escherichia*, *Staphylococcus*

Introduction

The gut microbiome is a complex ecosystem composed of trillions of microorganisms that play an important role in human health. The gut microbiota is established during the first 3 years of life and evolves throughout the lifetime. Microorganisms mainly colonize the gut at birth; therefore, the mode of delivery and duration of gestation influence their colonization [1]. In the early days of life, the gut microbiota undergoes expansion, which is influenced by dietary factors, the capacity of the immune system, and microbial competition [2]. Environmental factors also affect the gut microbiome, especially during the first 1,000 days, with potential repercussions on adult health (DOHaD concept; Developmental Origin of Health and Disease) [3].

The rate of premature birth (defined as birth before 37 weeks of gestation) in the world ranges between 4 and 16% depending on the country, and is higher in high-income countries [4]. In France, the prematurity rate increased from 4.5% in 1995 to 5.6% in 2016 and 7% in 2019[5], affecting 55,000 children each year [4]. Many complications, such as Sudden Infant Death Syndrome, breathing problems, and visual and hearing impairments in the short term, but also metabolic diseases, learning difficulties, and behavioral problems in the long term, are associated with prematurity [6]. Organs, for example within the digestive tract, may underdevelop due to the interruption in utero and ultimately influence their size and function (mucus layer production, increased permeability, reduced antimicrobial peptides, and fewer Paneth cells) [7].

The gut microbiota of preterm infants differs from that of full-term infants. The microbiota of full-term infants is often dominated by *Escherichia coli* and Enterococcaceae taxa in the first week, allowing colonization of strictly anaerobic bacteria [8–10] by consuming ambient oxygen in the gut. In preterm infants, the intestinal microbiota is less abundant, less diverse, and composed of higher proportions of facultative anaerobes commonly found in the neonatal intensive care unit (NICUs) [11], such as *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Clostridium* [12,13]. Since the gut microbiome may affect neurological development and immune system function [13,14], differences in the gut microbiome structure may consequently affect the long-term health of infants.

The composition of the gut microbiota is known to affect gene expression in the host cells [15]. Modulation of host gene expression by the gut microbiome has been well demonstrated in

germ-free versus conventional mice models [15]. For example, the tricarboxylic acid (TCA) cycle of colonocytes is dysregulated owing to the lack of the microbial metabolite butyrate in germ-free mice [15]. Antibiotics, probiotics, and prebiotics can modulate the microbiome and, subsequently, host gene expression. Immunity-related gene expression can also be affected by the composition of the gut microbiota. In mouse models, more than half of the immunity genes expressed in the gastrointestinal tract are regulated by the gut microbiome [15]. Pathogenic bacteria such as *Helicobacter*, *Salmonella* and *Listeria* can regulate or deregulate the host's cellular pathways [15].

Microbiome-host interactions can be studied using in-vitro models (cell lines, organoids, etc.), biopsies collected from the host (invasive method), exfoliated colonic cells from feces [16,17] and fecal transcriptome [18,19]. In our study, we characterized the microbiome-host dialogue using the fecal transcriptome, which offers non-invasive and robust analysis.

We previously showed that very-preterm infants (birth before 31 weeks of gestation) can be stratified into six enterotypes based on their gut microbiome composition at one month of age [13]. Five enterotypes were driven by one dominant bacterial genus (enterotypes 1–5), whereas one was characterized by a very low bacterial load (enterotype 6). These enterotypes were associated with different cognitive development at 2 years of age, as evaluated using the Ages and Stages Questionnaire (ASQ). Enterotypes 4, 5, and 6 (driven by *Enterococcus*, *Staphylococcus* and low bacterial load, respectively) grouped preterm infants with the worst outcome (Cluster C), enterotype 3 (driven by *Escherichia*) grouped infants with the best outcome (Cluster A), and enterotypes 1 and 2 (driven by *Clostridium* and *Klebsiella/Enterobacter*) grouped infants with heterogeneous outcomes (Cluster B).

In the present study, we aimed to investigate the functionality of these enterotypes and determine how they might lead to different health outcomes later in life. We characterized and integrated gut microbial composition, metabolic functions, and host transcriptomic profiles. We further described noninvasive microbial biomarkers associated with detrimental health outcomes in very preterm infants.

Results

For each preterm fecal sample, we sought information on the gut microbial composition and diversity (using 16S rRNA gene sequencing), metabolite composition (using non-targeted metabolomics), and transcriptome profile (using mRNA transcriptomics coupled with RT-qPCR). However, sample quality issues and/or a lack of sufficient bacterial biomass prevented the combination of all techniques for all samples **(Figure 1)**. For microbial composition and metabolomics, results were obtained for Clusters A, B, and C samples (n= 60), except for those associated with enterotype 6 (n= 13; low bacterial load). The host transcriptomic profile was obtained by analyzing pooled samples from Cluster A (n=3 pools with 6 samples each), B (n=3 pools with 6 samples each), and enterotype 6 (n=2 pools with 6 samples each). Most of the samples used in these pools were analyzed in parallel by RT-qPCR, with the addition of more samples for Cluster C (n=9).

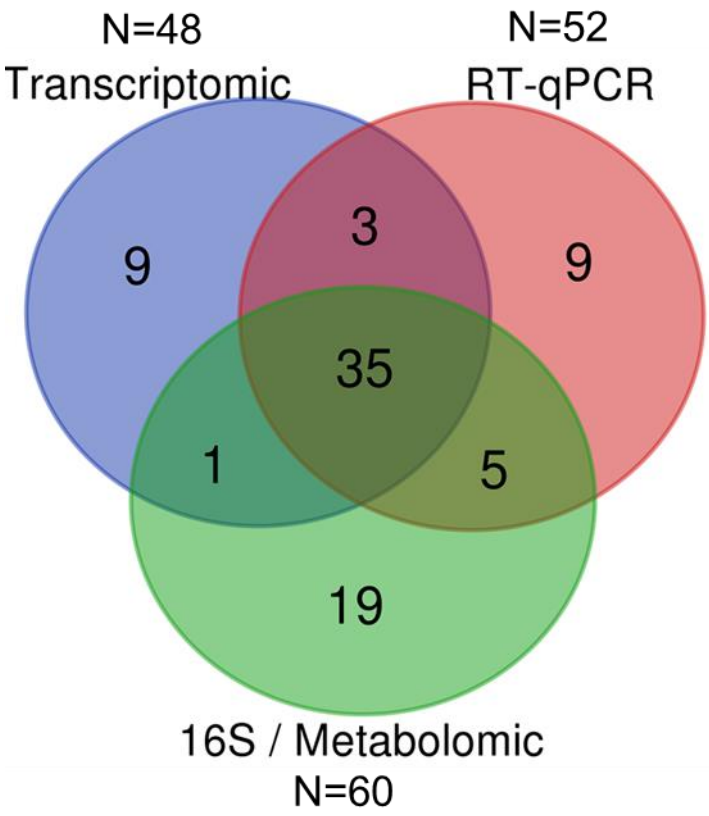


Figure 1: Venn diagram showing the number of samples shared between the different analysis techniques that were used. The blue circle represents the results obtained from transcriptomics. The red circle represents the samples with metabolomics and microbial composition results. The green circle represents samples with RT-qPCR results.

Preterm gut microbiome at 1 month is associated with cognitive outcome at 2 years

In a cohort of 577 preterm infants, Roze et al [13] highlighted the statistical stratification of one-month-old infants into six enterotypes named enterotype 1 to enterotype 6 based on the gut microbiome composition **(Supplementary Figure 1)**. Enterotype 3 was driven mostly by *Escherichia/Shigella* and was associated with higher gestational age, indicating a more mature microbiota; therefore, it had better outcomes and better ASQ. There was a significantly better overall neurodevelopment at 2 years of age in infants associated with enterotype 3 at 1 month of life (G-test, P = 3.756e-07) [13]. The 20 infants selected from this enterotype were referred to as Cluster A. Enterotypes 1 and 2, driven by *Enterobacter* and *Clostridium sensu stricto* had intermediate outcomes. The 20 infants selected from these enterotypes were referred to as Cluster B. Enterotype 4 (*Enterococcus* driven), enterotype 5 (*Staphylococcus* driven), and enterotype 6 (low biomass) were associated with a lower gestational age and poor outcomes (death or ASQ less than 185). The 20 infants selected from enterotypes 4 and 5, and 13 infants from enterotype 6 were referred to as Cluster C. With our sample selection (n=73), these clusters were also associated with different overall neurodevelopment at the age of 2 years (G-test; P = 0.0078) **(Figure 2A)**.

Analyses based on the selection of 60 samples from Clusters A (n=20), B (n=20), and C (n=20; without samples from enterotype 6 with low biomass) highlighted differences in microbial beta-diversity **(Figure 2B)**. Clusters B and C were closer to each other and further away from Cluster A on the principal coordinate analysis (PCoA) based on the Bray-Curtis distance method. Differences in the microbial composition in this subgroup of infants were also associated with a significantly lower ASQ in infants belonging to Cluster C (Figure 2A). This was also associated with differences in microbial diversity, with significantly lower diversity in infants from Cluster C **(Figure 2C)**. The microbiome in Cluster A was driven by *Escherichia*, Cluster B by *Klebsiella, Enterobacter, and Clostridium*, and microbiomes of Cluster C infants were driven by *Staphylococcus* and *Enterococcus* genera (Figure 2D). Moreover, we observed that *Bifidobacterium* detection was less frequent in Cluster C (G-test, P = 0.00084) and was present in only 40% of the samples as compared to 55% and 70% of the samples in Clusters A and B, respectively.

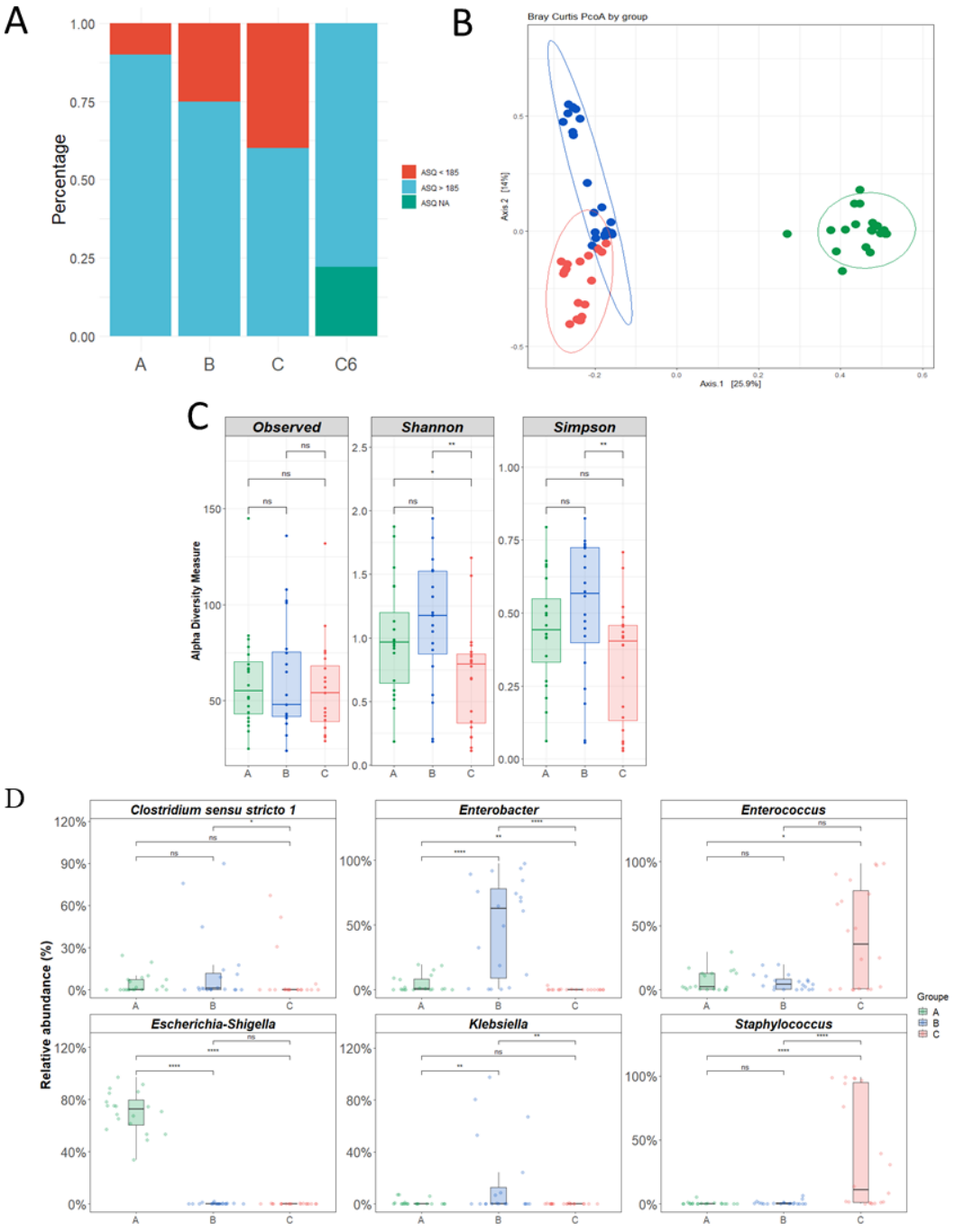


Figure 2: Analysis of intestinal microbiome composition from feces and effective of enterotype by cognitive development

A/ On the 60 selected samples, the frequency of preterm infants with high ASQ (> 185) in blue and a low ASQ (<185) in red; Pval = 0.007885 with G test. B/ On the 60 selected samples, principal coordinate analysis based on Bray-Curtis distance matrix highlights bacterial clustering between the 3 clusters (n=20 infants/cluster). C/ Alpha diversity evaluated by observed Shannon and Simpson indices. D/ Relative abundance of 5 main genera in each cluster. * = Pval <0.05; ** = Pval <0.01; *** = Pval <0.001

Correlation between Cluster-driving bacteria, microbial diversity, gestational age, and weight at birth.

Preterm infants were divided into three gestational age groups (GAB): GAB1 included infants born before 26 weeks of gestation, GAB2 included infants born between 27 and 29 WA, and GAB3 included infants born after 30 weeks of amenorrhea. ASQ differences were not significantly associated with gestational age at birth (G-test, P = 0.6) **(Figure 3A)**. However, a lower gestational age was associated with the proportion of *Staphylococcus* in the microbiome at 1 month of age. Indeed, there was a trend for a higher abundance of *Staphylococcus* in the GAB1 subgroup within the B and C Clusters, driven by *Clostridium/Enterobacter/Klebsiella* (P = 0.11) and *Enterococcus/Staphylococcus* respectively (P = 0.15**; Figure 3B**). In Cluster A driven by *Escherichia*, the relative abundance of *Staphylococcus* was not associated with GAB.

Overall, GAB was positively correlated with the proportions of *Escherichia* (r= 0.16, P = 0.03) and negatively correlated with *Staphylococcus* (r= -0.25, P = 0.001; **Figure 3C**). These genera were also negatively correlated with each other (r= -0.47, P = 0.02). The correlation was also positive between ASQ and *Escherichia* (r = 0.3, P = 0.09). GAB was not correlated with diversity represented by Simpson's index (r = -0.12, P = 0.35), whereas diversity was negatively correlated with percentages of *Staphylococcus* (r = -0.25, P = 0.03).

Preterm infants were also divided into three groups of weight at birth: low weight included infants weighing less than 1,500g, mean weight included infants weighing between 1,500g and 2,499g, and high weight included infants weighing more than 2,500g. ASQ differences were not significantly associated with weight at birth (G-test, P = 0.12; **Supplementary Figure 2**). Infant weight at birth was positively correlated with the relative abundance of *Escherichia* (r=0.36, P = 0.02) and negatively correlated with the relative abundance of *Enterococcus* (r = -0.22, P = 0.054).

The dominant genera of the enterotypes also correlated with each other: *Escherichia* was negatively correlated with *Staphylococcus* and *Enterococcus* (r = -0.47, P = 0.02, and r = -0.22, P = 0.03, respectively). *Enterococcus* was also negatively correlated with *Enterobacter* (r = -0.13, P = 0.04). *Klebsiella* genus was not significantly correlated with any other genera.

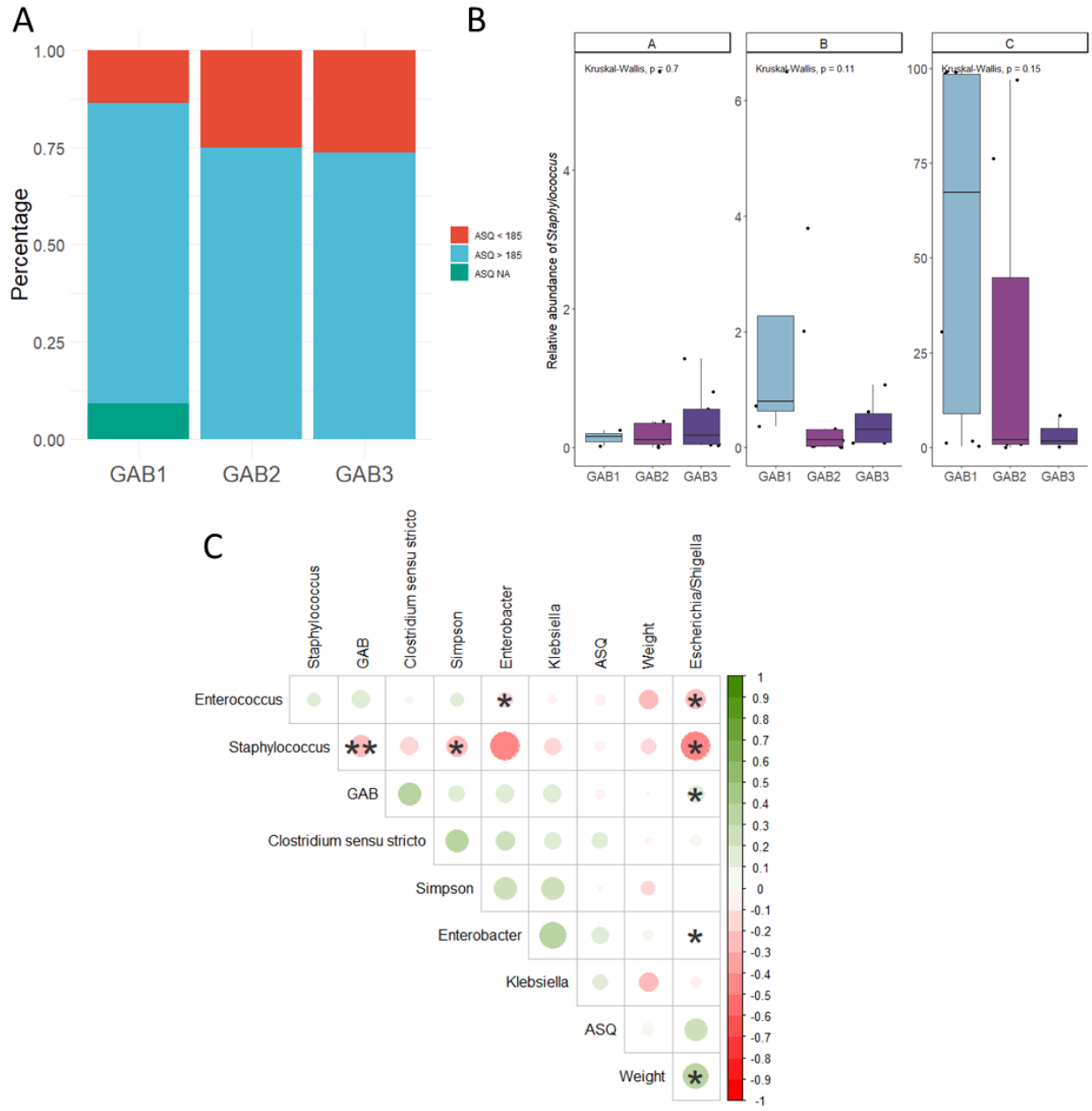


Figure 3: Relations and correlations between microbiome composition and clinical variables
A/ Frequency of preterm infants with high ASQ (> 185) in blue and low ASQ (<185) in red depending on gestational age (GAB1: <26SA, GAB2: between 27SA and 29SA, GAB3: >30SA. Pval = 0.06 with G test. B/ Relative abundance of *Staphylococcus* in the 3 clusters by different gestational age. C/ Spearman correlation with the significance of quantitative clinical variables and dominant bacterial genera * = Pval <0.05; ** = Pval <0.01; *** = Pval <0.001

The differences in the gut microbiome were reflected on the fecal metabolomic profile

A total of 1,040 metabolites were detected in the feces of very preterm infants at 1 month of age, and 856 were annotated. Based on the Metorigin analysis, 49 metabolites were solely attributed to the gut microbiota, 6 to the host, and 150 to co-metabolism of the microbiota and the host. The remaining metabolites were associated with drugs (n = 35), food components (n = 75), and of unknown origin (n = 725) (Figure 4A).

According to principal component analysis (PCA) of the composition of fecal metabolites, the fecal metabolome of preterm infants belonging to Cluster C slightly differed from that of preterm infants in Clusters A and B. It is noteworthy that while Cluster A was distinct from the two other clusters based on microbiome composition, the fecal metabolome was more divergent in infants from Cluster C than in Clusters A and B (Figure 4B).

Analysis of the super-pathways (partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA)) highlighted that the pathways related to energy, carbohydrates, and partially characterized molecules discriminated the three clusters most with a relatively higher variable importance in projection (VIP score) measure between 1.3 and 1.6 (Figure 4C). VIP score summarizes the contribution of a variable to the model and is calculated as a weighted sum of the squared correlations between the PLS-DA components and the original variable [20]. Energy super-pathway metabolites were more abundant in Cluster A driven by Escherichia and less abundant in Cluster C, driven by *Staphylococcus* and *Enterococcus*. This pathway was positively correlated with *Escherichia* ($r = 0.4$, $P < 0.001$) and *Enterobacter* ($r = 0.4$, $P < 0.001$), and negatively correlated with *Enterococcus* ($r = -0.2$, $P < 0.05$) and *Staphylococcus* ($r = -0.4$, $P < 0.001$) (Figure 4D).

The lipid, peptide, and xenobiotic pathways were the least discriminant with VIP scores close to 0. These pathways were not correlated with bacterial members (except for the xenobiotic pathway in *Clostridium*, $r = 0.2$, $P < 0.05$). The amino acid super-pathway was also positively correlated with *Klebsiella* ($r = 0.2$, $P < 0.05$) and negatively correlated with *Staphylococcus* ($r = -0.3$, $P < 0.05$). The nucleotide and cofactor pathways were not correlated with bacterial members with VIP scores lower than 1.

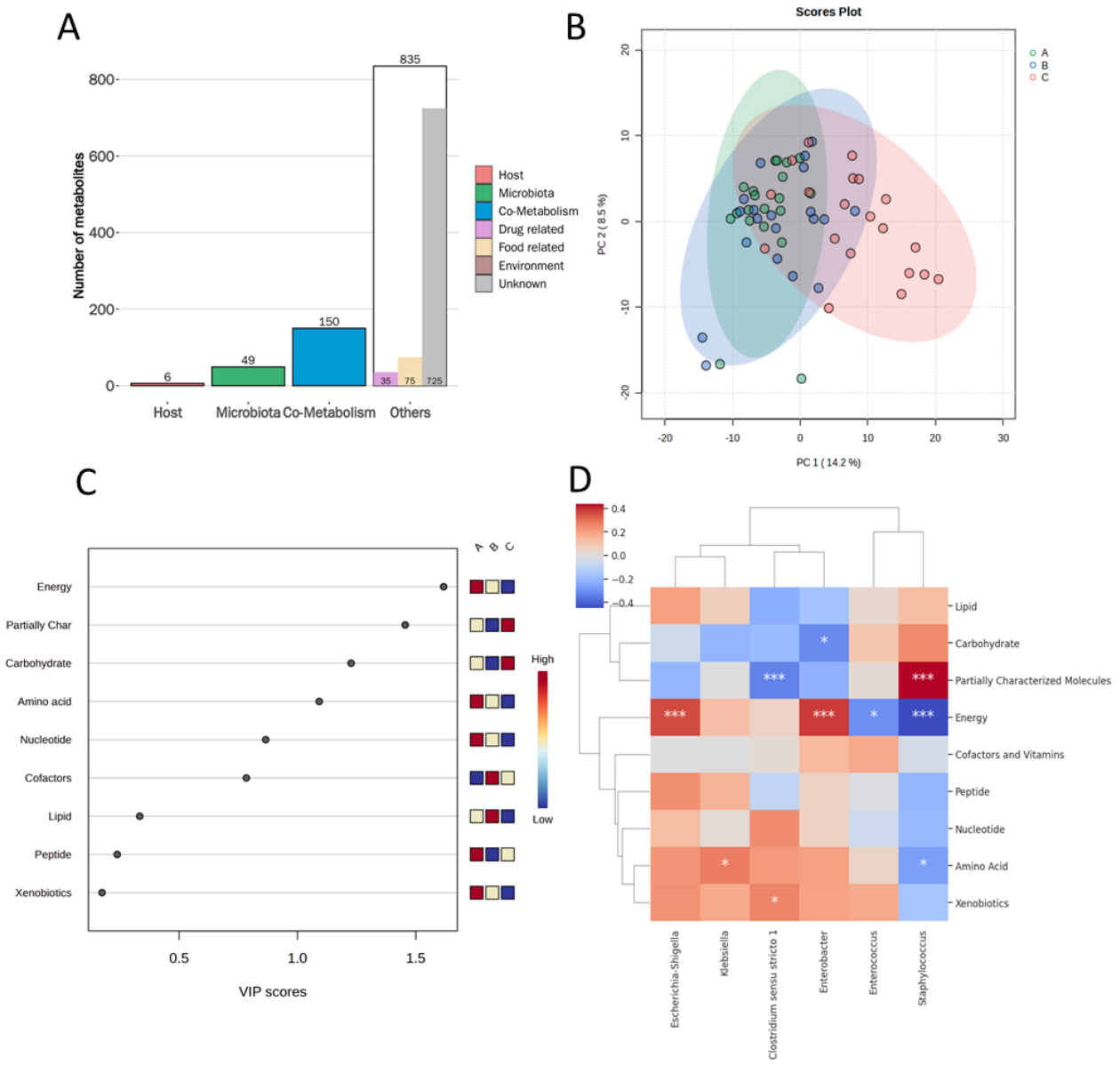


Figure 4: Composition of metabolome fecal and importance of super-pathways for each cluster and genera

A/ Origin of metabolites detected in feces. B/ Principal Component Analysis on the fecal metabolome. C/ Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) on super pathways.
A VIP score is a measure of a variable's importance in the PLS-DA model, it summarizes the contribution a variable makes to the model. The VIP score of a variable is calculated as a weighted sum of the squared correlations between the PLS-DA components and the original variable. Partially Char = Partially Characterized Molecules. Color under clusters shows an abundance of these super pathways

D/ Spearman correlation with significance between super pathway and interest bacteria. * = Pval <0.05; ** = Pval <0.01; *** = Pval <0.001

Expression of immune-related genes differentiated the Clusters

Since host gene expression can be analyzed by isolating cells exfoliated from feces, we aimed to recover RNA from cells that were present in feces without prior cell isolation. Host transcripts from pooled fecal samples of infants belonging to Clusters A (n = 3; 18 infants) and B (n = 3; 18 infants) were analyzed using RNASeq. Transcriptome profiles could not be determined in Cluster C due to the low amounts (concentration <50ng/µl) and quality (too many contaminants) of eukaryotic RNA. Instead, host transcripts were specifically recovered from infants belonging to enterotype 6 from Cluster C (low bacterial biomass) (n = 2; 12 infants). Overall, the gene expression patterns of the exfoliated cells discriminated the three clusters by PCA (Figure 5A). A total of 88 transcripts were associated with Cluster A. The genes that were overexpressed in Clusters A and B and enterotype 6 were involved in pathways related to inflammation (acute inflammatory response, humoral immune response, immune effector process, immune response, immune system process, inflammatory response, inflammatory response to antigenic stimulus), leukocyte activation and aggregation, and chemokine production (Figure 5B). In contrast, 33 genes were under-expressed in the RNA sample pools of preterm infants from enterotype 6 compared to Cluster A, and 77 genes were under-expressed in the RNA sample pools of preterm infant feces from Cluster B compared to A. There were no statistically significant differences between clusters B and 6 (Cluster C).

We focused on transcripts expressed by immune cells such as calprotectin and antimicrobials. Infants in Cluster A expressed more global fecal calprotectin than enterotypes 6 and C. Cluster B had more global fecal calprotectin transcripts than enterotype 6. There was a higher expression of both subunits in the feces of Cluster A compared to enterotype 6 and more S100A9 than in Cluster C. The subunit S100A8 was more abundant in the feces of Cluster B than in enterotype 6 (Supplementary Figure 3A). There are two types of antimicrobials: alpha-defensin and cathelicidin. Enterotype 6 had a lower production of lysosome (LYZ), a Paneth cell marker (Supplementary Figure 3B). Alpha defensins DEFA5 and DEFA6 were more strongly expressed in Cluster B and enterotype 6 pools, but DEF1, DEF3, and DEF4 were more highly expressed in Clusters A and B (Supplementary Figure 3C). Cathelicidin Antimicrobial peptide (CAMP) has been described as cathelicidin in humans [21]. CAMP expression was only detected in Cluster A (Supplementary Figure 3D). RT-qPCR analysis showed that CAMP/LL37 expression was lower in enterotype 6 than in Clusters A and B (P = 0.0039 and P = 0.015, respectively) (Figure 5C). We also performed RT-qPCR targeting the two subunits of calprotectin (S100A8

and S100A9), which were differentially expressed between clusters A and 6 (P = 0.0053 and P = 0.063, respectively). S100A8 was differentially expressed between clusters B and 6 (P = 0.046), as well as between Cluster C and enterotype 6 (P = 0.048). S100A9 was differentially expressed between clusters A and C (P = 0.00041) and between clusters B and C (P = 0.0077) (Supplementary Figure 3E).

Analysis of gene expression by Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis (O-PLSDA) between Clusters A and B highlighted that NAMPT seemed to be the most discriminating for the two clusters with a VIP score over 8 (Figure 5D). RT-qPCR analysis highlighted stronger expression of NAMPT in Cluster A than in Cluster C or enterotype 6.

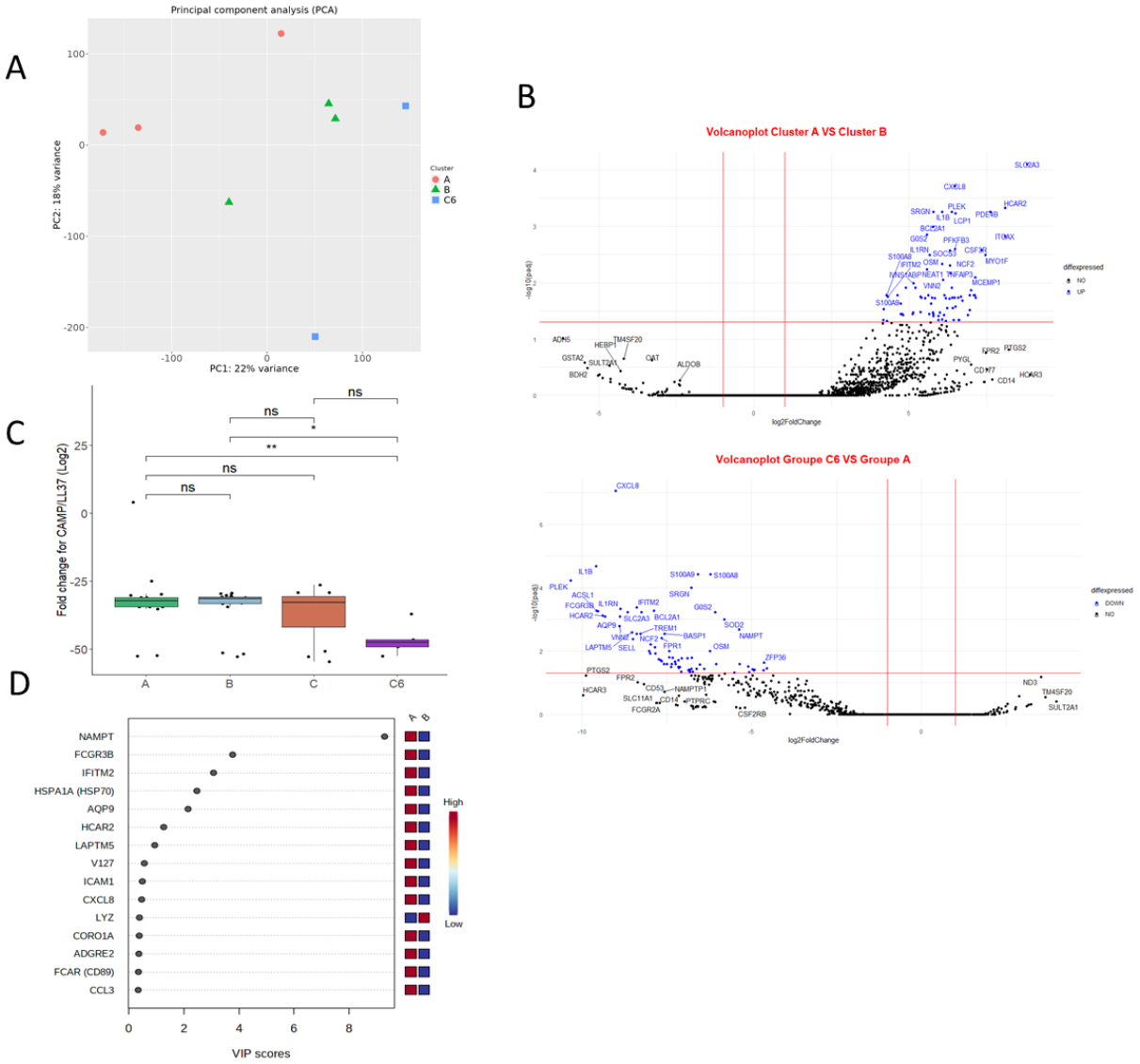


Figure 5: Transcriptomic and RT-qPCR results from feces
A/ Principal Component Analysis on fecal host transcriptome. B/ Volcano plot highlighting genes with a significant differential expression in Cluster A vs Cluster B (top) and Enterotype 6 vs Cluster A (bottom). C/ Log2 Fold change for CAMP/LL37 gene. D/ PLSDA between Clusters A and B.

Low levels of final TCA cycle metabolites are associated with Staphylococcus-enriched gut microbiota and unfavorable overall neurodevelopment

The tricarboxylic acid (TCA) cycle is the major pathway involved in energy metabolism. Metabolites that appear early in the TCA cycle, i.e. citrate (Kruskal test, P = 0.01) and aconitate (Kruskal test, P = 0.004), were detected more abundantly in Cluster C than in Clusters A and B (Figure 6A) (Supplementary Figure 4A-B). On the other hand, final TCA cycle metabolites i.e malate (Kruskal-Wallis test, P = 1.664e-05), fumarate (Kruskal test, P = 1.034e-08), and succinate (Kruskal test, P = 1.111e-06), were more abundant in Clusters A and B than in Cluster C (Supplementary Figure 4E-G). Supporting this result, the proportions of *Staphylococcus* were positively correlated with citrate and aconitate (r = 0.44, P = 0.01, and r = 0.38, P = 0.0003, respectively), whereas *Escherichia* was negatively correlated with aconitate (r = -0.27, P = 0.04) but positively correlated with fumarate and succinate (r = 0.56, P = 0.01, and r = 0.48, P = 0.0006, respectively). These two metabolites were negatively correlated with *Enterococcus* (r = -0.56, P = 0.04, and r = -0.41, P = 0.01, respectively) (Figure 6B). Isocitrate (isocitric lactone), which is present between aconitate and alpha-ketoglutarate in the TCA cycle, did not correlate with any bacterial genera and was not differentially detected in a particular cluster (Figure 6B, Supplementary Figure 4C). Alpha-ketoglutarate was less abundant in Cluster C and was negatively correlated with *Enterococcus* (r = -0.36, P = 0.02) (Figure 6B, Supplementary Figure 4D). A similar global correlation pattern exists between *Staphylococcus* and *Enterococcus* and metabolites of the TCA cycle. Statistical confirmation was provided by the K-means method, which separates the correlations into two groups: the first group with Staphylococcus and *Enterococcus* and the second group with the other bacteria (Figure 6B). These findings demonstrate a consistent pattern in Cluster C compared with the other two clusters.

The transition from metabolites abundant in Cluster C (citrate and aconitate) to metabolites abundant in Clusters A and B was separated by a reaction requiring the presence of NAD+. Isocitrate dehydrogenases catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate (isocitric lactone) to alpha-ketoglutarate and reduce NAD+ to NADH. NAD+ was found to be less abundant in Cluster C than in Clusters A and B (Dunn test, P = 0.02 and P = 0.04, respectively), thus blocking the continuation of the reactions of the TCA cycle (Figure 6C). NAD+ was negatively correlated with *Staphylococcus* (r = -0.43, P = 0.02) and positively correlated with *Escherichia* (r = 0.2, P = 0.05).

Instead of being generated de novo from tryptophan, most NAD+ is recycled from nicotinamide (NAM) through the salvage pathway to maintain cellular NAD+ levels via NAMPT [22]. This gene was more highly expressed in Cluster A than in Clusters B and C and enterotype 6 (P = 0.0037, P = 0.0033, and P = 0.08, respectively) (Figure 6D).

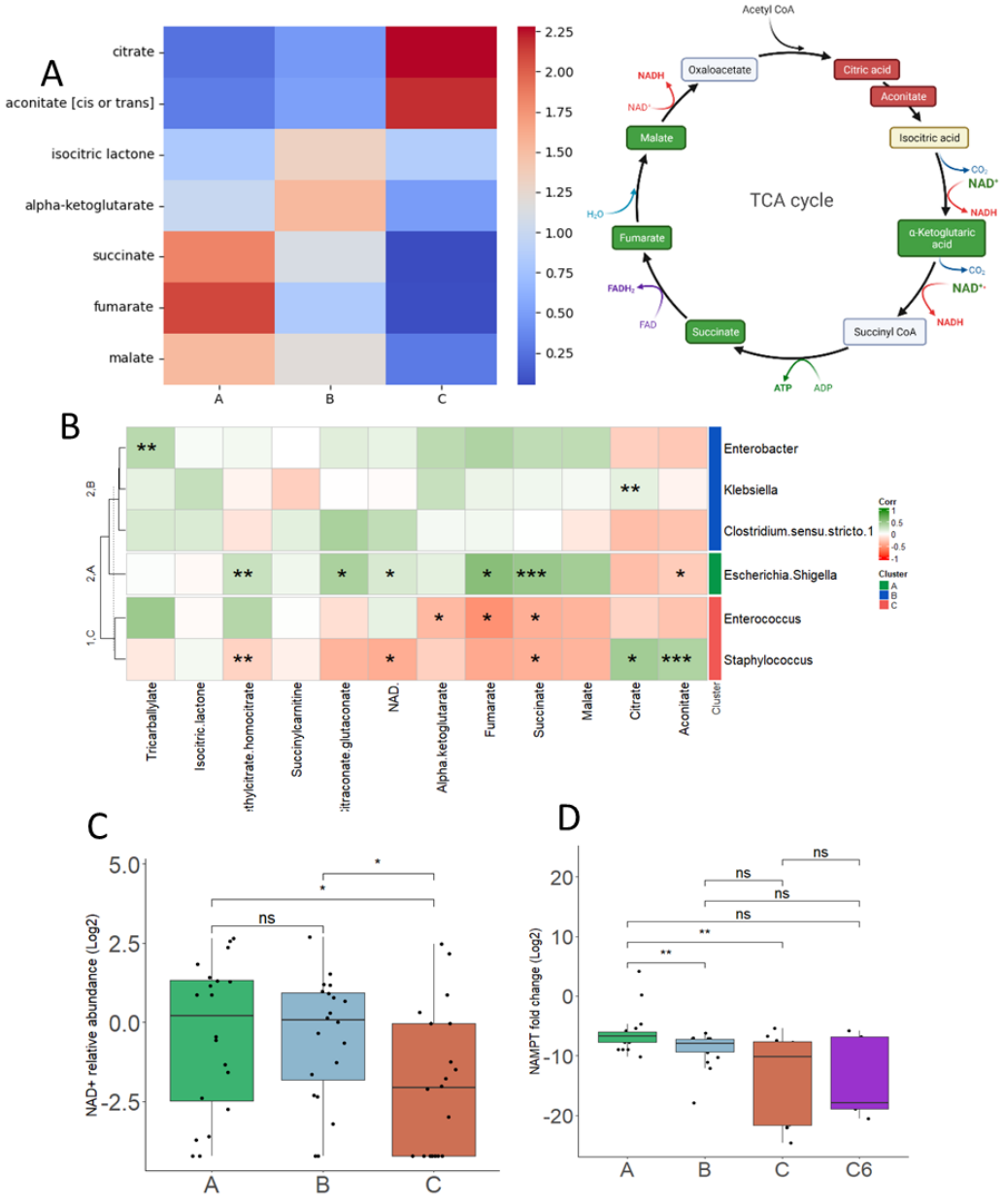


Figure 6: Low levels of final TCA cycle metabolites are associated with Staphylococcus-enriched gut microbiota and unfavorable cognitive development

A/ Abundance of metabolites making up the TCA cycle in the 3 different clusters. In TCA cycle, in red: metabolites higher in Cluster C, in green: metabolites higher in Cluster A and B, in yellow: no difference and in green: no found in LC-MS. B/ Spearman correlation between TCA cycle metabolites and bacteria. Separation by kmeans in 2 groups. * = Pval <0.05; ** = Pval <0.01; *** = Pval <0.001 C/ Abundance of NAD+ in each cluster. Test de Dunn. D/ Relative expression of the NAMPT gene with RT-qPCR analyses.

Discussion

Our study highlights that the proportions of *Escherichia* and *Staphylococcus/Enterococcus* colonizing the gut of one-month-old preterm infants were relevant microbial signatures of clinical birth variables and neurological outcomes at two years of life. Similarly, a study showed a positive association between alpha-diversity within the gut microbiome of one-year-old infants and the Mullen Score (ELC) [23]. The Mullen score is used to evaluate infant and young child development. It is similar to the ASQ, with the difference that the tests are not conducted by parents, but by professionals. A link has already been established between intestinal microbiota and child development. Moreover, the relative abundances of these two genera were negatively correlated, indicating the opposition of these two types of clusters. Indeed, they had inverse correlation profiles with the gestational age at birth (GAB) and weight variables that we evaluated. In addition, the composition of the microbiome and metabolome for Clusters A and C were the most distinct. Overall, there is a similar pattern for metabolomic super-pathway correlation for *Enterococcus* and *Staphylococcus* in contrast to *Escherichia*. This can explain the proximity of Clusters A and B on the PCA and the difference in Cluster C.

A gut microbiota enriched in *Escherichia* at one month of life was associated with a better child outcome at two years of age and clinical health compared to children with a gut microbiota enriched in *Staphylococcus* in our cohort. Weight and GAB could affect the composition of the gut microbiome at one month. *Escherichia* was positively correlated with variables, including GAB, ASQ, and birth weight. *Staphylococcus* and *Enterococcus* spp. were negatively correlated with the same clinical variables. A microbiome enriched in *Staphylococcus* or *Enterococcus* reflects lower microbial diversity, which can negatively impact the development of infants, especially during the first 1,000 days of life (DOHaD concept) [24].

The early gut microbiota has an impact on cognitive development [25–29] and modulation of gut microbial metabolites is one of the most extensively studied links between gut microbiota and neurodevelopment within the scope of the gut-brain axis. More specifically, it has been shown that *Escherichia* enterotype is not associated with neurological pathologies, which is consistent with our findings. A previous study indicated that *E. coli* is an inhabitant of a more mature gut microbiome [30]. In contrast, *Klebsiella pneumoniae* enterotype is associated with neurological pathologies [14]. However, we did not find a link between *Klebsiella* and the outcome of our study. This may be due to a species-dependent mechanism. We did not find

associations between outcomes or other clinical variables and Cluster B (*Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Clostridium*). Further studies are required to determine their impact on infants. In the latter study [14], *Staphylococcus* enterotype was not detected, but *Enterococcus* had no positive or negative association with neurological pathologies.

The transition from aerobic to anaerobic state is important for the gut health of infants. *Staphylococcus* are catalase-positive bacteria, that is, they can reduce oxygen peroxide (H_2O_2) to oxygen and water, which may interrupt the transition to anaerobiosis. H_20_2 is ubiquitously produced by intestinal cells [31], especially during microbial challenges such as primo-colonization [32]. The higher abundance of *Staphylococcus* in Cluster C may potentially increase oxygen in the gut of these preterm infants, and this hypothesis needs to be further validated. In contrast, *Escherichia* uses oxygen to grow, which may play a critical role in the healthy development of the gut and explain why it is found as a primo-colonizer in the gut of full-term newborns [9]. This genus can remove oxygen present in the gut of infants. Anoxia is essential for colonization by strictly anaerobic bacteria such as *Bifidobacterium*: it has been shown that an increase in *Bifidobacterium* abundance in an infant's gut is an essential component of good health in adulthood [33] and is associated with delayed development in preterm infants [34]. Indeed, we observed that *Bifidobacterium* was rarely present in Cluster C. A reduction in microbial diversity due to the absence of strict anaerobes in infants can potentially be explained by the enrichment of *Staphylococcus* and depletion of *Escherichia*.

The microbiome impacts the immune system gene expression of the host; therefore, we focused on the expression of anti-microbial peptide genes. Alpha-defensins are produced by Paneth cells [35] and in our analysis, enterotype 6 had lower expression of LYZ genes (Paneth cell markers), which might indicate decreased production of these antimicrobial peptides and may explain the lower immune response in this group. However, this was not the case; we observed a stronger tendency for the expression of alpha-defensin by Paneth cells (DEFA5 and 6) in Clusters B and C6. However, the other alpha-defensins were more highly expressed in Clusters A and B by neutrophils (DEF1, 3, and DEF4). Cathelicidin contributes to both adaptive and innate immunity. These findings suggest that CAMP plays a role in the establishment of the neonatal gut microbiota [36]. The expression of CAMP/LL37 was lower in enterotype 6 and

higher in Cluster A. Overall, our findings suggest that having detectable levels of bacteria in the gut may increase the expression of certain immune-related genes and that their expression levels may fluctuate based on the bacterial genus. An increase in the expression of immune system-related genes at the beginning of life is beneficial to long-term health. Development of the immune system is strongly associated with primary colonization of the gut [8]. Moreover, some studies have shown an increase in fecal calprotectin levels in healthy infants in the first month of life [37–39].

Energy metabolism was strongly positively correlated with *Escherichia* and *Enterobacter* and negatively correlated with *Staphylococcus* and *Enterococcus*. *Staphylococcus* was positively correlated with early TCA cycle metabolites and negatively correlated with late metabolites, while *Escherichia* was positively correlated with late TCA cycle metabolites and negatively correlated with early metabolites. NAD+ was positively correlated with *Escherichia* and negatively correlated with *Staphylococcus*. The NAMPT transcript (visfatin) was differentially expressed between clusters. It can metabolize NAD+, which is important at the beginning of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. The TCA cycle may be blocked in Cluster C owing to a lower concentration of NAD+ caused by a lower amount of the NAMPT transcript and enzyme. Microbial stimulation of NAD+ production may help maintain the normal metabolism of microbes, and host NAD+ stimulation can promote beneficial intestinal bacteria and inhibit pathogenic bacteria. Stimulation of NAD+ by nicotinamide (NAM) could further limit infection or colonization by pathogens, including Staphylococcus [40]. Because the TCA cycle is necessary for energy metabolism and overall neurodevelopment, groups with poor functioning (Cluster C) may have a deficit in energy metabolism. The administration of NAD+ precursor (NAD3 dietary supplement) in adults improves neurodegenerative pathologies [41].

Conclusion

In this study, we demonstrated that a 1-month-old preterm infant microbiota driven by either *Escherichia* or *Staphylococcus* had the most pronounced association with gestational age and weight at birth, as well as the most pronounced impact on fecal metabolites and transcripts. A microbiota driven by *Escherichia* is considered more mature because of its higher abundance in infants with a higher gestational age and birth weight and may have more beneficial effects on overall neurodevelopment at 2 years of age, bacterial diversity, TCA cycle metabolism, and primo-immunity by the host. Conversely, the *Staphylococcus* enterotype is more prevalent in infants of low gestational age and weight, and may be associated with blocked TCA metabolism, weaker host immune expression, and worse overall neurodevelopment at 2 years of age.

Patients and methods/materials

Study population and sample collection

We selected 73 infants from the EPIFLORE cohort, an ancillary study of the very-preterm French national cohort, EPIPAGE2. All infants were born between 25 and 31 weeks of gestation, and fecal samples were collected at approximately 21 days to one month of age and stored at -80°C. Twenty infants from each of the three clusters and 13 from enterotype 6 (low biomass) were selected to represent the overall microbiome distribution and the main clinical and demographic characteristics of the study population. None of the selected children developed Necrotizing Enterocolitis (NEC) or had severe morbidities, while all experienced a central catheter, and all but two were treated with antibiotic at D0.

The same number of samples was selected for each group (n=20), which was based on several variabilities in clinical data (Table 1).

	Cluster A n=20	Cluster B n=20	Cluster C n=20	Enterotype 6 n=13
Mean of gestational age	28,75	28,3	27,35	26,38
Weight at birth				
High	65%	55%	30%	15%
Mean	5%	10%	20%	77%
Low	30%	35%	50%	8%

Female	40%	35%	40%	62%
Context preterm				
Induced	30%	30%	25%	23%
Spontaneous accepted	25%	30%	10%	38%
Spontaneous sub	45%	40%	65%	38%
Cesarean delivery	50%	80%	75%	38%
Multiple birth	45%	30%	45%	23%
Necrotizing enterocolitis (NEC)	0	0	0	1
Premature rupture of membranes (PROM)	50%	55%	50%	0%
APGAR Superior D7	80%	85%	85%	77%
Practice of skin-to-skin contact during the first week of life	75%	80%	60%	62%
Gastrointestinal transit considered normal (at least 1 stool a day)	75%	45%	35%	54%
Augmentin	0%	0%	10%	0%
D0 postnatal antibiotics	100%	90%	100%	69%
Secondary postnatal antibiotics	30%	45%	50%	77%
Mortality or severe morbidity	0%	0%	0%	23%
Insulin	25%	15%	35%	77%
Never intubation	25%	25%	10%	5%
Surfactant during first days of life	65%	70%	75%	85%
D3 catecholamine	5%	0%	15%	8%
Sup 3g protein	65%	75%	95%	45%
Breast milk during the first week	45%	10%	20%	31%
Breast milk D28 (LM)				
Other feed	20%	5%	5%	8%
BForF	70%	95%	95%	85%
BF	10%	0%	0%	0%
Breast discharged from hospital	55%	45%	35%	15%
Mean BMI mother	23,32	24,20	21,29	25,84
Nationality				
France	70%	65%	70%	54%
Africa	10%	10%	25%	31%
Others	5%	15%	5%	0%
Mean ASQ score at 2 years	217,75	193,35	161,85	200,35
Mean Score communication at 2 years	41,75	42	29,5	43,36

Mean Score personal social at 2 years	44,8	39,25	30	46,36
Mean Score problem solving at 2 years	42,75	33,7	31,65	44,31
Mean Score gross motor at 2 years	50,2	44,9	34	50,18
Mean Score fine motor at 2 years	48,1	39,5	36,7	52,55

Table 1: Associations between Cluster of microbiota, neonatal characteristics and individual Therapies

Fecal microbiome analysis

Total fecal DNA was extracted from 73 samples, as described previously [42]. The concentration and integrity of nucleic acids were determined visually via gel electrophoresis on 1% agarose gels. The V3-V4 region (V3fwd: TACGGRAGGCAGCAG, V4rev: TACCAGGGTATCTAAT) of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced, and the sequences were subsequently analyzed as previously published [13].

Fecal untargeted metabolomics

To gain insight into the metabolic functions linked to differential bacterial colonization in the preterm gut, the fecal metabolome was analyzed. This approach allowed us to characterize both host- and microbiome-derived metabolites. Metabolomic analysis was performed on aliquots of 50 mg of frozen fecal samples using the LC-MS method (Metabolon Durham, USA). Acquisition, quality control, metabolite identification, and quantification were performed. The normalization method used is the batch method and is used to train artificial neural networks faster and more stably through normalization of the layers' inputs by re-centering and re-scaling. A total of 1,040 metabolites were detected, 856 of which were annotated. Uncharacterized metabolites were excluded from analysis.

Transcriptomic library construction

To gain insights into the host transcriptomic response to differential bacterial colonization in the preterm gut, a catalog of host mRNA transcripts potentially detectable in preterm fecal samples was constructed. Briefly, RNA was isolated from frozen fecal aliquots using an RNAeasy mini kit (Qiagen) with a modified protocol: a mixture of 10µl/ml beta-mercaptoethanol - RLT buffer and 1 ml of TRIzol was added directly to 180 mg of feces. This mixture was vortexed for 15 seconds after 600 mg of sterilized glass beads. Mechanical lysis was performed with a Fastprep for 4 × 30 s at the maximum speed (6.5 m/sec). The suspension was incubated for 5 min at room temperature and centrifuged for 1 min at 12,000 × G and 4°C. The supernatant was transferred to tubes containing 300µL of chloroform and shaken for 1 min by hand. Centrifugation was performed for 10 min at 12,000 × G and 4°C, and the top layer of the supernatant was transferred to a new tube. Ethanol (1/1 v/v, 70%) was then added. The manufacturer's protocol was followed for isolation of total RNA. RNA was eluted in 40µl of RNAse-free water and stored at -80°C.

Total RNA was extracted from 73 samples and from an additional 31 samples (n= 20 + 5 from Cluster A n=20 + 7 from Cluster B, n= 20 + 19 from Cluster C, and n=13 from enterotype 6). RNAs was pooled by Cluster A (three pools of six samples from Cluster A, three pools of six samples from Cluster B, and two pools of six samples from enterotype 6) to obtain a library of potentially differentially expressed genes in the three clusters. RNA extracted from Cluster C samples did not meet the quality criteria for transcriptomics (no detection of housekeeping genes, low amount of RNA, and RIN<6). The pools were created according to the amount of RNA in each group, and RNA was reverse-transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with oligoDT16 to enrich mRNA.

RT-qPCR of selected genes

Transcripts for housekeeping genes (tubulin beta, TUBB2A, Hs00742533_s1), S100A8, S100A9, CAMP, and NAMPT were quantified by quantitative PCR (qPCR) after reverse transcription. RT-qPCR assays were performed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) for tubulin and Power SybrGreen PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) for other genes, using a QuantStudio 3 real-time thermocycler (Thermo Fisher Scientific). Amplification

conditions were 50°C for 2 min and 95°C for 20 s, followed by 60 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. Total RNA from HT29 cells and *Escherichia coli* (K12) were used as positive and negative controls, respectively, for eukaryotic and prokaryotic genes.

Gene	Forward	Reverse	Ref
S100A8	GCTAGAGACCGAGTGTCCTCAG	GCCCATCTTTATCACCAGAATG	[43]
S100A9	TGGAGGACCTGGACACAAATG	TCGTCACCCTCGTGCATCTT	[43]
CAMP/LL37	GACACAGCAGTCACAGAGGAT	TCACAACTGATGTCAAAGGAGCC	[44]
NAMPT	AGGGTTACAAGTTGCTGCCACC	CTCCACCAGAACCGAAGGCAAT	[45]

Bioinformatic and biostatistical analyses

FROGS "Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution" was used for the microbiome analysis: preprocess, clustering, chimera's removal, and operational taxonomic unit (OTU) affiliation [46]. 678 511 sequences were retained after filtering, and clustering using Swarm led to 172 446 OTUs. Chimera removal via VSEARCH retained 162 315 OTU. Two taxonomic affiliations were performed using the SILVA and RDP databases. After filtering and affiliation, 1,534 operational taxonomic units OTU were identified. Analysis and visualization of microbiome communities were conducted in Rstudio using the Phyloseq package [47] to calculate alpha and beta diversity metrics.

Metaboanalyst [48] and MetOrigin softwares [49] were used for PCA and PLS-DA analyses and metabolite profiling, respectively, of the metabolomics dataset.

For transcriptomic analysis, Illumina output raw sequencing files were filtered using fastQC tools for read quality and fastP for quality control, trimming of adapters, filtering by quality, and read pruning [50]. FASTQ files were aligned to the human genome using two databases, EnsemblOrg and Pub, using STAR software [51]. Finally, Rsem software was used [52]. The output was a gene count file and a normalized count file in TPM (Transcripts Per Million). Transcript pathway analysis was performed using Cytoscape software [53].

Statistical analyses were performed using the DESeq2 package [54] on non-normalized data provided in the package. The functions used were mapIds and EnhancedVolcano for the analysis of differentially expressed genes and PCA, respectively.

Statistical and graphical analyses were performed using RStudio or Python, respectively. Analysis of numbers was performed using the package ggplot2 with the Khi2 test or G-test. Correlations and visualizations were assessed using the Hmisc, Corrr, and ComplexHeatmap packages. Correlation and graphical analyses between genera and metabolites were performed using Python packages: Pandas, Numpy, and Scikit-learn. Boxplots were performed with the package ggstatsplot in Rstudio with parameters of non-parametric tests (Kruskal-Wallis) and the function ggbetweenstats.

Data availability

The data are available from the corresponding author upon request. The 16S rRNA gene reads are publicly available from the National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive under the Bioproject accession number PRJNA641157.

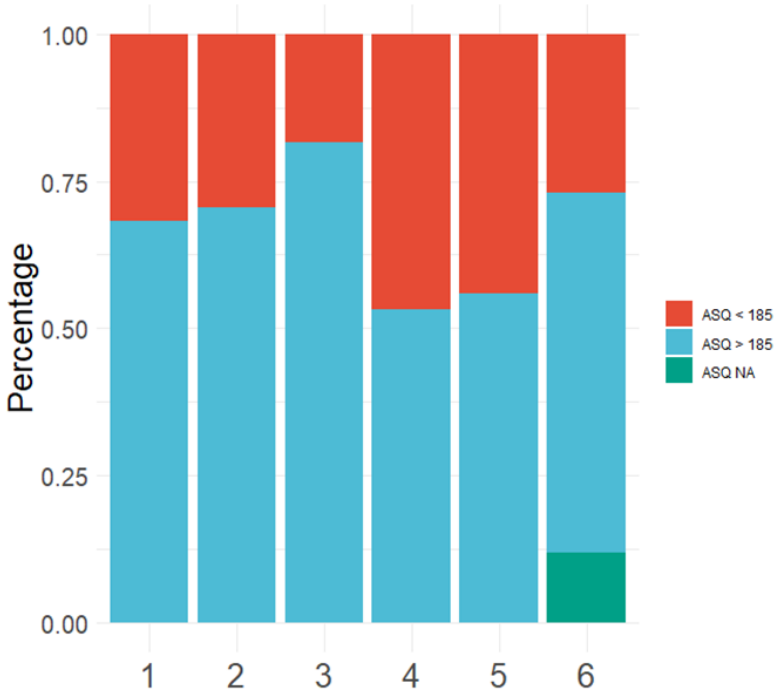
Funding

This work was supported by grants from the French National Agency for Research (ANR) and the Human Nutrition Division of the INRAE (AlimH). The EPIFLORE ancillary study was funded by ANR (ANR-12-BSV3-0025) and the Nestec Research Center (Vers-chez-les-Blanc, Switzerland) for collection of stool samples.

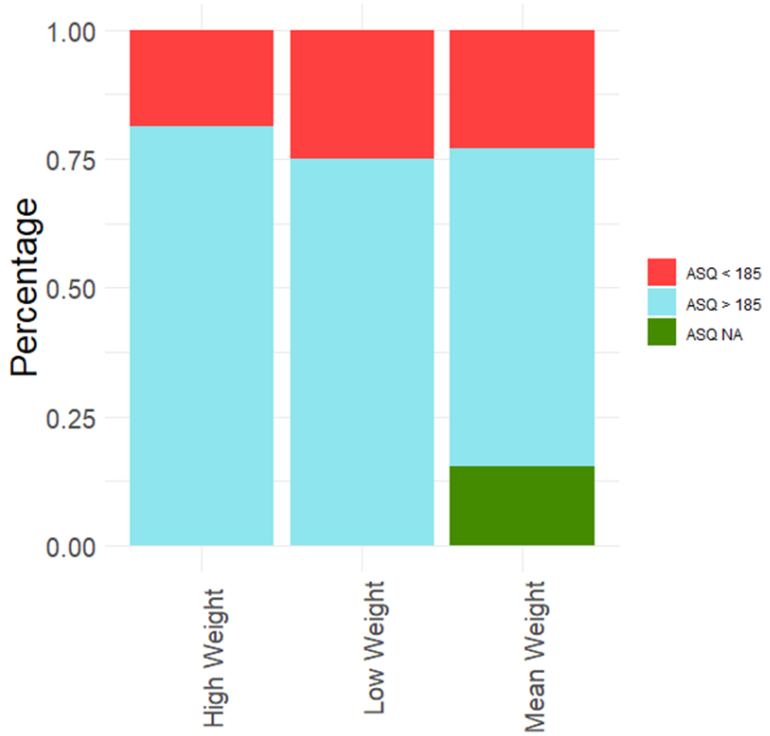
Author's contribution:

Acquisition of data: Patin, Marchand- Martin, Lepage
Analysis, or interpretation of data: Patin
Drafting of the manuscript: Patin, Lepage
Critical revision of the manuscript for important intellectual content: All authors
Statistical analysis: Patin
Obtained funding: Rozé, Ancel, Lepage, Butel.
Administrative, technical, or material support: Monot
Supervision: Lepage

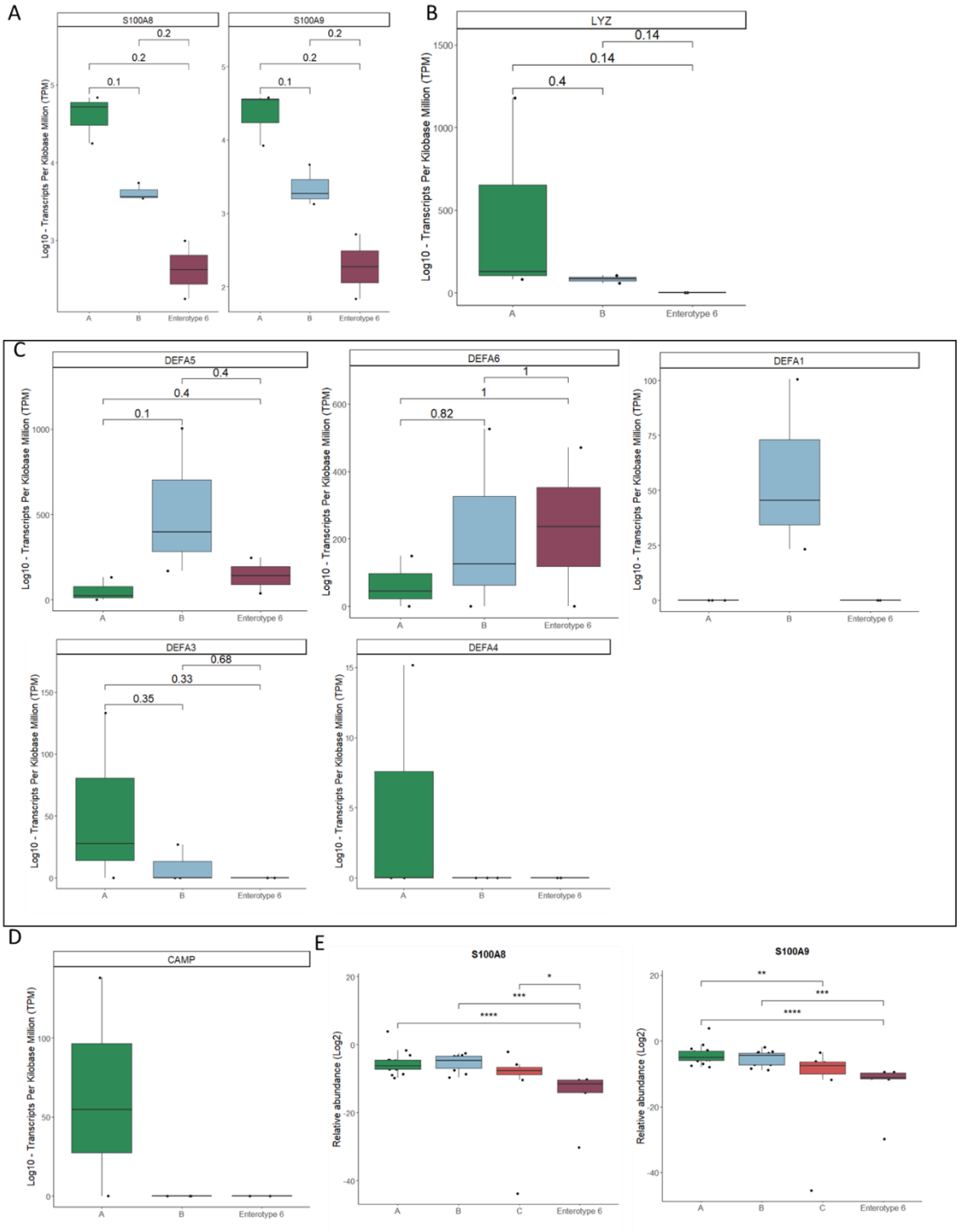
Disclosure statement: No potential conflict of interest was reported by author(s)



Supplementary data 1: On 577 children, the percentage of preterm infants with high ASQ (>185) in blue and low ASQ (<185) in red; Pval = 3.756e-07 with G test

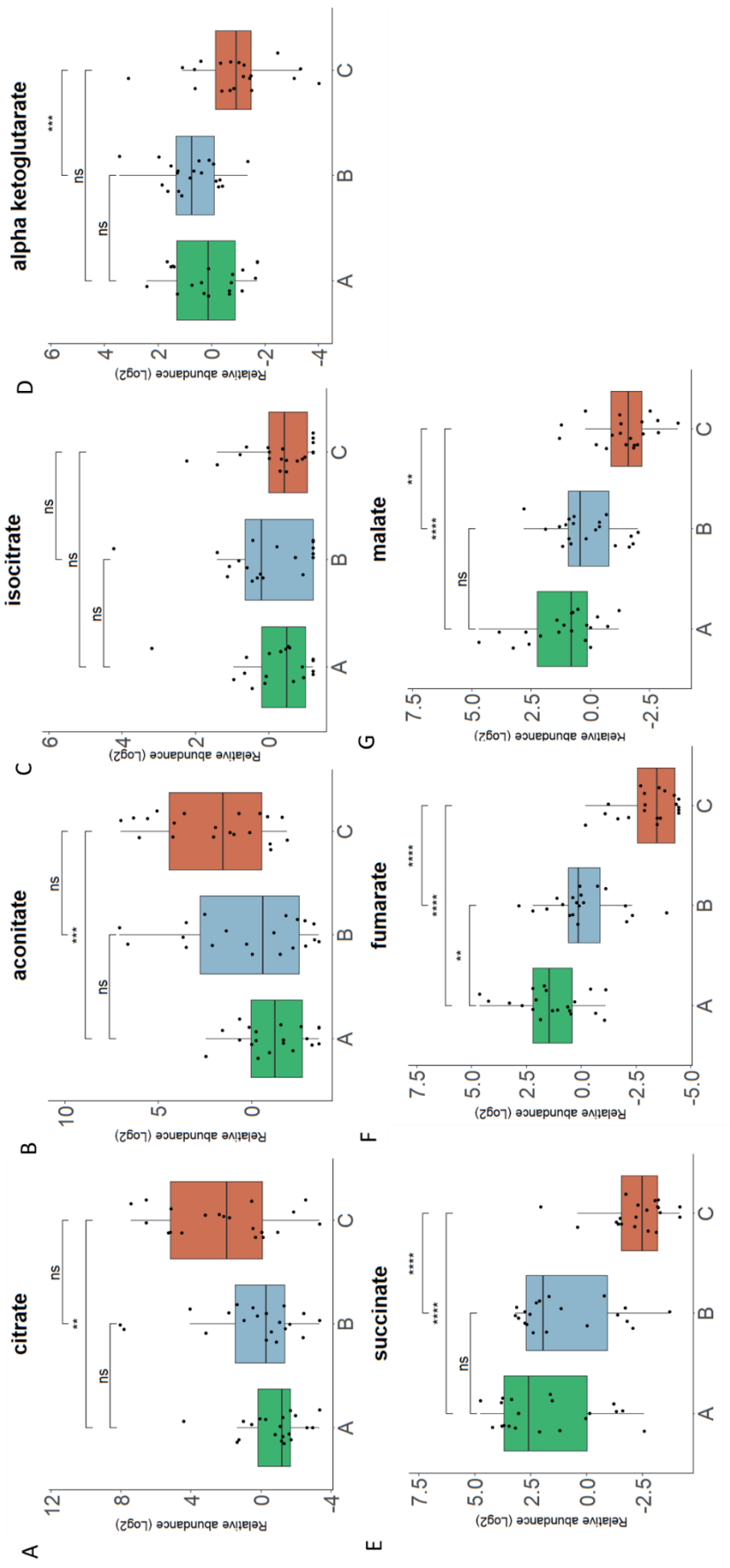


Supplementary data 2: Frequency of preterm infants with high ASQ (> 185) in blue and low ASQ (<185) in red depending on weight at birth. Pval = 0.1147 with G test.



Supplementary data 3: Transcriptomic and RT-qPCR results from feces

A: Log10 Transcripts per kilobase million (TPM) for S100A8 and S100A9 in pools from Clusters A, B and enterotype 6. B: Log10 Transcripts per kilobase million (TPM) for LYZ in pools from Clusters A, B and enterotype 6. C: Log10 Transcripts per kilobase million (TPM) for alpha defensins in pools from Clusters A, B and enterotype 6. D: Log10 Transcripts per kilobase million (TPM) for cathelicidin in pools from Clusters A, B and enterotype 6. E: Log2 Fold change for S100A8 and S100A9.



Supplementary data 4: Relative abundance TCA cycle metabolites: citrate (A), aconitate (B), isocitrate (C), alpha ketoglutarate (D), succinate (E), fumarate (F), malate (G)

Bibliography

1. Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, Bosch AATM, Man WH, Chu MLJN, Arp K, Watson RL, Sanders EAM, Fuentes S, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. Nat Commun 2019 1012019; 10:1–12. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-019-13014-7
2. Moles L, Otaegui D. The Impact of Diet on Microbiota Evolution and Human Health. Is Diet an Adequate Tool for Microbiota Modulation? Nutrients 2020; 12. Available from: /pmc/articles/PMC7352211/
3. Charles MA, Delpierre C, Breánt B. Le concept des origines développementales de la santé - Évolution sur trois décennies. médecine/sciences 2016; 32:15–20. Available from: https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/full_html/2016/01/medsci20163201p15/medsci20163201p15.html
4. Preterm birth. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth
5. Bagein G, Costemalle V, Deroyon T, Hazo J-B, Naouri D, Pesonel E, Vilain A. L'état de santé de la population en France.
6. Short and Long-Term Effects of Preterm Birth | UK Healthcare. Available from: https://ukhealthcare.uky.edu/wellness-community/health-information/short-long-term-effects-preterm-birth
7. Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: Implications for nutrition support. Nutr Clin Pract 2007; 22:159–73.
8. Laforest-Lapointe I, Arrieta MC. Patterns of Early-Life Gut Microbial Colonization during Human Immune Development: An Ecological Perspective. Front Immunol 2017; 8:1. Available from: /pmc/articles/PMC5502328/
9. Martinson JN V., Walk ST. Escherichia coli residency in the gut of healthy human adults. EcoSal Plus 2020; 9. Available from: /pmc/articles/PMC7523338/
10. Senn V, Bassler D, Choudhury R, Scholkmann F, Righini-Grunder F, Vuille-dit-Bile RN, Restin T. Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood—A Comprehensive Review. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10:637.
11. Henderickx JGE, Zwittink RD, Renes IB, Lingen RA van, Zoeren-Grobben D van, Jebbink LJG, Boeren S, Elburg RM van, Knol J, Belzer C. Maturation of the preterm gastrointestinal tract can be defined by host and microbial markers for digestion and barrier defense. Sci Rep 2021; 11. Available from: /pmc/articles/PMC8211855/
12. Aguilar-Lopez M, Dinsmoor AM, Ho TTB, Donovan SM. A systematic review of the factors influencing microbial colonization of the preterm infant gut. Gut Microbes 2021; 13:1–33. Available from: /pmc/articles/PMC8023245/
13. Rozé JC, Ancel PY, Marchand-Martin L, Rousseau C, Montassier E, Monot C, Le Roux K, Butin M, Resche-Rigon M, Aires J, et al. Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices and Preterm Newborn Gut Microbiota and 2-Year Neurodevelopmental Outcomes. JAMA Netw Open 2020; 3:1–14.

14. Seki D, Mayer M, Hausmann B, Pjevac P, Giordano V, Goeral K, Unterasinger L, Klebermaß-Schrehof K, De Paepe K, Van de Wiele T, et al. Aberrant gut-microbiota-immune-brain axis development in premature neonates with brain damage. Cell Host Microbe 2021; 29:1558-1572.e6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.08.004
15. Nichols RG, Davenport ER. The relationship between the gut microbiome and host gene expression: a review. Hum Genet 2021; 140:747. Available from: /pmc/articles/PMC7680557/
16. Lampe JW, Kim E, Levy L, Davidson LA, Goldsby JS, Miles FL, Navarro SL, Randolph TW, Zhao N, Ivanov I, et al. Colonic mucosal and exfoliome transcriptomic profiling and fecal microbiome response to a flaxseed lignan extract intervention in humans. Am J Clin Nutr 2019; 110:377–90. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/ajcn/nqy325
17. Iyengar V, Albaugh GP, Lohani A, Nair PP. Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. FASEB J 1991; 5:2856–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1655550/
18. Sharma AK, Pafčo B, Vlčková K, Červená B, Kreisinger J, Davison S, Beeri K, Fuh T, Leigh SR, Burns MB, et al. Mapping gastrointestinal gene expression patterns in wild primates and humans via fecal RNA-seq. BMC Genomics 2019; 20:1–14. Available from: https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5813-z
19. Ungar B, Yavzori M, Fudim E, Picard O, Kopylov U, Eliakim R, Shouval D, Levin Y, Savidor A, Ben-Moshe S, et al. Host transcriptome signatures in human faecal-washes predict histological remission in patients with IBD. Gut 2022; 71:1988–97. Available from: https://gut.bmj.com/content/71/10/1988
20. Farrés M, Platikanov S, Tsakovski S, Tauler R. Comparison of the variable importance in projection (VIP) and of the selectivity ratio (SR) methods for variable selection and interpretation. J Chemom 2015; 29:528–36.
21. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. 2006; Available from: www.elsevier.com/locate/bbamem
22. Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X, Li C, Shen G, Zou B. NAD+ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. Signal Transduct Target Ther 2020; 5. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7
23. Vaher K, Bogaert D, Richardson H, Boardman JP. Microbiome-gut-brain axis in brain development, cognition and behavior during infancy and early childhood. Dev Rev 2022; 66:101038.
24. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. Clin Exp Allergy 2014; 44:842–50. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24330256/
25. Lu J, Claud EC. Connection between gut microbiome and brain development in preterm infants. Dev Psychobiol2019; 61:739. Available from: /pmc/articles/PMC6728148/
26. Lu J, Lu L, Yu Y, Oliphant K, Drobyshevsky A, Claud EC. Early preterm infant microbiome impacts adult learning. Sci Reports 2022 121 2022; 12:1–14. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-022-07245-w

27. Xia J, Claud EC. Gut Microbiome–Brain Axis as an Explanation for the Risk of Poor Neurodevelopment Outcome in Preterm Infants with Necrotizing Enterocolitis. Microorg 2023, Vol 11, Page 1035 2023; 11:1035. Available from: https://www.mdpi.com/2076-2607/11/4/1035/htm
28. Guo S, Huang K, Liu R, Sun J, Yin C. Regulation of Gut Microbiota through Breast Milk Feeding Benefits Language and Cognitive Development of Preterm Toddlers. Microorganisms 2023; 11. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37110289/
29. Casavant SG, Chen J, Xu W, Lainwala S, Matson A, Chen MH, Starkweather A, Maas K, Cong XS. Multi-Omics Analysis on Neurodevelopment in Preterm Neonates: A Protocol Paper. Nurs Res 2021; 70:462. Available from: /pmc/articles/PMC8563389/
30. Drell T, Lutsar I, Štšepetova J, Parm Ü, Metsvaht T, Ilmoja ML, Simm J, Sepp E. The development of gut microbiota in critically ill extremely low birth weight infants assessed with 16S rRNA gene based sequencing. Gut Microbes 2014; 5:304–503.
31. Yang Y, Yu P, Lu Y, Gao C, Correspondence QS, Sun Q. Disturbed rhythmicity of intestinal hydrogen peroxide alters gut microbial oscillations in BMAL1-deficient monkeys. 2023; Available from: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112183
32. Burgueño JF, Fritsch J, Santander AM, Brito N, Fernández I, Pignac-Kobinger J, Conner GE, Abreu MT. Intestinal Epithelial Cells Respond to Chronic Inflammation and Dysbiosis by Synthesizing H2O2. Front Physiol 2019; 10:499981.
33. Stuivenberg GA, Burton JP, Bron PA, Reid G. Why Are Bifidobacteria Important for Infants? Microorganisms 2022; 10. Available from: /pmc/articles/PMC8880231/
34. Lee JKF, Tan LTH, Ramadas A, Mutalib NSA, Lee LH. Exploring the Role of Gut Bacteria in Health and Disease in Preterm Neonates. Int J Environ Res Public Health 2020; 17:1–18. Available from: /pmc/articles/PMC7579082/
35. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nat Rev Microbiol 2011 95 2011; 9:356–68. Available from: https://www.nature.com/articles/nrmicro2546
36. Frazer LC, Good M. Intestinal epithelium in early life. Mucosal Immunol 2022 2022; :1–7. Available from: https://www.nature.com/articles/s41385-022-00579-8
37. Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Liu J, Zhang J, Sheng X. Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months. PLoS One 2015; 10:119574. Available from: /pmc/articles/PMC4351193/
38. Łoniewska B, Adamek K, Węgrzyn D, Kaczmarczyk M, Skonieczna-żydecka K, Clark J, Adler G, Tousty J, Uzar I, Tousty P, et al. Analysis of Faecal Zonulin and Calprotectin Concentrations in Healthy Children During the First Two Years of Life. An Observational Prospective Cohort Study. J Clin Med 2020; 9:777. Available from: /pmc/articles/PMC7141325/
39. Rougé C, Butel MJ, Piloquet H, Ferraris L, Legrand A, Vodovar M, Voyer M, de la Cochetiére MF, Darmaun D, Rozé JC. Fecal Calprotectin Excretion in Preterm Infants during the Neonatal Period. PLoS One 2010; 5. Available from: /pmc/articles/PMC2884033/
40. Ren Z, Xu Y, Li T, Sun W, Tang Z, Wang Y, Zhou K, Li J, Ding Q, Liang K, et al. NAD+ and its possible role in gut microbiota: Insights on the mechanisms by which gut microbes influence host metabolism. Anim Nutr 2022; 10:360. Available from: /pmc/articles/PMC9356074/

41. Sharma A, Chabloz S, Lapides RA, Roider E, Ewald CY. Potential Synergistic Supplementation of NAD+ Promoting Compounds as a Strategy for Increasing Healthspan. Nutr 2023, Vol 15, Page 445 2023; 15:445. Available from: https://www.mdpi.com/2072-6643/15/2/445/htm
42. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digestor as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. Appl Environ Microbiol 1997; 63:2802–13.
43. Yan LL, Huang YJ, Yi X, Yan XM, Cai Y, He Q, Han ZJ. Effects of silencing S100A8 and S100A9 with small interfering RNA on the migration of CNE1 nasopharyngeal carcinoma cells. Oncol Lett 2015; 9:2534. Available from: /pmc/articles/PMC4473371/
44. Cathelicidin (CAMP) Human qPCR Primer Pair (NM_004345) – HP207673 | OriGene . Available from: https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp207673/cathelicidin-camp-human-qpcr-primer-pair-nm_004345
45. Visfatin (NAMPT) Human qPCR Primer Pair (NM_005746) – HP208829 | OriGene. Available from: https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp208829/visfatin-nampt-human-qpcr-primer-pair-nm_005746
46. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 2018; 34:1287–94. Available from: https://academic.oup.com/bioinformatics/article/34/8/1287/4708232
47. McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One 2013; 8.
48. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nucleic Acids Res 2018; 46:W486–94.
49. Yu G, Xu C, Zhang D, Ju F, Ni Y. MetOrigin: Discriminating the origins of microbial metabolites for integrative analysis of the gut microbiome and metabolome. iMeta 2022; 1:1–13.
50. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 2018; 34:i884–90.
51. Dobin A, Gingeras TR. Mapping RNA-seq Reads with STAR. Available from: https://www.encodeproject.org/files/ENCFF001RFH/@@download/
52. Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics 2011; 12:1–16. Available from: https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-12-323
53. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. Genome Res 2003; 13:2498. Available from: /pmc/articles/PMC403769/
54. Analyzing RNA-seq data with DESeq2 . Available from: http://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html

3. Discussion / conclusion

Cette étude montre qu'un microbiote de grands prématuré âgé d'un mois, dominé soit par *Escherichia*, soit par *Staphylococcus*, présente une association plus marquée avec l'âge gestationnel, le poids à la naissance et un impact plus important sur les métabolites et l'expression de l'hôte.

Un microbiote dominé par *Escherichia* était considéré comme plus mature en raison de sa plus grande abondance chez les nourrissons ayant un âge gestationnel et un poids de naissance plus élevés, et pourrait avoir des effets bénéfiques sur le développement neurocognitif global à 2 ans, la diversité bactérienne, le métabolisme du cycle de l'acide citrique et l'immunité primaire de l'hôte.

En revanche, *Staphylococcus* est plus présent chez les nourrissons ayant un faible âge gestationnel et un faible poids à la naissance, et pourrait être associé à un métabolisme du cycle de l'acide tricarboxylique perturbé, une expression plus faible de l'immunité de l'hôte, et un moins bon développement neurocognitif global à 2 ans.

Ces résultats mettent en évidence l'impact de certaines conditions de naissance sur le microbiote intestinal à un mois, ainsi que l'intérêt de se pencher sur le métabolisme différencié de ces enfants. Nous avons également pu constater et confirmer que les analyses non invasives des fèces fournissent des informations précieuses sur les grands prématurés concernant la composition microbienne, la fonctionnalité de ces microorganismes, et l'expression de l'hôte. Avec plus de recherche, certains métabolites pourraient servir de biomarqueurs pour la détection d'un mauvais développement neurocognitif.

CHAPITRE 4 :
Impact de la composition du microbiote intestinal sur les grandes voies métaboliques microbiennes chez les grands-prématurés âgés d'un mois

1. Introduction

L'objectif de ce chapitre consiste à préciser les variations des voies métaboliques au sein du microbiote intestinal des enfants prématurés, âgés d'un mois et à déterminer des profils métaboliques spécifiquement associés aux différents clusters. L'intention principale était d'identifier des hypothèses à explorer concernant la maturité du tractus digestif et son métabolisme.

Les fèces contiennent des métabolites issus de divers processus métaboliques du microbiote intestinal. L'étude de ces métabolites dans les fèces des grands prématurés pourrait permettre de mieux comprendre le développement intestinal à un stade précoce de la vie ainsi que le rôle du microbiote intestinal dans le métabolisme des nourrissons prématurés et son impact sur leur santé. Les métabolites présents dans les fèces peuvent fournir des informations sur l'absorption des nutriments chez les grands prématurés, ce qui peut aider à identifier des carences nutritionnelles spécifiques. Certains de ces métabolites pourraient servir de marqueurs potentiels pour évaluer la santé des enfants nés grands prématurés et leur développement. Nous avons démontré un métabolisme différent pour le cycle du TCA entre les clusters [Patin *et* al *in review ;* Chapitre 3]. Dans ce chapitre, nous voulons analyser d'autres voies métaboliques bactériennes.

2. Résultats

Les profils de métabolites d'échantillons fécaux de nourrissons ont été analysés par spectrométrie de masse par chromatographie en phase liquide (LC-MS). Cette analyse a détecté 1040 molécules dans les fèces des enfants grands prématurés et 856 métabolites étaient des composés connus. Presque la moitié des métabolites détectés dans les fèces des enfants grands prématurés de la cohorte étaient liés au métabolisme des lipides (48%). Les métabolites des acides aminés (23%), des xénobiotiques (8%), des nucléotides (5%), des cofacteurs et des vitamines (5%), des peptides (3%), des carbohydrates (3%) et de l'énergie (2%) étaient également retrouvés. Des molécules partiellement caractérisées (3%) étaient également détectées **(Figure 28)**. Pour déterminer quels métabolites pourraient être utiles pour suivre le métabolisme bactérien dans l'intestin du nourrisson nés grands prématurés, nous avons examiné ceux impliqués dans les grandes voies bactériennes. En général, les lipides comme le métabolisme des acides biliaires secondaires ou de la voie de la carnitine, les métabolites des acides aminés comme le tryptophane ou l'histamine et le p-crésol dans le métabolisme des xénobiotiques sont des métabolismes bactériens importants. Nous n'avons pas détecté d'AGCC dans cette analyse.

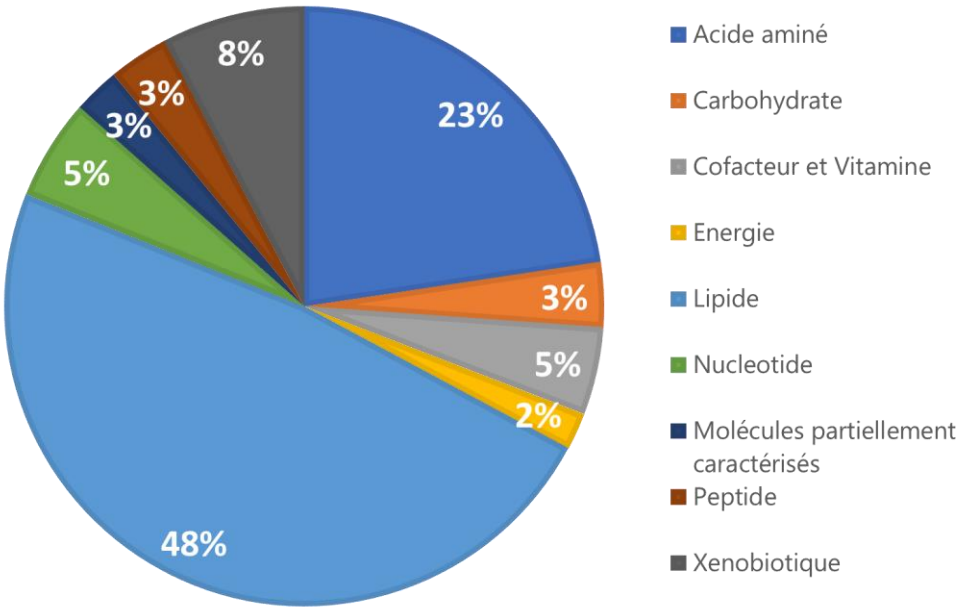


Figure 28 : Pourcentage de métabolites détectés dans les fèces des enfants grands-prématurés de la cohorte

Variation de la dégradation de la carnitine en triméthylamine-N-oxyde en fonction de la composition du microbiote intestinal chez les grands prématurés âgés d'un mois

La carnitine est un acide aminé synthétisé à partir de lysine et de méthionine. La forme active de la carnitine est connue sous le nom de L-carnitine, tandis que la D-carnitine est biologiquement inactive. La carnitine joue un rôle essentiel dans le transfert des acides gras à longue chaîne du cytosol vers les mitochondries, où ils subissent une β-oxydation pour produire de l'ATP [192]. Une carence en carnitine entraîne une diminution de la production d'ATP à partir des acides gras [193]. Les nourrissons et en particulier les prématurés naissent avec de faibles réserves en carnitine pouvant entraîner un dysfonctionnement mitochondrial. Le lait maternel devient alors la principale source de carnitine , et celle-ci est maintenant ajoutée aux préparations de lait maternisé à base de lait de soja par exemple [194,195]. La carnitine est absente de la nutrition parentérale totale [196]. Cependant, les principales études se basent sur la concentration en carnitine sérique et non fécale. Nous souhaitons donc évaluer s'il est possible de discerner des différences dans les échantillons de fèces. Le manque de carnitine en début de vie va affecter le métabolisme des lipides des nourrissons au cours des quatre premiers mois de la vie [194]. La principale voie d'absorption de la carnitine l'entérocyte par le biais d'un transporteur passif, l'OCTN2 (Organic Cation Transporter Novel Type 2), tandis qu'une partie est transformée par le microbiote en triméthylamine (TMA), qui est ensuite oxydé en triméthylamine-N-oxyde (TMAO) [197,198] **(Figure 29)**. Dans notre cohorte, nous avons observé la présence de carnitine et de TMAO dans les fèces. Il est important de noter que la synthèse de la carnitine n'est démontrée chez aucune bactérie [198].

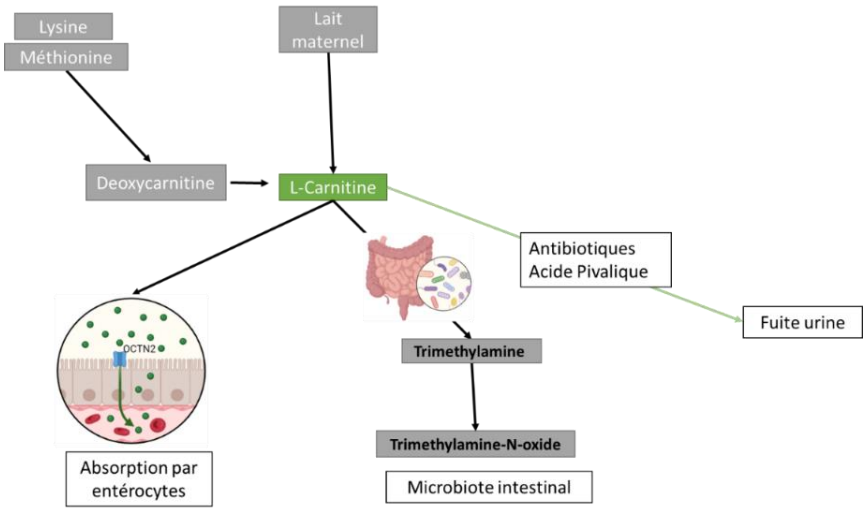


Figure 29 : Métabolisme simplifié de la voie de la carnitine

Nos données de métabolomique globale indiquent une plus faible quantité de carnitine fécale chez les enfants appartenant au Cluster A (enrichi en *Escherichia*) par rapport à ceux des Clusters B (enrichi en *Clostridium/Klebsiella/Enterobacter* ; p=0.00014) et C (enrichi en *Staphylococcus* ; p=0.00018) **(Figure 30A)**. L'âge gestationnel, l'allaitement, l'alimentation au lait maternel, la supplémentation en protéine ou l'intubation n'induisait pas de différences dans l'abondance de la carnitine fécale. L'expression du gène SLC22A5 (OCTN2) évaluée en transcriptomique ne différait pas de manière significative entre les Clusters A, B et C6. Cependant, plus l'âge gestationnel augmente, plus la différence de la quantité de carnitine était importante entre les clusters. Les grands prématurés aux âges gestationnels 2 et 3 des Clusters B et C présentaient en effet une plus grande quantité de carnitine que ceux du Cluster A (AGN2 : p=0.0085 et p=0.014 ; AGN3 : p=0.018 et p=0.0091 respectivement) **(Figure 30B)**.

D'autre part, il existait une corrélation négative entre la quantité de carnitine et celle de TMAO (r=-0.34, p=0.0071) **(Figure 30C)**, cette dernière étant détectée plus abondamment dans le Cluster A par rapport aux Clusters B et C ($p=7.6E10^{-6}$ et $p=5.8E10^{-11}$ respectivement) **(Figure 30D)**. Les grands-prématurés du Cluster A, quel que soit leur âge gestationnel, avaient une plus grande quantité de carnitine que ceux des Clusters B et C (AGN1 : p=0.057et p=0.007 ; AGN2 : p=0.014 et p=0.00062 ; AGN3 : p=0.0008 et p=0.0091 respectivement) **(Figure 30E)**. De plus, les corrélations entre les genres bactériens des clusters et le métabolisme de la carnitine montrent une corrélation positive forte entre *Escherichia* et la deoxycarnitine (un précurseur de la carnitine) (r=0.5, $p=5.3^{e}$-05) et le TMAO (r=0.5, p=0.0002) ainsi qu'une corrélation négative avec la carnitine (r=-0.6, p=0.002). À l'inverse, *Staphylococcus* et *Enterococcus* sont corrélés négativement avec le TMAO (r=-0.4, p= 0.09 et r=-0.2, p=0.07) **(Figure 30F)**.

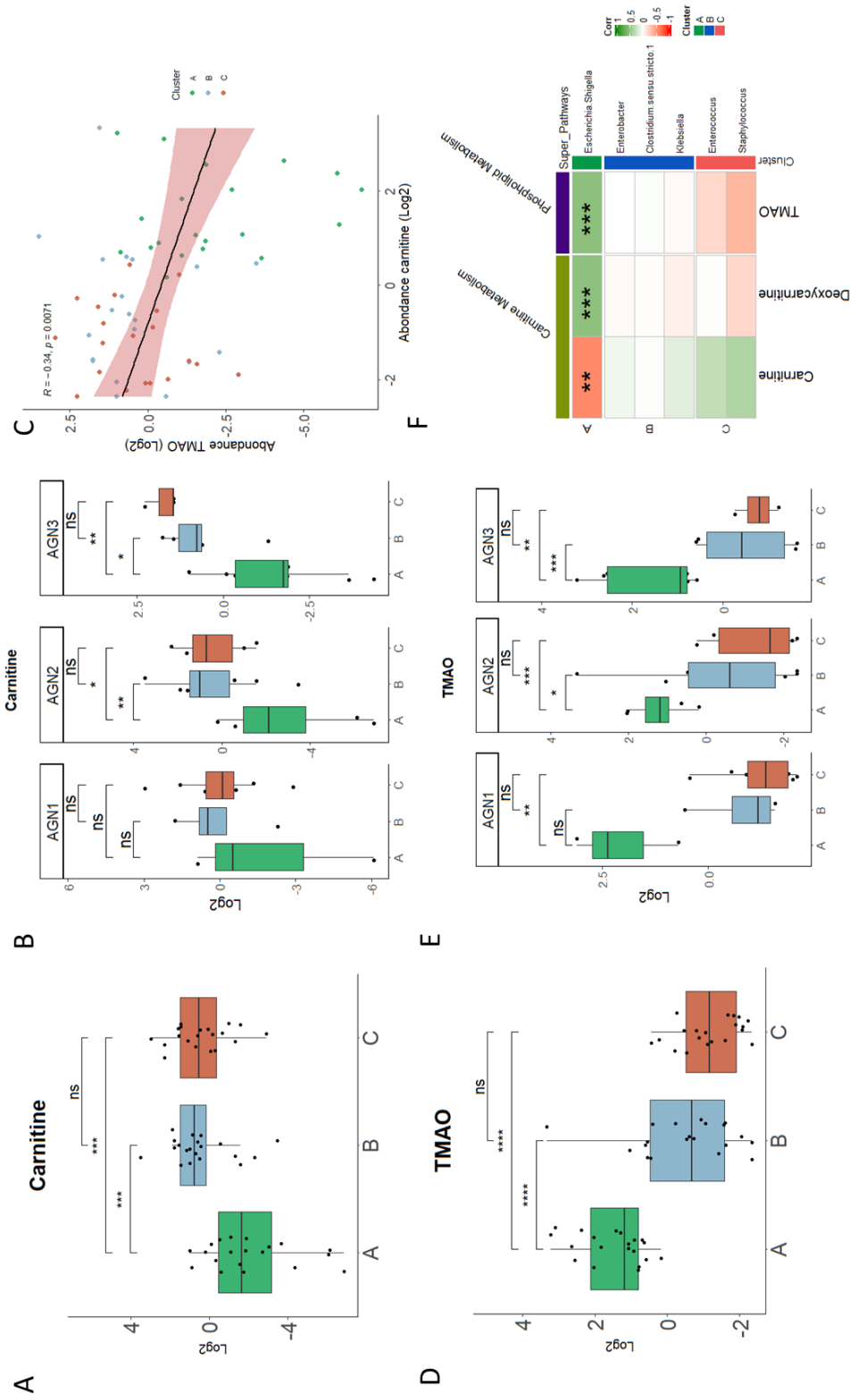


Figure 30 : Métabolisme de la carnitine dans les fèces d'enfants grands-prématurés

A/ Abondance de la carnitine (log2) dans chaque cluster. B/ Abondance de la carnitine (log2) fonction de l'âge gestationnel par clusters. C/ Corrélations de Spearman entre l'abondance de TMAO et de la carnitine. D/ Abondance de TMAO (log2) dans chaque cluster. E/ Abondance de TMAO (log2) en fonction de l'âge gestationnel par clusters. F/ Corrélations de Spearman entre les genres bactériens et les métabolites de la carnitine.

Variation du métabolisme de l'histamine en fonction de l'enzyme histidine décarboxylase dans le microbiote intestinal des grands prématurés âgés d'un mois

L'histamine est une amine biogène synthétisée à partir de l'histidine par l'enzyme histidine décarboxylase (HDC). Dans le tractus gastro-intestinal, l'histamine a un impact sur plusieurs fonctions principales : la modulation de la motilité gastro-intestinale, l'amélioration de la production d'acide gastrique, la sécrétion de mucus, la neurotransmission via l'immunomodulation et est essentielle pour la sécrétion d'acide gastrique [199]. L'histamine peut être métabolisée par une grande quantité de types cellulaires comme les cellules entérochromaffine, les neurones histaminergiques ou encore les lymphocytes T [200]. Cependant, certains microorganismes peuvent également exprimer l'enzyme HDC et il a été mis en évidence que l'histamine des microorganismes pourrait avoir des effets immunorégulateurs [200]. Il existe deux grandes familles de HDC : celles dépendantes du phosphate de pyridoxal (PLP) retrouvées chez les organismes eucaryotes, mais également chez les bactéries à Gram négatif et celles dépendantes du pyruvate retrouvées chez les bactéries à Gram positif [201,202] **(Figure 31)**. Le PLP peut être formé à partir de la vitamine B6 (pyridoxine, pyridoxamine) [203]. Les études sur l'histamine exogène se sont surtout concentrées sur les intoxications d'origine alimentaire (poisson ou produit laitier) pouvant entre autres provoquer des troubles neurologiques. L'histamine va agir sur les cellules neuronales dès les premières périodes de développement [204]. Par exemple, l'histamine peut augmenter la prolifération de cellules souches neuronales (NSC) de rongeurs pendant les périodes embryonnaires et postnatales et augmenter la différenciation des NSC fœtaux en neurones glutamatergiques. Elle peut également moduler la maturation neuronale dendritique et axonale. En effet, c'est un neuromodulateur actif dans le cerveau en développement agissant sur de nombreuses cellules et structures en développement, ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle important dans le développement du cerveau. De plus, chez l'Homme, elle joue un rôle fonctionnel dans la modulation de nombreux aspects du comportement, notamment l'apprentissage, la cognition, l'éveil, l'attention et la mémoire [204]. Un grand nombre d'études démontre l'implication de la dérégulation de l'histamine dans les troubles comme les troubles du spectre autistique ou encore le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (TDAH) via le récepteur H3 notamment [204].

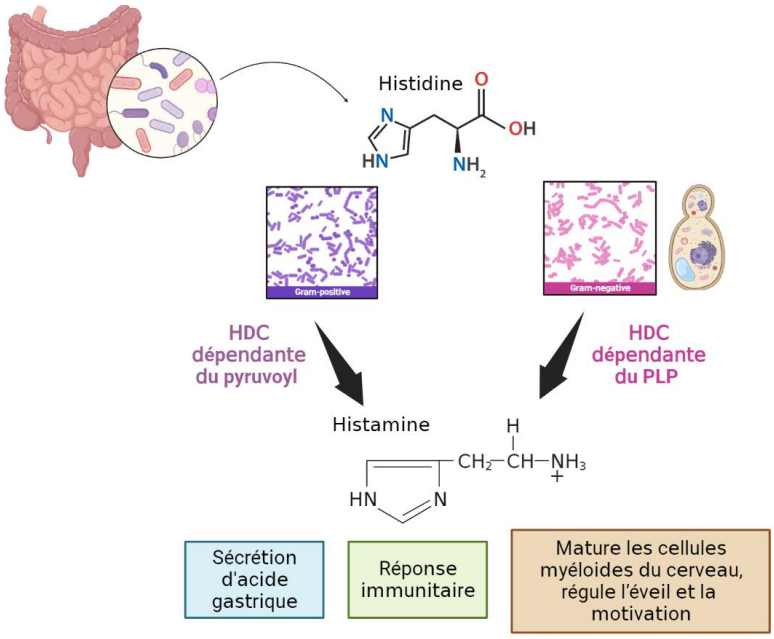


Figure 31 : Métabolisme simplifié du catabolisme de l'histidine en histamine

En appliquant la méthode de clustering non hiérarchique des k-means, sur les corrélations entre les métabolites de l'histidine et les genres bactériens majoritaires ainsi que certains facteurs périnataux (poids, âge, ASQ) nous avons identifié deux groupes distincts. Le premier groupe contenait une plus grande quantité de corrélations négatives entre N-actetylamine, imidazole lactate, histamine et trans-urocanate avec *Staphylococcus* et *Enterococcus* tandis que ces métabolites étaient retrouvés corrélés positivement dans le second groupe avec les autres genres bactériens et les facteurs périnataux étudiés. Cependant, l'intégralité de ces corrélations n'était pas significative. *Escherichia* était corrélé positivement avec l'histamine (r=0.4, p=0.03) et l'imidazole lactate (r=0.45, p=0.005). L'indice de Shannon était corrélé positivement avec le N-acetylhistamine et le trans-urocanate (r=0.40, p=0.03 et r=0.37, p=0.04). Le 1-ribosyl-imidazole-acetate semblait présenter une tendance à une corrélation négative avec une grande partie des variables liées à l'ASQ : motricité fine (r=-0.19, p=0.007), résolution de problème (r=-0.13, p=0.04), sociabilité (r=-0.24, p=0.01) et avec le score d'ASQ final (r=-0.18, p=0.02) **(Figure 32A)**.

Nous n'avons pas retrouvé de différences d'abondance de l'histidine entre les clusters, mais nous avons retrouvé une corrélation positive entre l'abondance d'histidine et d'histamine (r=0.27, p=0.041) **(Figure 32B)**. Les enfants du Cluster C présentaient des quantités plus faibles d'histamine que ceux des Clusters A et B ($p=1.6E10^{-5}$ et p=0.006 respectivement) et pour le Cluster A par rapport au Cluster B (p=0.027) **(Figure 32C)**. Au sein des entérotypes, les enfants

de l'entérotype 3 (enrichi en *Escherichia*) avaient une quantité plus importante d'histamine que les enfants des entérotypes 4 (enrichi en *Enterococcus*) et 5 (enrichi en *Staphylococcus*) (p=0.001 et p=0.0004). De plus, les enfants de l'entérotype 1 (*Klebsiella*/*Enterobacter*) avaient une quantité plus importante en histamine que ceux de l'entérotype 5 (p=0.0053) **(Figure 32D)**. La pyridoxamine était retrouvée en abondance relative plus faible chez les enfants du Cluster C que chez les enfants des Clusters A et B ($p=4.3E10^{-7}$ et $p=1.8E10^{-7}$ respectivement) **(Figure 32E)**. *Staphylococcus* et *Enterococcus* étaient corrélés négativement avec la pyridoxamine (r=-0.6, $p=4.5E10^{-7}$ et r=-0.27, p=0.037 respectivement) **(Figure 32F-G)** et *Escherichia* et *Enterobacter* (r=0.39, p= 0.0042 et r=0.58, $p=1.9E10^{-6}$ respectivement) **(Figure 32H-I)**. Le pyruvate, cofacteur de l'enzyme HDC des bactéries à Gram positif n'était pas retrouvé en abondance différente entre les clusters.

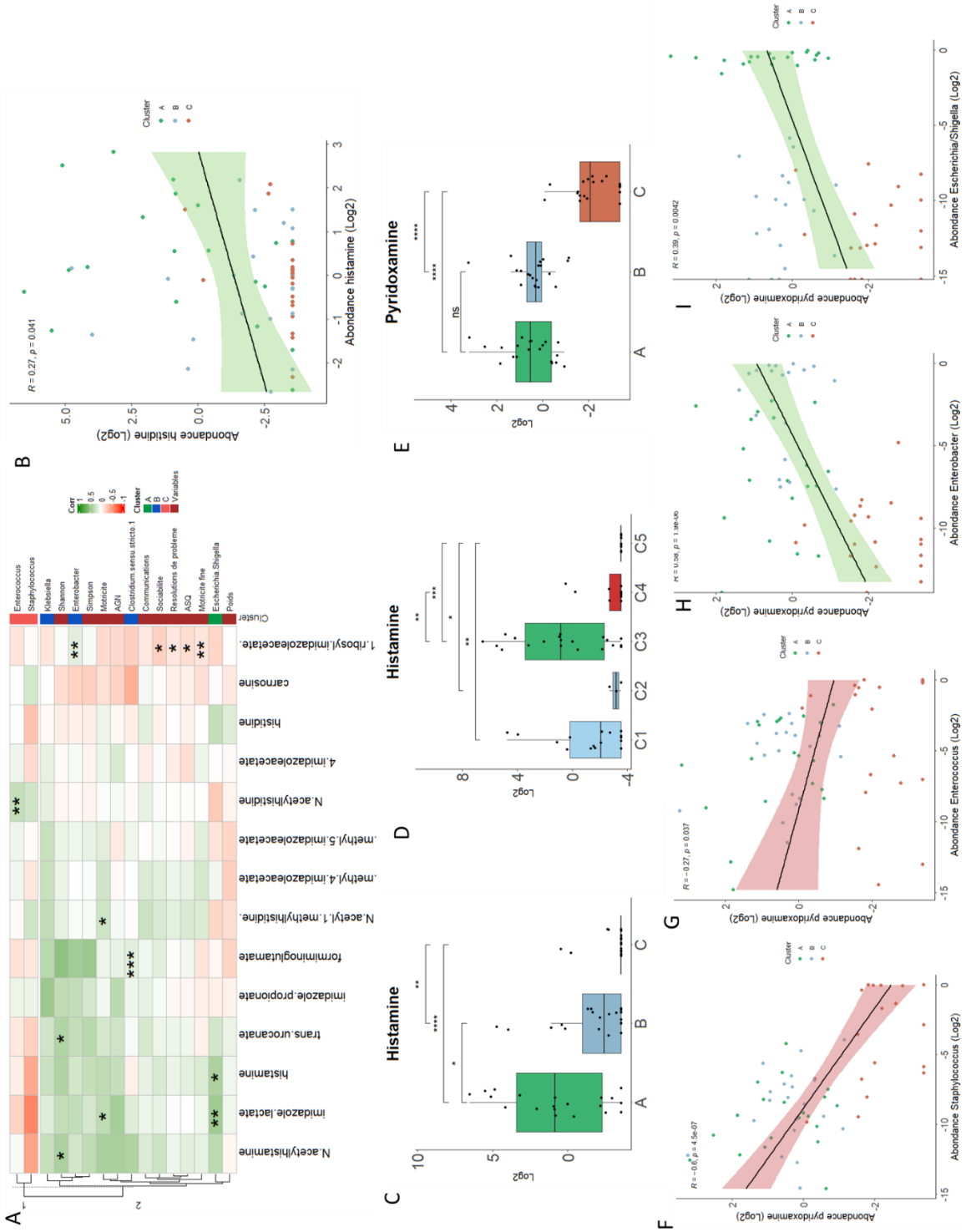


Figure 32 : Métabolisme de l'histidine dans les fèces d'enfants grands-prématurés

A/ Corrélations de Spearman entre les genres bactériens/variables périnatales et les métabolites de l'histidine. B/ Corrélations de Spearman entre l'abondance de l'histidine et de l'histamine. C/ Abondance d'histamine (log2) dans chaque cluster. D/ Abondance de l'histamine (log2) dans chaque entérotype. E/ Abondance de pyridoxamine (log2) par clusters. F/ Corrélations de Spearman entre l'abondance de Staphylococcus et de la pyridoxamine. G/ Corrélations de Spearman entre l'abondance de Enterococcus et de la pyridoxamine. H/ Corrélations de Spearman entre l'abondance d'Enterobacter et de la pyridoxamine. I/ Corrélations de Spearman entre l'abondance de Escherichia et de la pyridoxamine.

Le p-crésol est plus abondant dans le microbiote intestinal enrichi en *Clostridium* des grands prématurés âgés d'un mois

À partir de la tyrosine, les cellules de l'hôte ou certaines bactéries du microbiote intestinal, dont *Clostridium,* peuvent produire du p-crésol [205] **(Figure 33)**. Une augmentation du p-crésol peut altérer la barrière intestinale et la fonction mitochondriale [206,207]. Le p-crésol a été associé avec les troubles du spectre autistique (TSA) [207,208]. Il est en effet retrouvé en plus grande abondance dans les fèces des enfants avec un TSA. Le p-crésol active de manière significative le renouvellement de la dopamine dans les régions du cerveau chez des souris modèles des TSA [209].

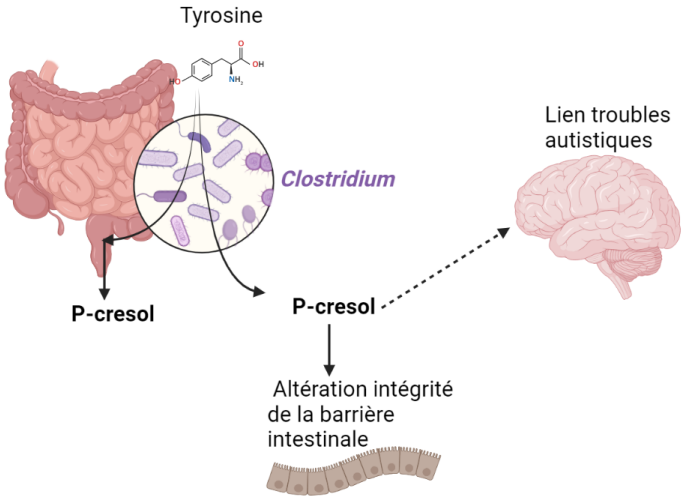
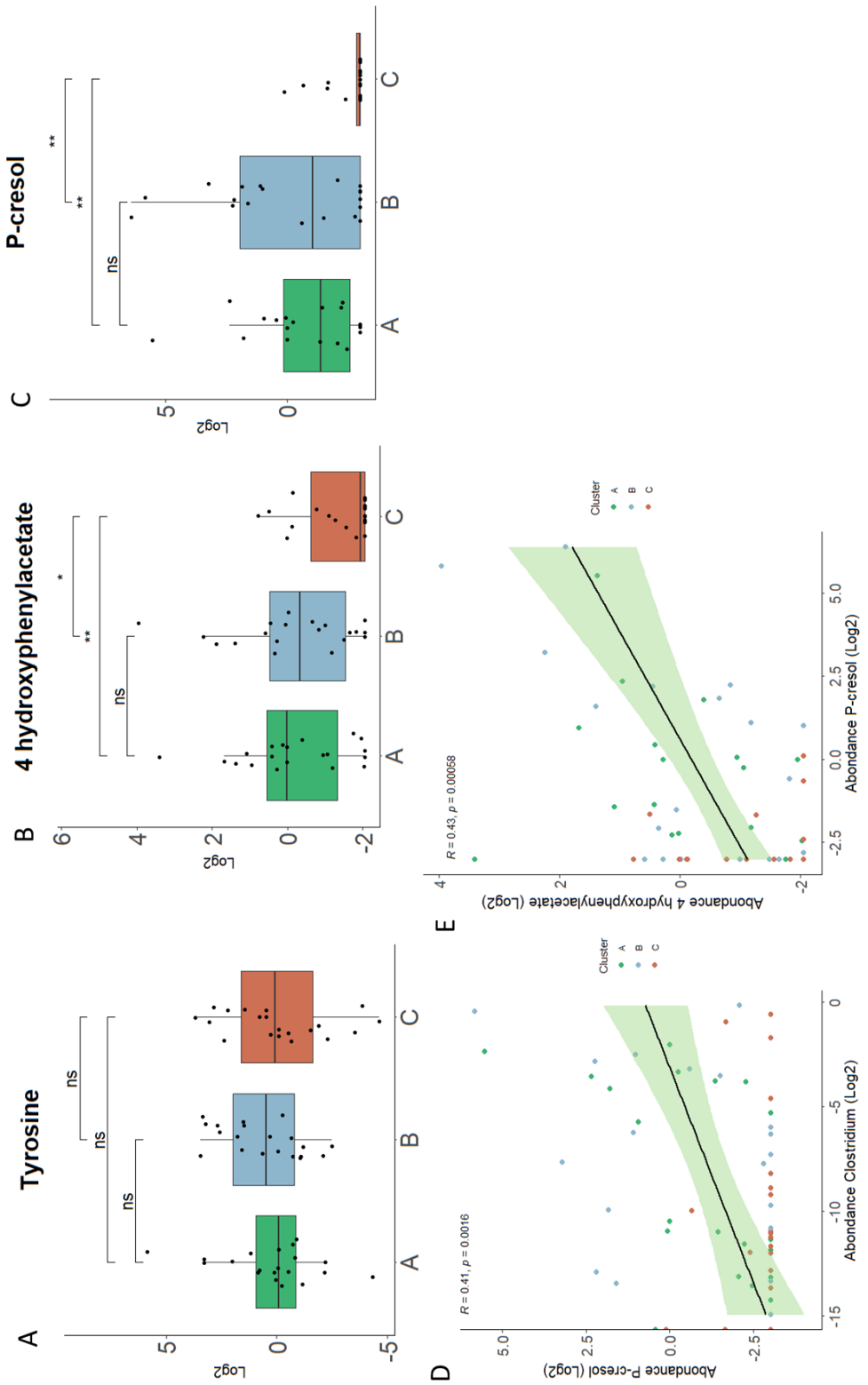


Figure 33 : Métabolisme simplifié du p-crésol

Aucune différence dans la quantité de tyrosine entre chaque cluster n'était détectée **(Figure 34A)** mais une plus grande quantité de 4-hydroxyphenylacetate (métabolite de la voie du p-crésol) dans les Clusters A et B par rapport au Cluster C (p=0.0045 et p=0.011 respectivement) était retrouvée **(Figure 34B)**. Le p-crésol était moins abondant chez les enfants des Clusters A et B que chez ceux du Cluster C (p=0.0012, p=0.0031 respectivement) **(Figure 34C)**. Il était également corrélé positivement avec *Clostridium* (r=0.41, p=0.0016) **(Figure 34D),** mais pas avec les autres genres bactériens majoritaires. Le 4-hydroxyphenylacetate était corrélé positivement avec le p-crésol (r=0.43, p=0.00058) **(Figure 34E)**, mais pas avec *Clostridium*. Aucune corrélation n'était retrouvée entre le p-crésol et l'ASQ.



<u>Figure 34</u> : Métabolisme de la tyrosine et du p-crésol dans les fèces d'enfants grands-prématurés

A/ Abondance de la tyrosine (log2) dans chaque cluster.
B/ Abondance de la 4-hydroxyphenylacetate (log2) dans chaque cluster.
C/ Abondance de la p-crésol (log2) dans chaque cluster.
D/ Corrélation de Spearman entre l'abondance de Clostridium et p-crésol.
E/ Corrélation de Spearman entre l'abondance de 4-hydroxyphenylacetate et p-crésol.

Altération de l'absorption des vitamines et des lipides par une réduction de l'activité des acides biliaires chez les grands prématurés nés précocement et présentant un microbiote enrichi en *Staphylococcus* à un mois de vie

Les acides biliaires primaires sont des composés chimiques dérivés du cholestérol et sont produits par le foie. Ils sont sécrétés dans l'intestin pour faciliter la digestion et l'absorption des lipides [210]. Une fois dans l'intestin, les acides biliaires primaires peuvent être transformés par les bactéries présentes dans le microbiote intestinal en acides biliaires secondaires [211]. Ils peuvent également contribuer à la régulation de l'absorption des vitamines liposolubles, comme les vitamines A, D, E et K [212] **(Figure 35)**. Elles peuvent se lier aux acides biliaires pour être transportées à travers la muqueuse intestinale et rejoindre la circulation sanguine. Sans acides biliaires, l'absorption des vitamines liposolubles serait compromise, ce qui pourrait entraîner des carences vitaminiques.

Les lipides mal absorbés dans l'iléon distal des prématurés sont corrélés à une excrétion accrue d'acides biliaires dans les fèces [213]. Chez les enfants prématurés, les réserves d'acides biliaires sont réduites, provoquant une mauvaise absorption des vitamines A, D, E et K et des lipides [214]. La voie métabolique microbienne la plus enrichie dans les échantillons de fèces des nouveau-nés les plus matures (32 à 40 semaines de gestation) par rapport aux nouveau-nés les moins matures (25 à 28 semaines de gestation) était la biosynthèse secondaire des acides biliaires [214]. *Clostridium perfringens* est retrouvé moins abondante dans une cohorte d'enfants prématurés présentant une cholestase (diminution ou obstruction du flux d'acides biliaires du foie vers l'intestin) en comparaison avec des enfants prématurés sans cholestase. Cette bactérie possède un gène *bsh* (bile salt hydrolase) qui permet la formation d'acides biliaires secondaires. La plupart des nourrissons nés à terme en bonne santé sont capables de déconjuguer les acides biliaires à l'âge d'un mois de vie [215]. La taurine joue un rôle important dans l'absorption des graisses. Sa conjugaison à l'acide biliaire améliore l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles [214].

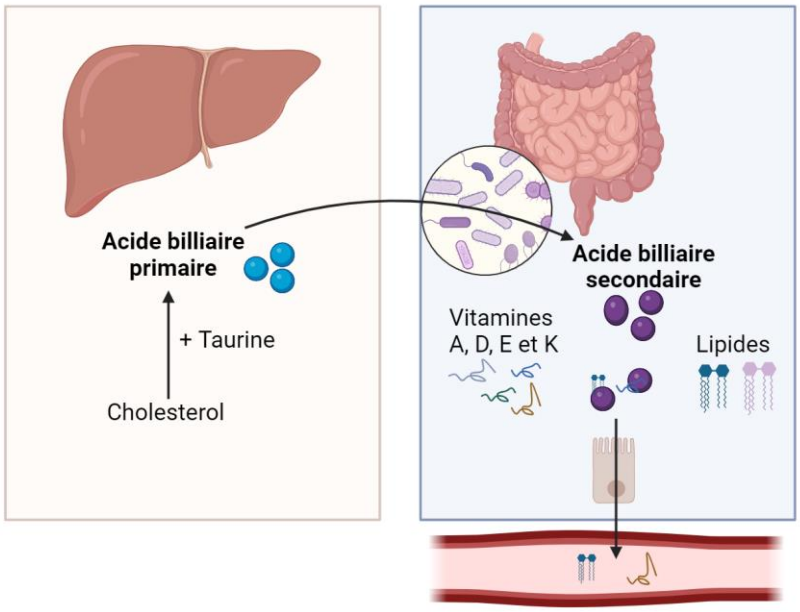


Figure 35 : Métabolisme simplifié des acides biliaires

Les vitamines retrouvées dans les fèces des grands prématurés de la cohorte sont la vitamine A (rétinol) et la vitamine D. Aucune différence dans la quantité de vitamine A entre chaque cluster et entre les groupes d'âges gestationnels n'était détectée. La vitamine D était plus abondante dans les fèces du Cluster C par rapport aux Clusters A et B (p=0.042 et p=0.052 respectivement) **(Figure 36A)** et était également retrouvée plus abondante chez les enfants du groupe AGN1 par rapport à AGN2 et AGN3 (p=0.0018 et p=0.00099 respectivement) **(Figure 36B)**. La taurine était détectée en moins grande quantité dans le Cluster C par rapport aux Clusters A et B (p=0.0055 et p=0.011 respectivement) **(Figure 36C)**. Inversement, la quantité de cholestérol dans les fèces des enfants du Cluster C était retrouvée plus importante par rapport à celle des Clusters A et B (p=0.086 et p=0.028 respectivement) **(Figure 36D)**. D'une manière générale, les acides biliaires secondaires sont plus corrélés positivement avec *Staphylococcus* ou *Clostridium* **(Figure 36E)**.

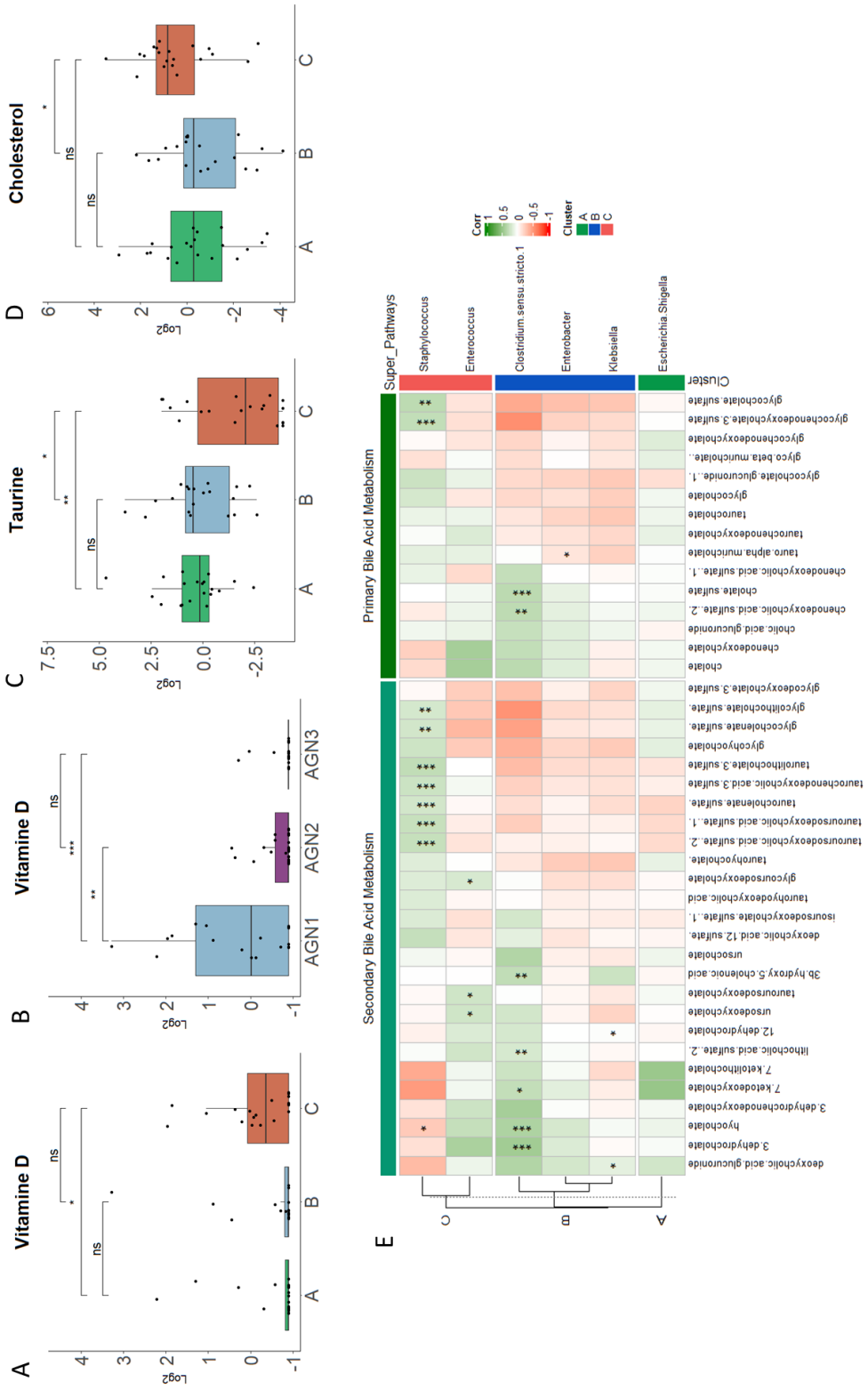


Figure 36 : Métabolisme des acides biliaires dans les fèces d'enfants grands-prématurés

A/ Abondance de la vitamine D (log2) dans chaque cluster.
B/ Abondance de la vitamine D (log2) dans chaque groupe d'âge gestationnel.
C/ Abondance de la taurine (log2) dans chaque cluster.
D/ Abondance du cholestérol (log2) dans chaque cluster.
E/ Corrélations de Spearman entre les genres bactériens et les métabolites des acides biliaires primaires et secondaires.

La voie du catabolisme du tryptophane varie en fonction de la composition du microbiote intestinal des grands prématurés âgés d'un mois

Le tryptophane est un acide aminé essentiel. Il est précurseur de plusieurs métabolites qui ont un rôle clé dans des processus physiologiques (sérotonine, mélatonine, nicotinate…). Le colostrum et le lait maternel sont très riches en tryptophane [216]. Des facteurs comme le microbiote intestinal, l'alimentation maternelle, le mode d'accouchement, l'âge gestationnel influencent le métabolisme du tryptophane en début de vie ce qui peut être essentiel pour le développement des fonctions de la barrière intestinale et du système immunitaire [217,218]. Ces dernières années, le catabolisme placentaire du tryptophane est identifié comme un lien entre la perturbation de l'environnement prénatal et la prédisposition aux troubles de santé mentale plus tard dans la vie [219].

Le tryptophane est impliqué dans différentes voies **(Figure 37)**. La majorité du tryptophane (90-95%) est oxydée par la voie de la kynurénine [220]. Elle est formée à partir du tryptophane grâce à l'indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) qui peut être inhibé par la tryptamine [221]. La kynurénine va ensuite former plusieurs composés dont l'anthranilate, le kynurénate, la quinolinate et la nicotinamide adénine dinucléotide [222]. Le kynurénate a un effet protecteur sur la muqueuse et des fonctions neuroprotectrices sur le cerveau [223]. Il est le ligand du récepteur GPR35 exprimé dans les entérocytes des cryptes qui va permettre de cliver la E-cadhérine et induire l'expression d'IL8 et IL10 [224–226]. Ces mécanismes vont favoriser la glycolyse, la prolifération et la signalisation cellulaire. Le tryptophane peut être métabolisé en tryptamine par la tryptophane décarboxylase (Trpd). La présence de Trpd chez les bactéries peut varier selon les espèces et les souches, mais peut être retrouvée chez certaines souches de *Clostridium* ou *Staphylococcus* [227,228].

La deuxième voie majeure du métabolisme du tryptophane est la voie des ligands AhR. Cette voie est essentiellement médiée par les microorganismes et conduit à la transformation du tryptophane en divers ligands agissant sur les récepteurs AhR. Cette transformation est médiée par la présence de tryptophanase dans des bactéries telles qu'*Escherichia* et *Clostridium* [229] permettant la production de l'indole. L'indole est immédiatement dégradé par les enzymes des cellules épithéliales et produit du 3-indoxyl-sulfate qui est considéré comme un biomarqueur de la production d'indole par le microbiote intestinal [230]. L'indole permet de réguler la motilité bactérienne, la formation de biofilms et joue un rôle dans l'invasion des cellules hôtes

par des espèces non productrices d'indole (certaines bactéries et *Candida albicans*). Une plus importante quantité d'indole induit une plus grande quantité de ligands AhR. Cette voie produit également différents indoles tels que l'indolepyruvate, l'indolelactate, l'indoleacetate ou encore l'indoleacetylglutamine, qui agissent en tant que ligands AhR. Ils peuvent induire une libération d'IL22 et de GLP1, un renouvellement épithélial, une baisse de la perméabilité et la modulation des fonctions cérébrales [231]. Ils régulent également l'intégrité de la barrière intestinale par le récepteur de xénobiotique activé par le pregnane (PXR) et les souris déficientes en PXR ont une expression réduite de Muc2 [231]. Les bactéries commensales utilisent les mucines comme une source d'énergie. Ainsi, pour une colonisation initiale par le microbiote intestinal en début de vie, il est crucial d'avoir une quantité adéquate de ligands AhR. Enfin, en augmentant la quantité de ligands AhR par administration de *Lactobacillus* il est démontré une amélioration des fonctions métaboliques et de la barrière intestinale [80].

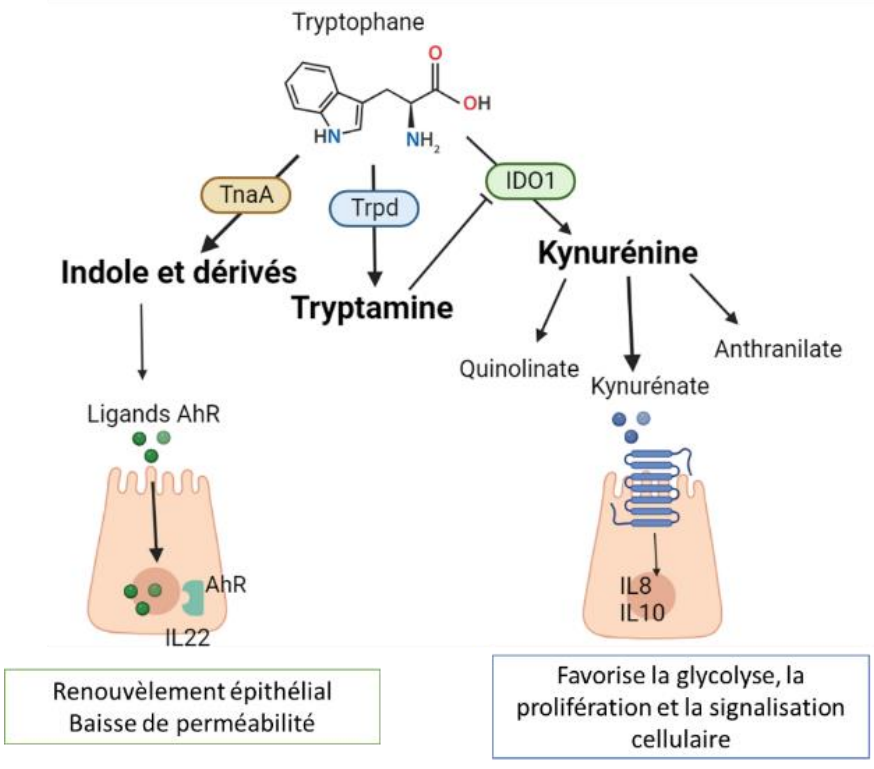


Figure 37 : Métabolisme simplifié du tryptophane

Le tryptophane est détecté en plus faible abondance chez les enfants du Cluster A par rapport à ceux des Clusters B et C ($p=1.8E10^{-5}$ et $p=6.2E10^{-7}$ respectivement) **(Figure 38A)**. *Escherichia* était corrélé négativement avec le tryptophane ($r=-0.56$, $p=2.3E10^{-5}$) **(Figure 38B)**. Aucune différence dans la quantité de la kynurénine entre chaque cluster n'était détectée. Cependant, la kynurenate et l'anthranilate étaient moins abondants dans les enfants du Cluster C par rapport aux Clusters A ($p=0.0012$ et $p=8.2^{e}$-05 respectivement) et B ($p=0.03$ et $p=0.0035$ respectivement) **(Figure 38C, Figure 38F)** ainsi que dans le groupe AGN1 par rapport aux groupes AGN2 ($p=0.014$ et $p= 0.036$ respectivement) et AGN3 ($p=0.0038$ et $p=0.011$ respectivement) **(Figure 38D, Figure 38E)**. La tryptamine était moins abondante chez les enfants du Cluster A par rapport à ceux des Clusters B et C ($p=0.043$ et $p=0.09$ respectivement) **(Figure 38G)**. La quantité de métabolites de l'indole était plus importante chez les enfants des Clusters A et B par rapport au Cluster C. L'indolelactate était retrouvé plus abondante dans les Clusters A et B par rapport au Cluster C ($p=6.9^{e}$-05 et $p=0.0018$ respectivement) **(Figure 38H).** L'indoleacetate était, quant à lui, retrouvé plus abondant chez les enfants du Cluster B que ceux des Clusters A et C ($p=7.9E10^{-5}$ et $p=2.3E10^{-6}$ respectivement) avec une abondance plus élevée dans le Cluster A par rapport au Cluster C ($p=0.06$) **(Figure 38I)**. L'indolelactate est corrélé positivement avec *Escherichia* ($r=0.27$, $p=0.05$) **(Figure 38J)**. L'indoxyl-3-sulfate était plus abondant dans le Cluster A par rapport aux Clusters B et C ($p=0.00028$ et $p=1.3E10^{-8}$ respectivement) mais également plus abondant dans le Cluster B que dans le Cluster C ($p=0.032$) **(Figure 38K)**. Une quantité plus importante de l'indoxyl-3-sulfate est trouvée chez les enfants avec un transit régulier à 1 semaine de vie **(Figure 38L)**.

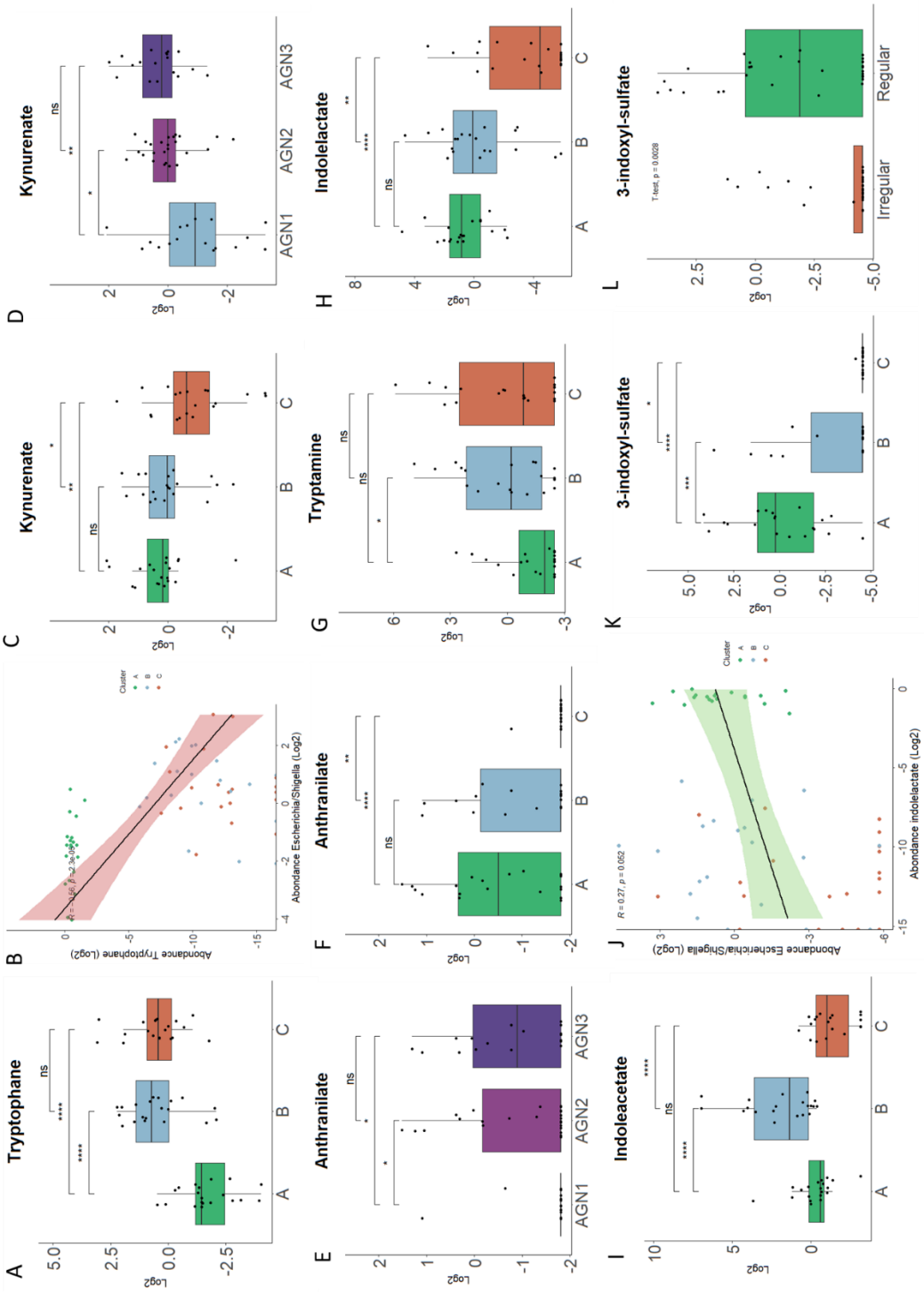


Figure 38 : Métabolisme du tryptophane dans les fèces d'enfants grands-prématurés

A/ Abondance du tryptophane (log2) dans chaque cluster. B/ Corrélation de Spearman entre Escherichia et le tryptophane. C/ Abondance du kynurénate (log2) dans chaque cluster. D/ Abondance du kynurénate (log2) dans chaque groupe d'âge gestationnel. E/ Abondance de l'anthranilate (log2) dans chaque groupe d'âge gestationnel. F/ Abondance de l'anthranilate (log2) dans chaque cluster. G/ Abondance de la tryptamine (log2) dans chaque cluster. H/ Abondance de l'indolelactate (log2) dans chaque cluster. I/ Abondance de l'indoleacetate (log2) dans chaque cluster. J/ Corrélation de Spearman entre Escherichia et l'indolelactate. K/ Abondance du 3-indoxyl-sulfate (log2) dans chaque cluster. L/ Abondance du 3-indoxyl-sulfate (log2) en fonction de la qualité du transit à 1 semaine de vie.

3. Discussion

Le métabolisme de la carnitine, de l'histamine, de la tyrosine, des acides biliaires et du tryptophane varie selon les clusters et est lié au microbiote intestinal. Comprendre dans quels clusters et du fait de quelles bactéries ces métabolismes se sont établis pourrait permettre d'anticiper les conséquences et de remédier aux déficits ou à une trop grande activation de ces voies métaboliques.

La plus faible quantité de carnitine fécale dans le Cluster A peut indiquer : i) moins d'apport de la carnitine pour ces enfants ii) une plus grande absorption par les entérocytes que les autres ou iii) une plus grande conversion en TMAO par le microbiote intestinal. Les niveaux de carnitine ne présentent aucune variation en fonction des différentes variables étudiées pouvant indiquer un apport plus ou moins important de ce métabolite (allaitement, utilisation de lait maternel, supplémentation en protéines, intubation). De plus, il n'y a pas de différence significative dans les niveaux de carnitine entre les groupes d'âge, ce qui suggère que la maturation physiologique de l'intestin ne serait pas être responsable de ces variations. Ces résultats indiquent que la quantité moins importante de carnitine dans le Cluster A ne semble pas être due à une variation dans l'apport ou l'absorption de carnitine par les entérocytes. Cependant, la composition du microbiote intestinal combinée à une maturation physiologique de l'intestin entre la 27ème semaine et la 31ème semaine (AGN2-3) pourrait être la raison de la variation d'abondance de la carnitine avec un plus fort impact du microbiote intestinal. Effectivement, nous observons une corrélation négative entre la quantité de carnitine et de TMAO pouvant représenter la dégradation de la carnitine en TMAO. Il y avait également une corrélation positive entre *Escherichia* et le TMAO, ainsi qu'une quantité de carnitine moins abondante dans le Cluster A et de TMAO plus abondante dans le Cluster A. Ces résultats peuvent indiquer que la présence d'*Escherichia* dans le microbiote permet une plus grande dégradation de la carnitine en TMAO. Cette dégradation est médiée par les enzymes cntA/B, présentes chez *Escherichia* [232,233], ce qui pourrait expliquer la conversion plus importante observée dans le Cluster A enrichi en *Escherichia*. Ces enzymes sont également présentes chez *Clostridium* et *Klebsiella* [189] mais il est possible que leur abondance varie en fonction de l'espèce voire de la souche, ce qui pourrait expliquer l'absence de corrélation entre *Clostridium*, la carnitine et le TMAO dans notre étude.

Il y a également une différence au niveau du métabolisme de l'histidine en fonction des clusters. Les entérotypes présentant les concentrations d'histamine les plus élevées correspondent aux entérotypes possédant des bactéries majoritaires à Gram négatif qui expriment l'enzyme HDC (histidine décarboxylase) dépendante du PLP (pyridoxal phosphate). Les Clusters A et B, majoritairement composés de bactéries à Gram négatif, contiennent davantage de PLP. Un microbiote enrichi en *Escherichia* permet une quantité plus importante d'histamine. Des bactéries telles que *Escherichia*, *Bacillus* ou *Helicobacter* peuvent produire du PLP [234]. Le 1-ribosyl-imidazole-acetate est un produit de la dégradation de l'histamine via l'enzyme diamine oxydase (DAO) [235]. Chez les personnes en bonne santé, l'histamine peut être rapidement détoxifiée par les DAO, alors que les personnes ayant une faible activité DAO sont à risque de toxicité de l'histamine [235]. La corrélation négative entre ce métabolite et les scores d'ASQ peut indiquer qu'une plus grande dégradation de l'histamine en imidazole acétate à 1 mois serait un mauvais pronostic pour le développement neurologique global à 2 ans.

Le métabolisme du p-crésol est quant à lui accentué par la présence de *Clostridium* au sein du microbiote intestinal. Le fait de voir une corrélation entre *Clostridium* et le p-crésol mais pas avec le 4-hydroxyphenylacetate tend à démontrer que *Clostridium* est impliqué dans la voie de formation du p-crésol après formation de 4-hydroxyphenylacetate. Il est connu que l'abondance de p-crésol dans les fèces est corrélée avec des troubles autistiques et a donc un lien avec le cerveau. Cependant, nous n'avons pas trouvé de corrélations avec l'ASQ total à 2 ans ainsi que pour le score d'ASQ correspondant au déficit social (correspondant le plus aux critères du trouble autistique). Néanmoins, dans ce sous-ensemble d'enfants, seuls 3 enfants appartiennent à l'entérotype *Clostridium*. Il serait intéressant d'évaluer ces corrélations sur un plus grand nombre d'enfants. *Clostridioides difficile* est très étudié pour son implication dans le métabolisme du p-crésol [236–238], mais dans les fèces de la cohorte nous avons isolé plusieurs espèces de *Clostridium* comme *Clostridium butyricum* et *Clostridium perfringens*. Il serait intéressant d'étudier plus spécifiquement l'implication de ces espèces dans le métabolisme du p-crésol. La colonisation par *Clostridium* en début de vie induisant une production plus importante de p-crésol est une piste intéressante pour le devenir de l'enfant.

L’absorption des vitamines et lipides semble altérée dans le Cluster C et chez les enfants nés le plus précocement. Les enfants du Cluster C et ceux nés le plus tôt (AGN1) ont une libération plus importante de la vitamine D dans les fèces. Dans le Cluster C, la taurine, qui joue un rôle essentiel dans l'aide à l'absorption des vitamines, présente une abondance plus faible dans les fèces. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle la capacité d'absorption des vitamines semble compromise dans ce cluster. La corrélation positive entre *Staphylococcus* et les acides biliaires pourrait suggérer une fuite des acides biliaires dans les fèces, indiquant un profil de mauvaise absorption des lipides [213]. Nous avons également mis en évidence que le Cluster C avait plus de cholestérol dans ses fèces. Chez les prématurés, la présence de cholestérol dans les fèces peut être influencée par plusieurs facteurs, notamment le régime alimentaire, le développement de l'appareil digestif et la fonction hépatique [239]. En général, les prématurés peuvent présenter des taux de cholestérol dans les fèces plus élevés que les nourrissons nés à terme en raison de leur immaturité intestinale et de la capacité limitée à absorber et métaboliser les lipides. Le cholestérol dans les fèces des prématurés peut être une combinaison de cholestérol alimentaire non absorbé et de cholestérol endogène excrété par le foie sous forme de bile. Or nous avons vu que les vitamines semblaient mal absorbées, suggérant également une mauvaise absorption du cholestérol. Cependant, notre étude met en évidence que la différence d’absorption des lipides et vitamines peut également être due à l’âge gestationnel. Avec une naissance inférieure à la 27ème semaine (AGN1), il y avait une diminution de l’absorption des lipides et vitamines.

Le métabolisme du tryptophane qui a un lien très important avec le développement du cerveau est affecté en fonction du cluster dû au fort impact du microbiote intestinal sur son métabolisme. Les concentrations de tryptophane et kynurénine dans le plasma et le liquide amniotique sont plus élevées après un accouchement par voie basse que par césarienne indiquant un transfert accru de cet acide aminé pendant le travail. Ces résultats suggèrent que le transfert placentaire de tryptophane et la synthèse fœtale de kynurénine sont augmentés pendant le travail. Ces résultats ont des implications pour comprendre la vulnérabilité du cerveau du nourrisson aux dommages hypoxiques pendant la période périnatale [240]. De plus, une étude plus récente a montré une augmentation du métabolisme du tryptophane dans les fèces des enfants de 16 jours à 185 jours d’âge nés par voie basse [217]. Le métabolisme du tryptophane semble également affecté par le régime alimentaire du nourrisson avec une

augmentation significative du kynurenate, de l'acide indole-3-lactique et l'acide indole-3-acétique chez les enfants nourris au lait maternel [218]. Dans notre étude, nous n'avons trouvé aucune différente dans le métabolisme du tryptophane pour les grands prématurés à 1 mois en fonction du mode d'accouchement ni en fonction du régime alimentaire.

Cependant, nous avons trouvé des différences au niveau du métabolisme du tryptophane en fonction de l'âge gestationnel et des différents clusters. Il y a donc un lien avec la maturation du microbiote intestinal et sa composition avec le métabolisme du tryptophane. On observe une diminution du potentiel d'action de métabolisation de la kynurenine pour les Clusters B et C par une possible inhibition de IDO1 causée par une plus forte quantité de tryptamine dans ces mêmes clusters. Une diminution de l'activité de cette voie peut affecter les fonctions cérébrales en modulant la voie de la kynurénine.

Quelques espèces de *Clostridium* et *Escherichia* peuvent cataboliser le tryptophane en indolelactate [241] retrouvé plus abondant dans les Clusters A et B. Il est également retrouvé corrélé positivement avec *Escherichia* dans nos données. *Clostridium* et *Escherichia* peuvent également cataboliser le tryptophane en indoleactetate [241] qui est plus abondant dans le Cluster B. À ce jour, aucune espèce d'*Enterococcus* et de *Staphylococcus* ne sont connues pour cataboliser le tryptophane. Ces données pourraient expliquer pourquoi le métabolisme de l'indole semble plus important dans les Clusters A et B et peu dans le Cluster C.

L'indole est la molécule la plus efficace du tryptophane. Si une quantité plus importante d'indoxyl-3-sulfate signifie plus d'indole alors il est bénéfique pour la maturation du tractus digestif et des fonctions cérébrales. Son administration permet d'atténuer les dommages du tractus digestif induit par des anti-inflammatoires (AINS) en modulant les réponses immunitaires innées et les altérations de la composition du microbiote intestinal [226]. *Escherichia coli* est connu pour être abondant au début de vie et est producteur d'indole [241] en faisant un bon primo-colonisateur pour le développement du métabolisme du tryptophane.

4. Conclusion

La présence d'*Escherichia* dans le microbiote permet une plus grande dégradation de la carnitine en TMAO. Les enfants nés grands prématurés avec les concentrations d'histamine les plus élevées appartiennent aux clusters avec des bactéries à Gram négatif qui expriment l'enzyme HDC (histidine décarboxylase) dépendante du PLP (pyridoxal phosphate). Ces bactéries, comme *Escherichia*, semblent pouvoir produire plus d'histamine que les bactéries à Gram positif. *Clostridium* augmente dans le métabolisme du p-crésol du Cluster B. L'absorption des vitamines et lipides semble altérée chez les enfants du Cluster C et chez les enfants nés le plus précocement du fait d'un mauvais métabolisme des acides biliaires. Les enfants des Clusters A et B ont un métabolisme du tryptophane dirigé vers la voie des dérivés de l'indole et de la voie de l'indole tandis que ceux du Cluster A présentent un métabolisme dirigé vers la voie de la kynurenine. Le Cluster C est associé à un métabolisme plutôt dirigé vers la tryptamine. *Escherichia coli* et *Clostridium* peuvent cataboliser le tryptophane en au moins 2 dérivés d'indole qui agissent sur les récepteurs AhR. Elles produisent aussi de la tryptophanase qui permet de convertir le tryptophane en indole puis en 3-indoxyl-sulfate qui est un biomarqueur de la production de l'indole.

CHAPITRE 5 :
Impact des bactéries du genre *Escherichia/Shigella* sur l'expression de calprotectine et cathélicidine par les cellules épithéliales

Nous avons précédemment montré que les nourrissons nés grands prématurés peuvent être stratifiés en trois clusters liés au neurodéveloppement global (ASQ). Le Cluster A (entérotype *Escherichia*) est associé à un meilleur développement cognitif, le Cluster B (entérotypes *Clostridium/Enterobacter/Klebsiella*) est associé à un développement cognitif intermédiaire et le Cluster C (entérotypes *Enterococcus/Staphylococcus*) est associé à un mauvais neurodéveloppement global. La composition microbienne distincte des clusters s'accompagne d'une expression différente de gènes des cellules hôtes [Patin *et al* in review ; Chapitre 3]. Nous avons notamment montré que les gènes des deux sous-unités de la calprotectine (S100A8, S100A9) étaient exprimés différemment par les cellules de l'hôte en fonction de l'appartenance aux clusters avec une tendance à une augmentation pour le Cluster A. Nous avons approfondi notre étude sur l'expression de la calprotectine et son rôle en début de vie. Le protocole utilisé est décrit dans la partie Matériel et Méthode.

1. Introduction

Les deux sous-unités de la calprotectine (S100A8, S100A9) et la calgranuline (S100A12) sont des protéines antimicrobiennes produites par les leucocytes du groupe des protéines S100, qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'inflammation et la défense immunitaire au niveau des muqueuses intestinales. La cathélicidine est un peptide antimicrobien produit par les leucocytes qui participe à la réponse immunitaire innée en favorisant la cicatrisation des tissus endommagés et en luttant contre les infections.

L'analyse de la calprotectine fécale est une méthode non invasive et relativement simple pour évaluer l'inflammation intestinale, ce qui en fait un outil utile pour la gestion et le suivi des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'augmentation de sa concentration dans les fèces de patients est le signe d'une migration transépithéliale des neutrophiles [242].

Les enfants à la naissance et jusqu'à l'âge de 2 ans présentent des taux élevés de calprotectine fécale pouvant aller jusqu'à 2130mg/kg [243,244]. Elle joue un rôle majeur dans les mécanismes de défense des nouveau-nés dont le système immunitaire intestinal n'est pas encore pleinement mature. Certaines études ont évalué le lien entre les taux de calprotectine détectés dans le méconium et les facteurs périnataux, mais les résultats sont souvent contradictoires. Le score d'APGAR (outil d'évaluation rapide utilisé pour évaluer l'état de santé d'un nouveau-né immédiatement après la naissance) et l'âge gestationnel peuvent être corrélés [245] ou non [246] avec la quantité de calprotectine fécale détectée dans le méconium. En outre, une corrélation similaire entre la quantité de calprotectine fécale et le mode d'accouchement a été mis en évidence chez les enfants nés soit par césarienne [245] soit par voie basse [247]. Une corrélation positive a également été observée entre l'antibiothérapie de la mère et la quantité de calprotectine dans le méconium, tandis qu'une corrélation négative a été relevée avec l'antibiothérapie de l'enfant [247]. Cependant, l'antibiothérapie de la mère a été corrélée négativement avec la calprotectine fécale à l'âge de 1 mois [124]. Il est intéressant de noter que l'alimentation au lait maternel a tendance à réduire progressivement la quantité de calprotectine fécale au fil du temps [246].

Le microbiote intestinal semble avoir une influence sur l'excrétion de la calprotectine. Des études ont démontré que les facteurs qui retardent la colonisation bactérienne, tels que les traitements antibiotiques, présentent une corrélation négative avec les niveaux de calprotectine à 1 mois. En revanche, les facteurs qui favorisent la colonisation bactérienne, tels que l'âge gestationnel avancé, montrent une corrélation positive avec la quantité de calprotectine [124]. Ces résultats suggèrent que la colonisation microbienne précoce a un impact sur l'expression de la calprotectine par les cellules hôtes. La calprotectine est fortement exprimée dans l'intestin et est reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes, ce qui en fait un élément potentiellement crucial dans les mécanismes de défense des nouveau-nés dont le système immunitaire intestinal n'est pas encore pleinement mature. D'autre part, des travaux ont révélé des corrélations positives entre les niveaux de calprotectine fécale et la présence de certaines bactéries telles que *Staphylococcus* et *Clostridium* [124] ou *Klebsiella* [248] à l'âge d'un mois.

Une étude menée sur des porcelets axéniques, colonisés par différentes souches *d'Escherichia coli*, a révélé une augmentation significative de la libération de calprotectine dans l'intestin en présence de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 (souche probiotique), tandis que les souches

Escherichia coli 055 (souche pathogène) ou *Escherichia coli* 086 (souche commensale) n'ont pas montré d'effet au niveau intestinal. Cependant, la souche pathogène entraînait une augmentation de la calprotectine plasmatique [249]. La présence de bactéries pathogènes en primo-colonisation ne serait donc pas un facteur d'augmentation de la calprotectine fécale. Une primo-colonisation intestinale par des bactéries de types différents (commensales, pathogènes ou probiotiques) ou de genres différents pourrait induire une réponse différente de l'expression de la calprotectine et provoquer ou non une inflammation physiologique en début de vie.

Les niveaux de calprotectine fécale chez les enfants prématurés atteints d'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) sont significativement plus élevés que chez les prématurés sans ECUN. La calprotectine est donc un marqueur utile pour évaluer l'inflammation de la muqueuse gastro-intestinale chez les prématurés [250,251]. Toutefois, les nourrissons atteints d'ECUN sévère n'ont pas montré d'augmentation de la calprotectine fécale, contrairement aux nourrissons présentant une ECUN modérée. Cette observation suggère un déficit spécifique dans l'activation de la défense innée chez les enfants atteints d'ECUN sévère [252]. Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'expression de la calprotectine dans le développement du système immunitaire en début de vie, en particulier chez les prématurés. Actuellement, l'utilisation de la calprotectine en combinaison avec d'autres marqueurs inflammatoires est évaluée pour prédire l'apparition de l'ECUN chez les enfants prématurés ou malades.

Enfin, la calprotectine est associée à la perméabilité membranaire et pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'intégrité de la barrière intestinale [253].

La cathélicidine est impliquée dans la réparation des tissus endommagés en favorisant la vascularisation de la plaie et l'épithélialisation de la peau cicatrisante [254]. Bien que son rôle dans la cicatrisation de la muqueuse intestinale soit encore inconnu, elle pourrait jouer un rôle bénéfique dans l'ECUN. Elle serait induite par le butyrate, un acide gras à chaîne courte produit par les bactéries intestinales, via la différenciation des colonocytes. La présence de cathélicidine est également détectable dans les fèces des nourrissons [255]. La seule cathélicidine humaine est appelée CAMP ou LL37.

2. Résultats

Activation immunitaire plus importante dans les clusters enrichis par *Escherichia/Shigella* ou *Clostridium/Klebsiella/Enterobacter*

L'analyse *in silico* des interactions entre gènes (logiciel STRING) montre que les deux sous-unités de la calprotectine, S100A8 et S100A9, sont co-exprimées avec un score de 0.987. La calgranuline (S100A12) est co-exprimée avec ces 2 sous-unités avec un score supérieur à 0.9 pour les deux sous-unités. La cathélicidine (CAMP) est co-exprimée avec un score compris entre 0.2 et 0.3 avec S10018, S10019 et S100A12 (**Figure 39A**). Les protéines S100 et CAMP interagissent physiquement entre elles (**Figure 39B**).

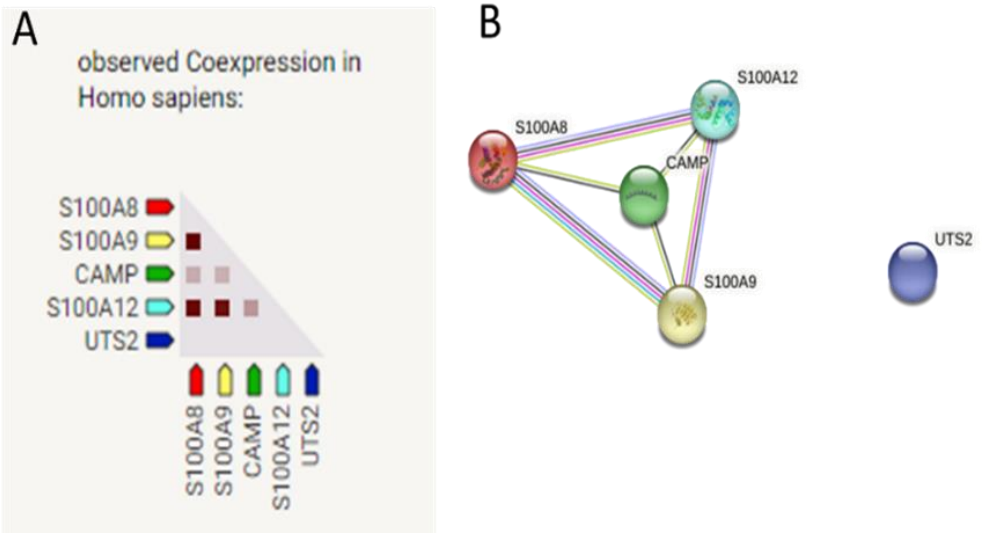


Figure 39 : Relations entre les gènes/protéines liés à la calprotectine

A/ Co-expression des gènes d'intérêts par STRING. S100A8 et S100A9 : 2 sous-unités de la calprotectine. S100A12 : calgranuline. CAMP : cathélicidine. UTS2 (contrôle négatif) : urotensine. B/ Relations entre les protéines d'intérêts.

Nous avons déterminé l'expression de ces gènes par une approche de RT-qPCR pour chaque cluster. Nous avons constaté que la sous-unité S100A8 de la calprotectine est plus fortement exprimée dans les fèces des enfants appartenant aux Clusters A, B et C que ceux de l'entérotype 6 ($p=9.8E10^{-5}$, p=0.00032 et p=0.045 respectivement) (**Figure 40A**). De même, la sous-unité S100A9 est exprimée plus fortement chez les enfants du Cluster A par rapport à ceux du Cluster C et l'entérotype 6 (p=0.0045, $p=2.7E10^{-5}$ respectivement) ainsi que dans le Cluster B par rapport à l'entérotype 6 (p=0.00011) (**Figure 40B**). L'expression de la cathélicidine est plus

importante dans les Clusters A et B que dans l'entérotype 6 (p=0.0039 et p=0.015 respectivement) (**Figure 40C**). Enfin, nous avons observé que S100A12 est plus fortement exprimé dans les Clusters A, B et C par rapport à l'entérotype 6 ($p=2.7E10^{-5}$, p=0.00011, p=0.02 respectivement) (**Figure 40D**).

Nous nous sommes interrogés sur le lien entre certaines bactéries associées aux entérotypes et leur impact sur l'expression de la calprotectine et de la cathélicidine, ainsi que leur éventuelle corrélation avec le développement neurologique global. Une corrélation positive a été observée entre S100A9 et *Escherichia* (r=0.36, p=0.027), qui est également corrélé positivement avec l'ASQ (**Figure 40E**). Aucune corrélation n'est trouvée entre S100A8 et *Escherichia*. Cependant, les deux sous-unités sont fortement corrélées positivement entre elles (r=0.89, $p<2.2E10^{-6}$) **(Figure 40F)**. En revanche, *Staphylococcus* semble corrélé négativement avec S100A12 (r=-0.37, p=0.057) (**Figure 40G**). Ces résultats soulignent l'importance des bactéries qui colonisent le tractus digestif en début de vie pour l'expression des différents gènes impliqués dans l'immunité à l'âge de 1 mois. Les analyses de corrélation n'ont pas révélé de corrélations entre S100A8, S100A9, S100A12 et CAMP avec l'ASQ (r=0.23, p=0.7 ; r=0.11, p=0.9 ; r=0.06, p=0.2 ; r=0.19, p=0.3 respectivement).

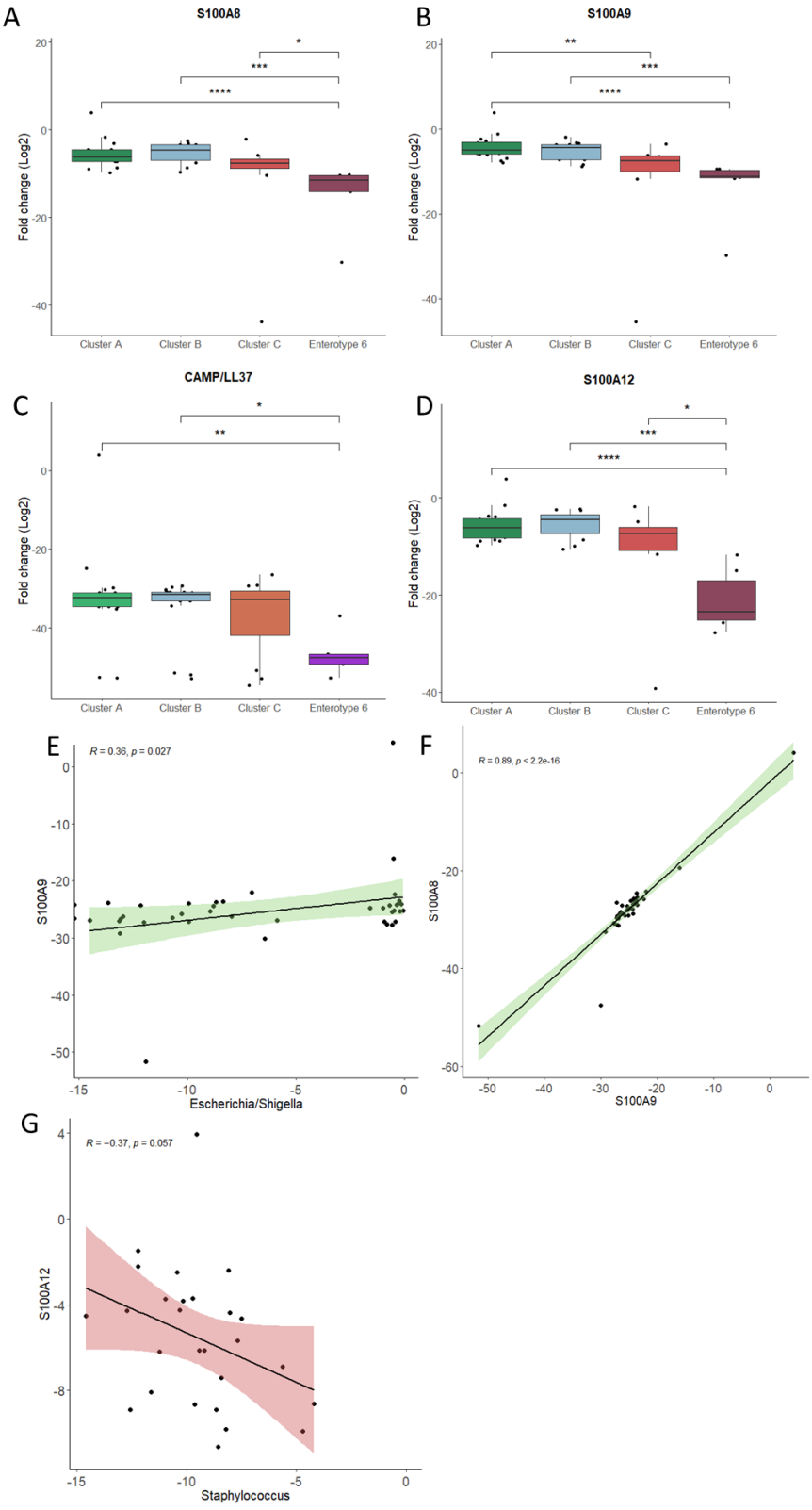


Figure 40 : Expression et corrélations de la calprotectine avec les genres bactériens enrichis dans les clusters

A-D/ Fold-change (log2) de l'expression de S100A8, S100A9, CAMP et S100A12.
E/ Corrélation de Spearman entre Escherichia et S100A9. F/ Corrélation de Spearman entre S100A8 et S100A9. G/ Corrélation entre Staphylococcus et S100A12.

Impact de surnageants bactériens sur l'expression de la calprotectine dans un modèle cellulaire

Afin de déterminer l'impact des bactéries primo-colonisatrices sur l'expression de la calprotectine intestinale, nous avons incubé des cellules épithéliales de colon humain HT29 avec les surnageants bactériens de souches commerciales d'*Escherichia coli* (LMG 18221), *Staphylococcus caprae* (DSM 20608), *Enterococcus faecalis* (DSM 100906) et *Klebsiella aerogenes* (DSM 30053) à des concentrations de 20% et 40%.

Les résultats ont indiqué une absence d'expression de la sous-unité S100A8 dans le groupe contrôle ainsi que dans l'ensemble des cellules avec l'ajout de surnageants excepté pour un échantillon en contact avec le surnageant de *Staphylococcus caprae* à 20% (CT=42.6) et 40% (CT=39.3), un échantillon de *Klebsiella aerogenes* à 20% (CT=41.3), ainsi que trois échantillons à 40% (CT=39.8, CT=40.7 et CT=40).

En revanche, l'expression de la sous-unité S100A9 a été détectée dans les cellules sans contact avec un surnageant bactérien (**Figure 41**). Le surnageant comprenant le milieu de culture bactérien seul (mGAM) à 40% induit une augmentation de l'expression de S100A9 par les cellules HT29 (p=0.004). Les surnageants d'*Escherichia coli* à 20% et 40% induisent une augmentation de l'expression de cette sous-unité dans les cellules HT29 (p=0.0081 et p=0.004) et aucune différence d'expression entre ces deux surnageants n'a été détectée. Le surnageant de *Staphylococcus caprae* à 20% induit une augmentation de l'expression de S100A9 dans les cellules HT29 (p=0.004) mais pas à 40%. À l'inverse, le surnageant de *Enterococcus faecalis* à 40% induit une augmentation de l'expression de S100A9 dans les cellules HT29 (p=0.004) mais pas à 20%. Les surnageants de *Klebsiella aerogenes* à 20% et 40% induisent une augmentation de l'expression de cette sous-unité dans les cellules HT29 (p=0. 004 et p=0.004) et aucune différence d'expression entre ces deux surnageants n'a été détectée. Nous n'avons pas observé de mortalité cellulaire à 20% et 40% pour les surnageants. Ces résultats soulignent l'impact spécifique des surnageants bactériens sur l'expression des sous-unités S100A8 et S100A9 dans les cellules HT29.

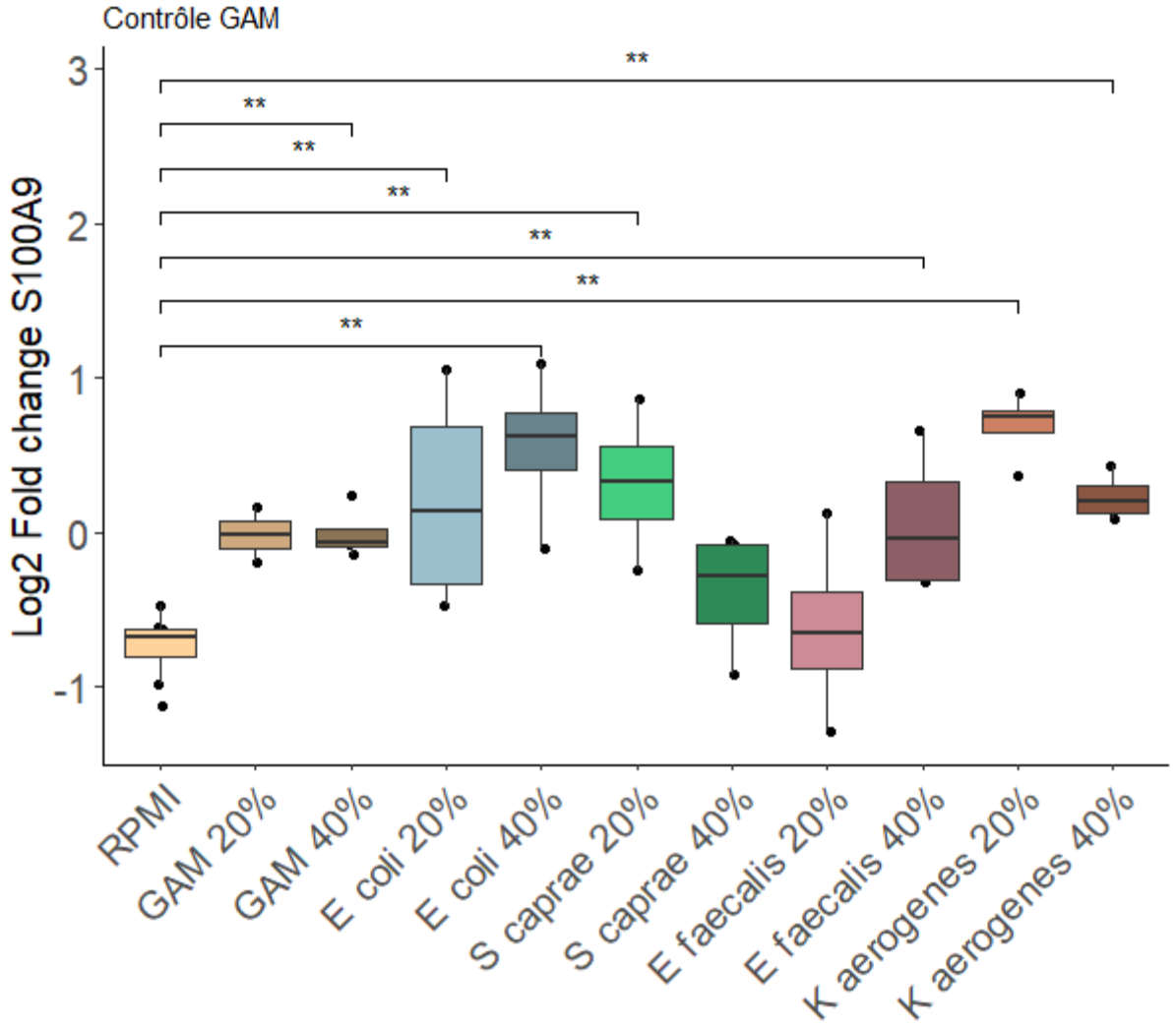


Figure 41 : Impact des surnageants bactériens de E. coli, S. caprae, E. faecalis et K. arerogenes sur l'expression de S100A9 par des cellules HT29. Expression indiquée en Log2 Fold Change. Différentes concentrations de surnageants bactériens ont été testées pour chaque espèce : 20% et 40%

3. Discussion

L'appartenance aux Clusters A et B est associée à une expression plus élevée de la calprotectine, de la cathélicidine et de la calgranuline au niveau intestinal chez les enfants nés grands prématurés. La différence semble globalement plus importante entre le Cluster A et l'entérotype 6 qui possède une très faible quantité bactérienne. Nos résultats chez l'Homme indiquent qu'il semble nécessaire d'avoir une colonisation bactérienne pour l'expression de la première immunité comme l'ont démontré Šplíchal *et al* [249] dans un modèle porcelet avec primo colonisation par *Escherichia coli*. Le microbiote intestinal à 1 mois semble impacter l'expression de la calprotectine. Une expression forte dans les premiers mois de vie est bénéfique pour la santé.

Les bactéries du microbiote intestinal à 1 mois induisent une expression différente des gènes de l'hôte et les enfants dont le microbiote est pauvre en bactéries ont une expression diminuée de nombreux gènes liés à l'immunité.

Escherichia, corrélé positivement avec S100A9, et son surnageant augmentent l'expression de cette sous-unité dans les cellules HT29. *Enterococcus* ne semble pas corrélé avec la calprotectine, mais tend à augmenter son expression en présence d'une plus grande quantité de son surnageant dans les cellules HT29. *Staphylococcus* est plutôt corrélé négativement et plus le pourcentage de surnageant de cette bactérie est grand, moins l'expression de S100A9 est présente dans les cellules. Ce dernier résultat est en contradiction avec les résultats d'une précédente étude [124]. Une des explications de cette différence pourrait être la méthode de détection utilisée, via RT-qPCR vs dosage immunoenzymatique [124].

Le taux de calprotectine fécale à 2 mois a également été associé au développement d'un asthme à 6 ans et une faible quantité *d'Escherichia.* Une activation altérée de l'IL-10 due à l'absence de colonisation par *Escherichia coli* pourrait expliquer l'inflammation intestinale associée à une calprotectine fécale élevée et un risque ultérieur d'asthme [256]. La calprotectine à 3 mois a également été associée à la fonction motrice, au score socio-émotionnel et au langage à 2 ans [257]. Cependant, il n'y a pas d'impact de la calprotectine sur la santé neurologique des adultes atteints de MICI [258]. Nous n'avons pas pu établir de corrélation directe entre la calprotectine, la cathélicidine (CAMP), et la calgranuline avec l'ASQ. Cependant, nous avons constaté qu'*Escherichia* semble induire une plus grande expression de la

calprotectine, et que sa présence dans le microbiote intestinal à 1 mois est associée à des résultats bénéfiques sur l'ASQ à l'âge de 2 ans.

L'impact de la calprotectine sur le développement cognitif semble important seulement en début de vie, durant la formation d'une immunité physiologique. Il serait intéressant de tester l'impact de surnageants bactériens venant de souches isolées des fèces de la cohorte sur des cellules épithéliales immatures.

4. Conclusion

Une quantité de bactéries intestinales extrêmement faible chez les enfants grands prématurés à 1 mois ne semble pas induire le développement d'une immunité physiologique intestinale, et est caractérisée par une absence d'expression de la calprotectine, de la calgranuline et de la cathélicidine. Certaines bactéries semblent avoir un impact plus marqué que d'autres lors de la colonisation, influençant ainsi l'expression des composants immunitaires. *Escherichia* aurait un meilleur impact sur le développement de l'immunité physiologique ainsi que sur le développement neurologique global à 2 ans à l'inverse de *Staphylococcus*. Les enfants du Cluster A auraient un meilleur développement de leur système immunitaire.

CHAPITRE 6 :
Impact des xénobiotiques et de *Candida albicans* sur le microbiote intestinal d'enfants nés prématurés

Au-delà des variables périnatales documentées dans le cadre du projet EPIFLORE, nous avons voulu connaître l'impact des xénobiotiques et des champignons sur le microbiote intestinal des enfants nés grands prématurés. Ce travail a été réalisé avec **Solène Blin**, stagiaire de Master 2 en Science des médicaments et des produits de santé que j'ai co-encadré entre Janvier et Juin 2023.

1. Introduction

L'établissement du microbiote est influencé par l'alimentation, le mode de vie (comme les interactions avec d'autres enfants ou la présence d'animaux dans la famille), mais également par l'exposition à des xénobiotiques tels que des médicaments, pesticides ou produits chimiques. Les mille premiers jours de vie et le concept de DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), sont d'une importance capitale pour le développement futur, que l'enfant soit né à terme ou prématuré. Le microbiote intestinal est fortement impliqué dans le concept de DOHaD.

Ce dernier est composé de bactéries, mais également de champignons, de virus et de parasites. *Candida albicans* est le champignon le plus fréquemment retrouvé dans l'intestin des enfants nés prématurés [53].

Les bisphénols sont des composés qui peuvent être en contact des enfants grands prématurés. Ce sont des composés du plastique retrouvés dans les biberons, les sondes d'intubations ou les couveuses. Le bisphénol A (BPA) est le plus utilisé, mais en raison de sa toxicité, il peut être remplacé par le bisphénol S (BPS). Le BPS étant moins étudié que le BPA, bien qu'il puisse avoir une toxicité similaire, il est important de comprendre ses impacts sur la santé humaine [259]. La domperidone, un antiémétique, peut être donnée aux mères des nouveau-nés prématurés pour augmenter la lactation sans affecter la composition du lait [260]. Elle est connue pour réduire la vidange gastrique et provoquer des troubles liés à la motilité intestinale [261]. De

plus, nos données de métagénomique globale indiquent que certains des enfants de l'étude présentaient ce métabolite dans leurs fèces (4 enfants sur 60).

Nos objectifs étaient de : i) isoler les souches bactériennes des échantillons de fèces de 3 entérotypes, *Escherichia*, *Enterobacter* et *Enterococcus,* ii) réaliser des communautés synthétiques pour tenter de reproduire le microbiote bactérien des individus avec les souches extraites et iii) étudier l'impact de certains xénobiotiques et de *Candida albicans* sur ces communautés synthétiques

2. Résultats

L'isolement bactérien met en évidence des espèces présentes en majorité dans l'analyse en métagénomique globale, mais également quelques genres détectés en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S

La composition microbienne de soixante nourrissons prématurés a été analysée par séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S. Afin de mieux connaître l'espèce précise correspondant aux entérotypes de la cohorte, quelques échantillons ont été sélectionnés pour une analyse supplémentaire par métagénomique shotgun en fonction de la quantité d'ADN disponible et de la diversité bactérienne. Nous voulions analyser un échantillon de fèces de chaque entérotype avec la plus forte diversité bactérienne détectée en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S et un second échantillon de fèces dans lequel seule la bactérie spécifique de l'entérotype était détectée. Nous avons ensuite sélectionné trois de ces échantillons pour procéder à des isolements bactériens. Les 3 échantillons faisaient partie des entérotypes *Enterobacter*, *Escherichia* et *Enterococcus* **(Figure 42).**

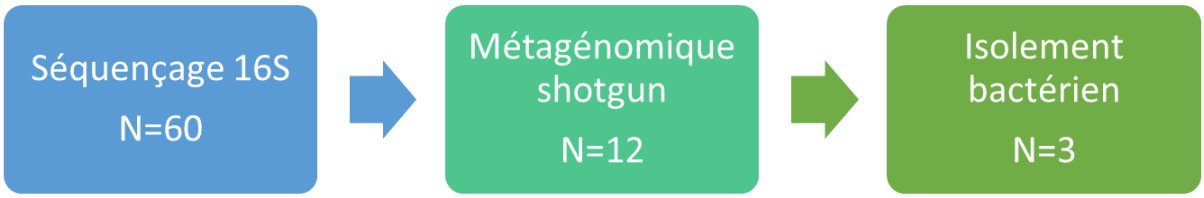


Figure 42 : Nombre d'échantillons par méthodes de détection de bactéries dans le microbiote intestinal des grands prématurés.

Au sein de l'échantillon choisi pour représenter l'entérotype *Enterobacter*, le genre *Enterobacter* est retrouvé majoritaire à 99.21% et 97.49% par la métagénomique shotgun et le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S respectivement. La principale différence entre ces deux analyses est le nombre de genres retrouvés : trois genres bactériens en métagénomique shotgun et au moins neuf genres par le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S. *Staphylococcus* et *Enterococcus* sont détectés en métagénomique shotgun (0.48% et 0.31% respectivement) et en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S (0.26% et 0.30% respectivement) mais *Escherichia* (1.16%), *Clostridium* (0.47%), *Peptoniphilus* (0.01%) et *Finegoldia* (0.01%) ne sont retrouvés qu'en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S **(Figure 43A)**. Au total, 69 isolats ont été collectés et 28 ont pu ensuite être identifiés par séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S. Les espèces bactériennes suivantes ont été isolées et identifiées des fèces : *Enterobacter hormaechei* (appartenant au complexe *E. cloacae*) (8 isolats) sur milieu EMB, *Enterococcus faecalis* (16 isolats) sur milieu mEnterococcus et BEA et *Staphylococcus epidermidis* sur milieu Chapman. Ces espèces ont été isolées en conditions aérobie et anaérobie, hormis *Staphylococcus epidermidis* (4 isolats) qui n'a pas été retrouvée en condition anaérobie. Bien que retrouvée dans les résultats de métagénomique shotgun, l'espèce *Staphylococcus haemolyticus* n'a pas pu être isolée **(Figure 43B)**. Nous n'avons pas isolé *d'Escherichia* ou de *Clostridium* pourtant présents dans les résultats du séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S.

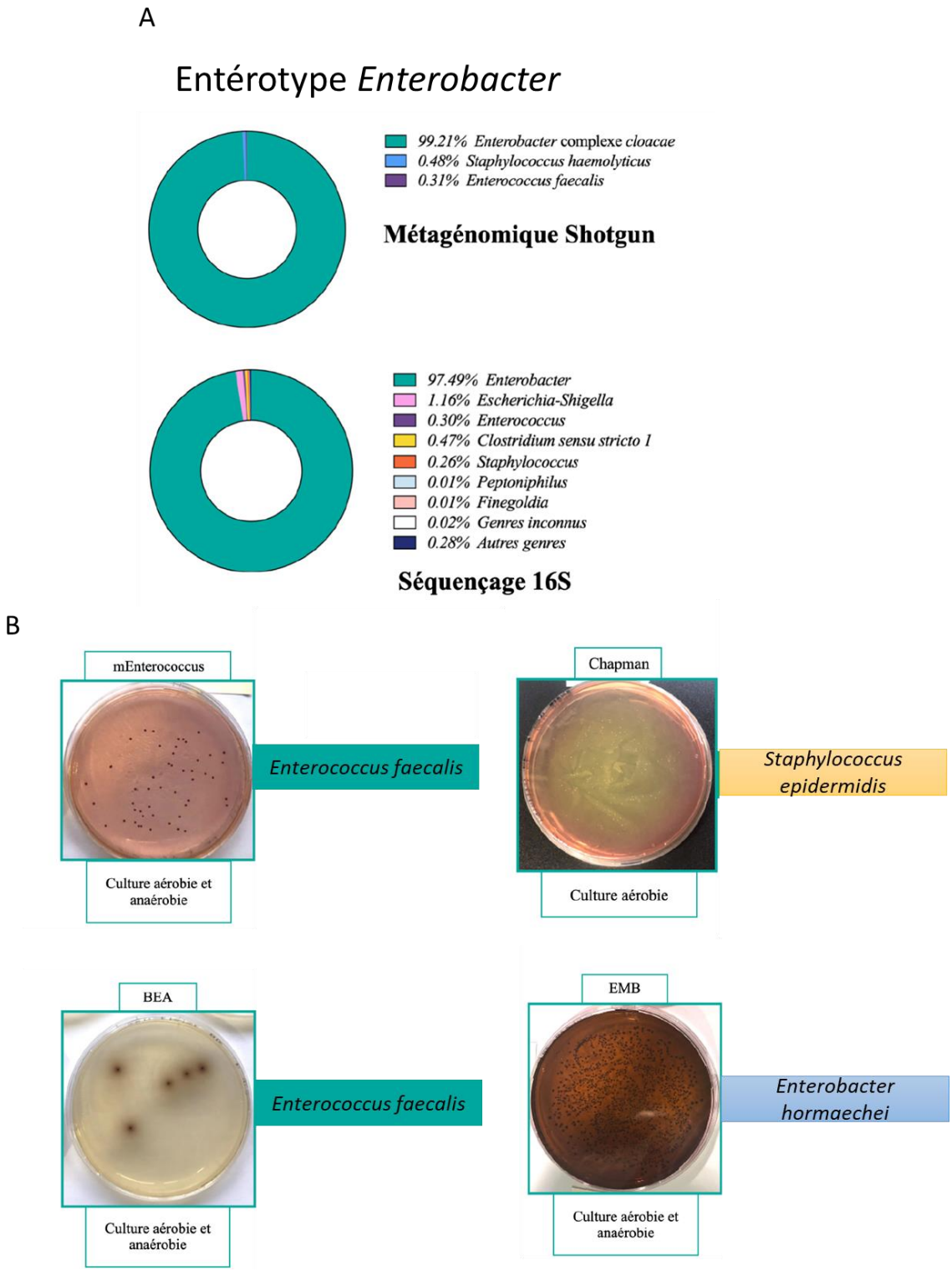


Figure 43 : Bactéries détectées ou isolées via différentes méthodes au sein du même échantillon de l'entérotype 2 enrichi en Enterobacter

A/ Pourcentage de bactéries détectées dans l'analyse en métagénomique shotgun et en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S pour un échantillon de l'entérotype Enterobacter.
B/ Espèces bactériennes isolées des fèces d'un échantillon de l'entérotype Enterobacter.

Au sein de l'échantillon choisi pour représenter l'entérotype *Enterococcus*, le genre *Enterococcus* est retrouvé majoritaire à 99.69% et 98.76% par la métagénomique shotgun et le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S respectivement. Deux espèces d'*Enterococcus* sont retrouvées en métagénomique shotgun : *Enterococcus faecalis* (94.68%) et *Enterococcus faecium* (5.01%) ainsi que deux espèces de *Staphylococcus* : *Staphylococcus epidermidis* (0.24%) et *Staphylococcus haemolyticus* (0.07%). Ces deux genres sont retrouvés dans le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S avec un faible pourcentage pour *Staphylococcus* (0.38%). Les genres *Enterobacter* (0.25%), *Klebsiella* (0.16%) et *Citrobacter* (0.08%) sont également retrouvés en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S **(Figure 44A)**. Toutes les espèces retrouvées en métagénomique shotgun sont retrouvées via les isolements bactériens hormis *Staphylococcus haemolyticus*. Au total, 67 isolats ont été collectés et 31 isolats identifiés. Le milieu Chapman a permis d'isoler *Staphylococcus epidermidis* (7 isolats). Les milieux mEnterococcus, EMB et BEA ont permis l'isolement d'*Enterococcus faecalis* (11 isolats) et d'*Enterococcus faecium* (8 isolats). Le milieu EMB, moins sélectif, a également permis la croissance de deux espèces non détectées en métagénomique : *Klebsiella variicola* (3 isolats) et *Enterobacter hormaechei* (2 isolats) **(Figure 44B)**.

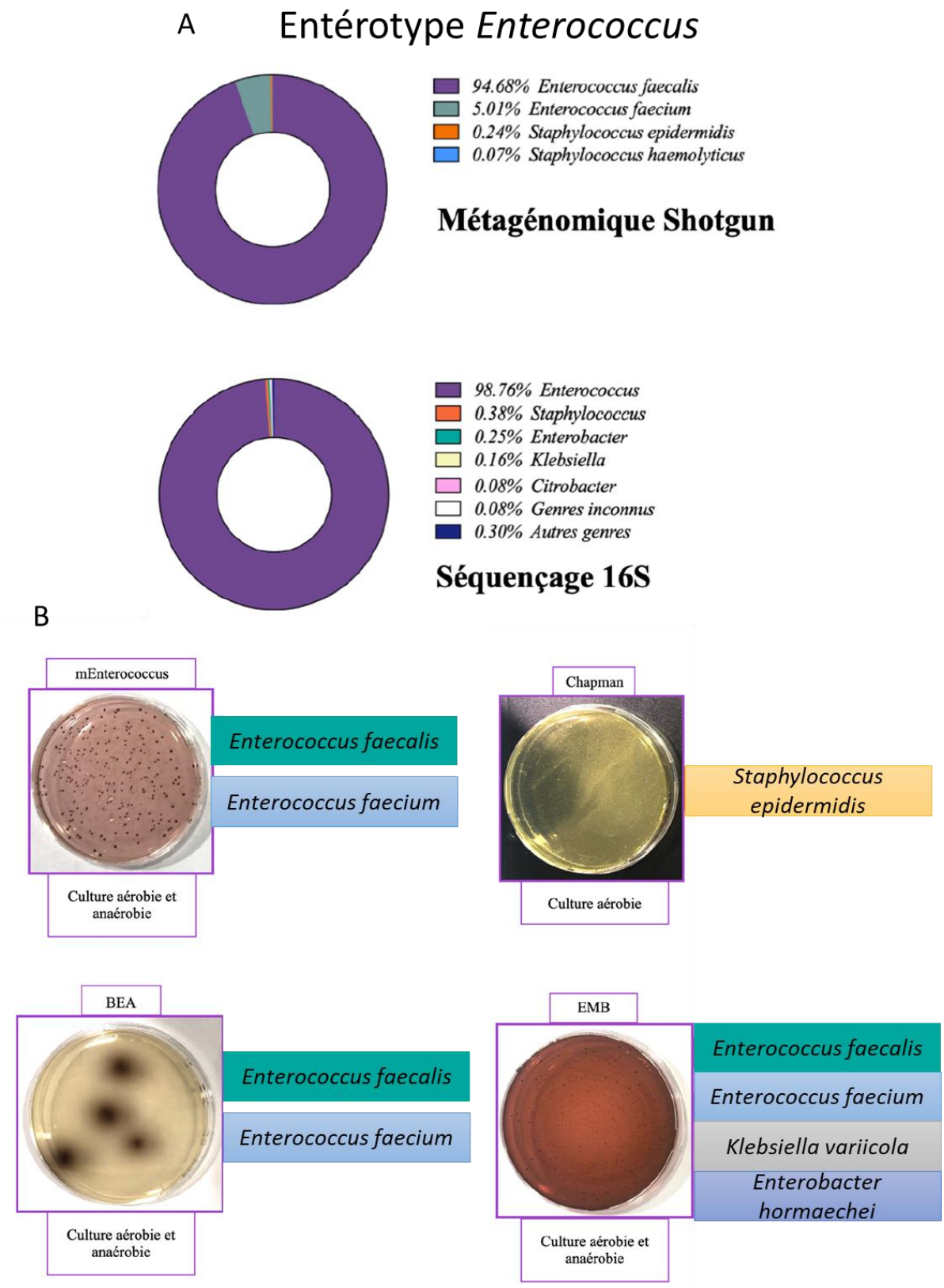


Figure 44 : Bactéries détectées ou isolées via différentes méthodes au sein du même échantillon de l'entérotype 4 enrichi en Enterococcus

A/Pourcentage de bactéries détectées dans l'analyse en métagénomique shotgun et en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S pour un échantillon de l'entérotype Enterococcus.
B/ Espèces bactériennes isolées des fèces d'un échantillon de l'entérotype Enterococcus.

Au sein de l'échantillon choisi pour représenter l'entérotype *Escherichia*, le genre *Escherichia* était majoritaire dans le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S (49.05%) tandis que *Bifidobacterium* était majoritaire en métagénomique (39.94%). Ces deux genres restaient abondants dans le microbiote dans les deux analyses, car *Bifidobacterium* était retrouvé à 27.56% en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S et *Escherichia* à 32% en métagénomique shotgun. Une plus grande diversité d'espèce était retrouvée de cet échantillon en métagénomique shotgun comparé aux deux autres entérotypes. Les genres communs entre l'analyse en métagénomique shotgun et le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S étaient *Enterococcus* (25.53% et 16.96% respectivement), *Clostridium* (2.17% et 5.78% respectivement), *Staphylococcus* (0.32% et 0.15% respectivement) et *Haemophilus* (0.01% et 0.15% respectivement) **(Figure 45A)**. Au total, 36 isolats ont été collectés et 26 identifiés par séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S. L'espèce *Enterococcus faecalis* (15 isolats) a été isolée sur plusieurs milieux : EMB, MRS, BEA et MCT. *Clostridium perfringens* (3 isolats) a été isolée sur deux milieux : BDB et BEA, *Escherichia coli* (3 isolats) sur les milieux BDB et EMB et *Clostridium butyricum* (4 isolats) uniquement sur milieu MRS **(Figure 45B)**. Sur ce dernier milieu, deux phénotypes distincts de 25 colonies pouvaient être observés : des petites colonies rondes couleur crème et des colonies translucides à bord irrégulier. Les petites colonies rondes correspondaient à *Enterococcus faecalis*, tandis que les plus grosses colonies correspondaient à *Clostridium butyricum*. Un isolat du milieu EMB n'a pas pu être identifié. Bien qu'ayant la plus forte abondance relative en métagénomique shotgun, le genre *Bifidobacterium* n'était pas retrouvé parmi les isolats. Aucun des genres détectés uniquement par le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S n'ont pu être isolés. Deux espèces d'*Enterococcus* sur les trois (*Enterococcus casseliflavus* et *Enterococcus avium*) et une espèce de *Clostridium* (*Clostridium neonatale*) sur les trois présentes en métagénomique shotgun n'ont pas pu étés isolés. Nous n'avons pas tenté d'isoler des *Staphylococcus* car leur pourcentage était très faible.

Pour la suite du projet, nous avons dans un premier temps voulu nous concentrer sur l'échantillon pour lequel nous avions réussi à isoler le plus de bactéries correspondant au séquençage en métagénomique : l'entérotype *Enterococcus*.

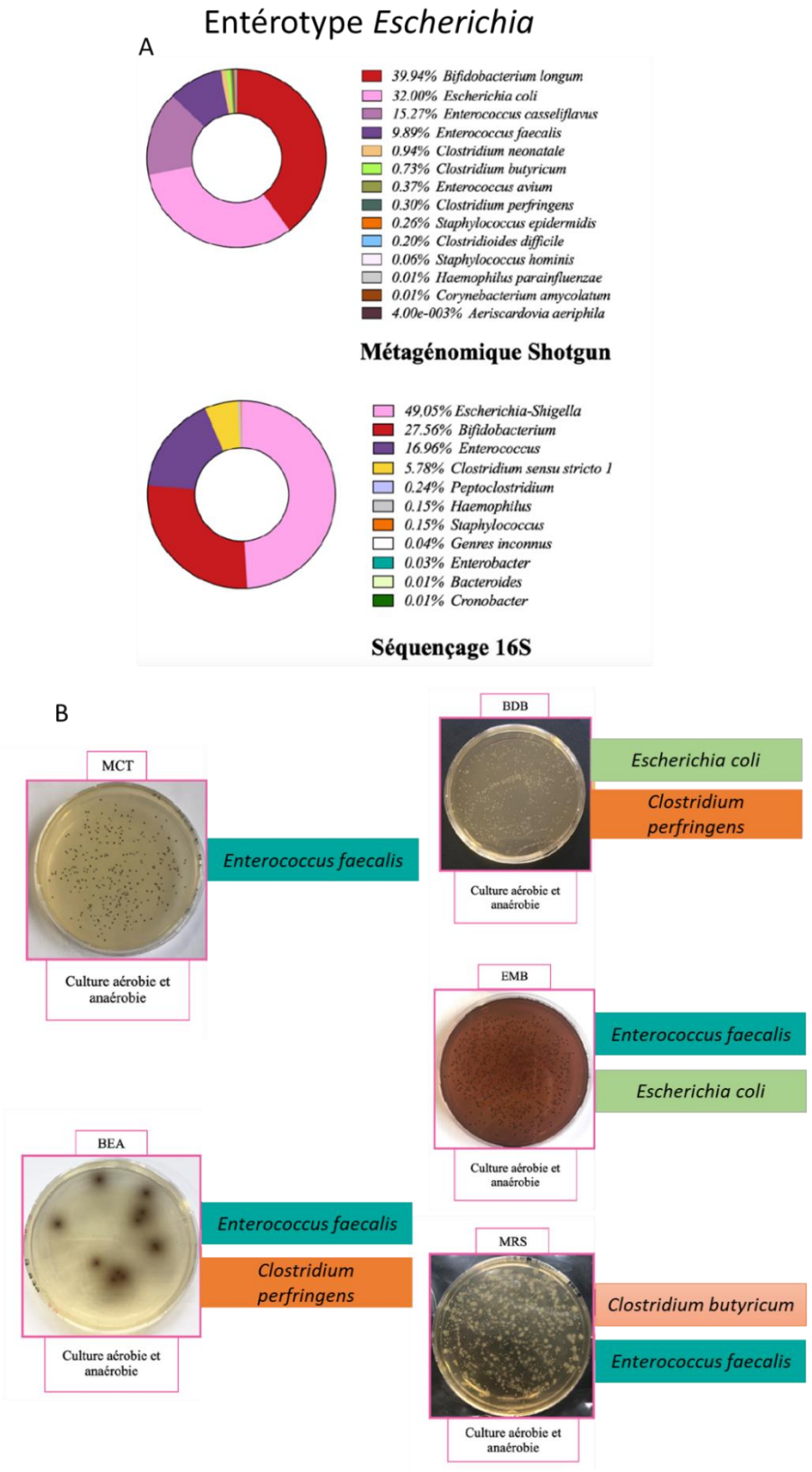


Figure 45 : Bactéries détectées ou isolées via différentes méthodes au sein du même échantillon de l'entérotype 3 enrichi en Escherichia

A/Pourcentage de bactéries détectées dans l'analyse en métagénomique shotgun et en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S pour un échantillon de l'entérotype Escherichia.
B/ Espèces bactériennes isolées des fèces d'un échantillon de l'entérotype Escherichia.

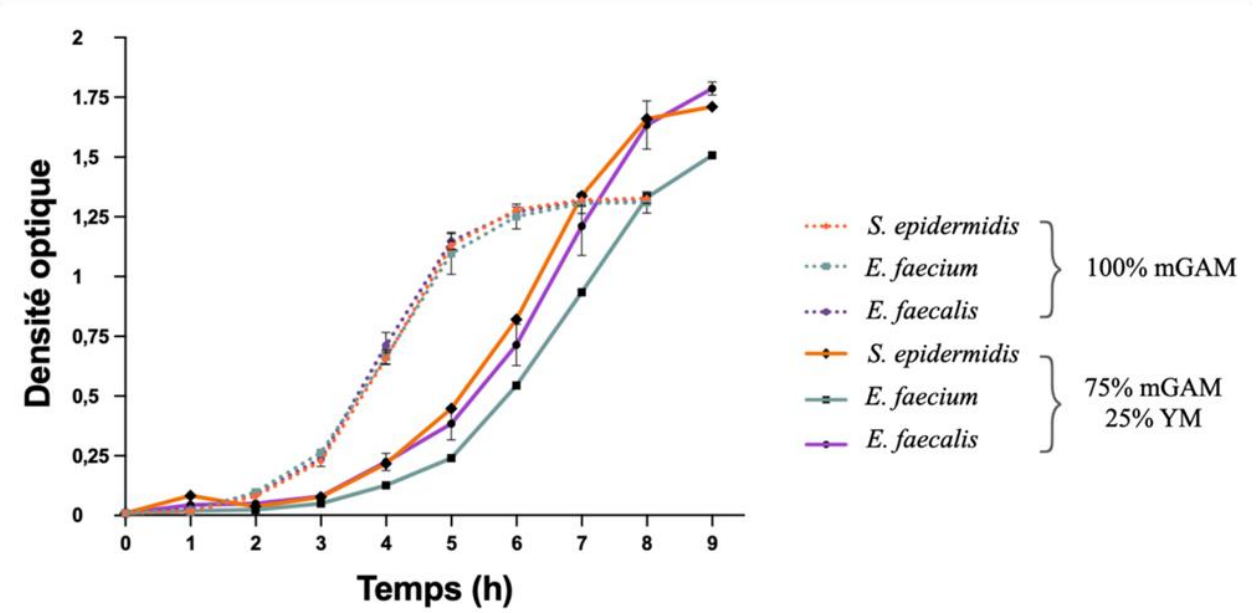
La croissance bactérienne et de *Candida albicans* augmente dans un milieu mixte par rapport à leurs milieux de croissance respectifs

L'une des premières difficultés rencontrées lors du développement d'une communauté bactérienne synthétique réside dans les besoins nutritionnels variables des différentes bactéries. Le milieu mGAM (milieu anaérobie Gifu modifié) permet la culture d'une proportion représentative de bactéries intestinales humaines [262]. *Candida albicans* ne croit pas dans le milieu mGAM mais dans le milieu YM (Yeast Media) qui ne permet pas la croissance des bactéries.

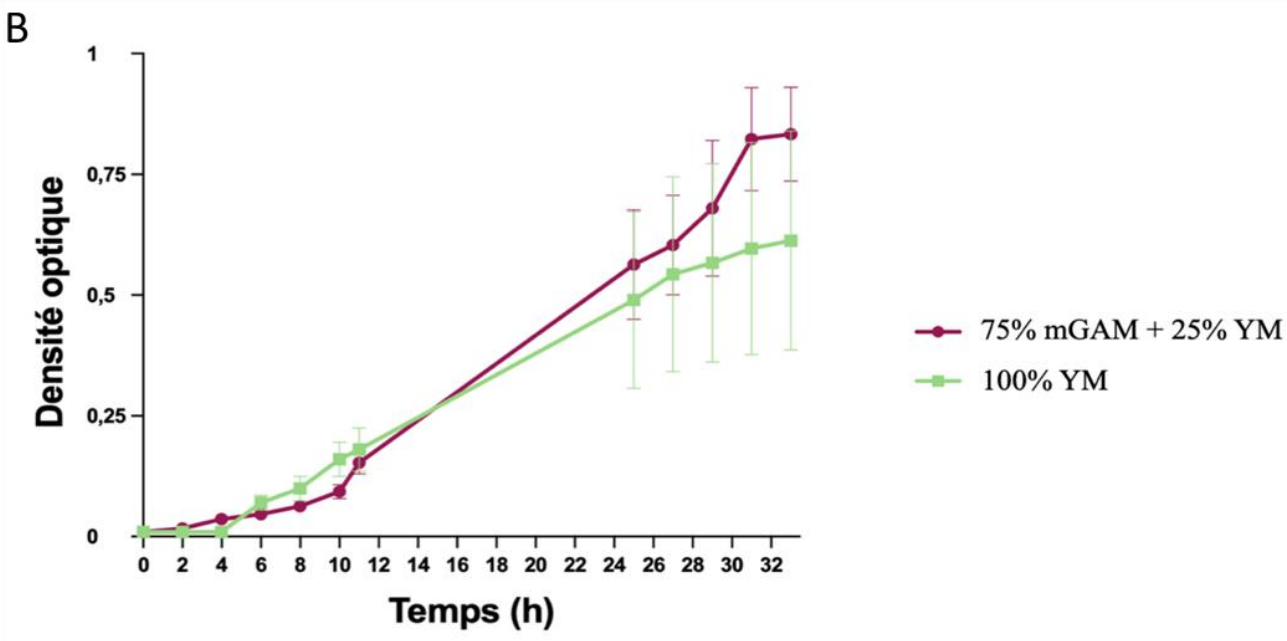
Nous avons voulu recréer un milieu pouvant permettre la croissance à la fois des bactéries et des champignons. Pour cela, il a fallu évaluer la cinétique de croissance des trois espèces bactériennes isolées de l'échantillon de l'entérotype *Enterococcus* afin de s'assurer d'une croissance homogène de ces trois espèces. Les cinétiques de croissance de ces bactéries sont mesurées dans un milieu mGAM et un milieu mixte contenant 75% de mGAM et 25% de YM sur 9h en anaérobie avec une prise de densité optique (DO) toutes les heures **(Figure 46A)**. Aucune différence significative n'est observée pour la croissance entre les trois espèces bactériennes sur ces 9h pour chaque milieu. Les différences de croissance au sein d'une espèce entre les deux milieux de culture n'ont pas mis à jour de différences significatives de croissance pour *Staphylococcus epidermidis* (p=0.2500) et *Enterococcus faecalis* (p=0.1094) mais pour *Enterococcus faecium* une différence a été constatée avec une croissance moins rapide en milieu mixte (p=0.0391). La phase stationnaire est atteinte après environ 7h pour les trois espèces bactériennes en milieu 100% mGAM, tandis qu'elle est plus tardive en milieu mixte (environ 9h de culture). Cependant, une croissance plus importante est observée en milieu mixte, avec des DO atteignant presque 1,90 pour *Staphylococcus epidermidis* (p=0.05) et *Enterococcus faecalis* (p=0.05) contre une DO de 1,25 environ pour une croissance en milieu mGAM au bout de 9h.

La croissance de *Candida albicans* en anaérobie est suivie pendant 33h **(Figure 46B)**. Une croissance plus lente que pour les trois bactéries isolées de l'entérotype *Enterococcus* est observée, avec un plateau commençant à être atteint au bout d'environ 33h. Il n'y a pas de différences significatives de croissance de *Candida albicans* entre le milieu YM et le milieu mixte. Néanmoins, comme observé précédemment, les DO finales sont plus élevées en milieu mixte qu'en milieu YM vers la fin de la croissance.

A



B



<u>Figure 46</u> : Cinétique de croissance en fonction des milieux mGAM et milieu mixte pour trois bactéries et milieux YM et mixte pour Candida albicans

A/ Cinétique de croissance des trois espèces bactériennes isolées de l'entérotype Enterococcus : Enterococcus faecalis (violet), Enterococcus faecium (vert) et Staphylococcus epidermidis (orange) pendant 9h. Les courbes en plein représentent la cinétique des bactéries en milieu mixte et en pointillés en milieu mGAM.
B/ Cinétique de croissance de Candida albicans en culture dans le milieu YM (vert) et mixte (rouge) ;

Staphylococcus diminue au sein des communautés synthétiques et des fèces au cours du temps

La communauté synthétique recréée est constituée des trois espèces majoritaires avec les mêmes pourcentages que dans l'analyse métagénomique : *Enterococcus faecalis* (94.5%), *Enterococcus faecium* (5%) et *Staphylococcus epidermidis* (0.5%). Nous avons mis en culture les fèces d'origine et comparé la quantité bactérienne au cours des trois jours de croissance afin d'évaluer la pertinence de notre modèle *in vitro*.

Le premier jour, une plus forte charge bactérienne a été constatée dans les fèces en comparaison aux communautés synthétiques, avec des quantités comprises entre $1.25E10^5$ et $2.2E10^5$ CFU pour les fèces et $4.8E10^4$ CFU pour les communautés synthétiques ($p=0.0312$). Aux deuxièmes et troisièmes jours, la quantité totale de bactéries dans les fèces diminue fortement, rejoignant celles des communautés synthétiques à environ $4.5E10^4$ CFU. Ainsi, la quantité bactérienne totale des fèces semble tendre vers une stabilisation. Concernant les communautés synthétiques, la charge bactérienne reste stable dans le temps avec des quantités bactériennes totales d'environ $4.8E10^4$ CFU à J1, J2 et J3 **(Figure 47A)**.

Par la suite, une analyse des abondances relatives est réalisée au niveau du genre pour *Staphylococcus* et *Enterococcus* au sein des fèces et des communautés synthétiques. Le genre *Staphylococcus* est présent à 0.4% à J1 pour les fèces, contre moins de 0.05% au sein des communautés synthétiques. Ce pourcentage baisse de moitié à J2 et atteint 0.2% pour les fèces, puis environ 0.03% à J3 tandis que *Staphylococcus* n'est plus détecté dès le deuxième jour dans les communautés synthétiques **(Figure 47B)**. *Staphylococcus* tend à disparaître au profit des *Enterococcus*.

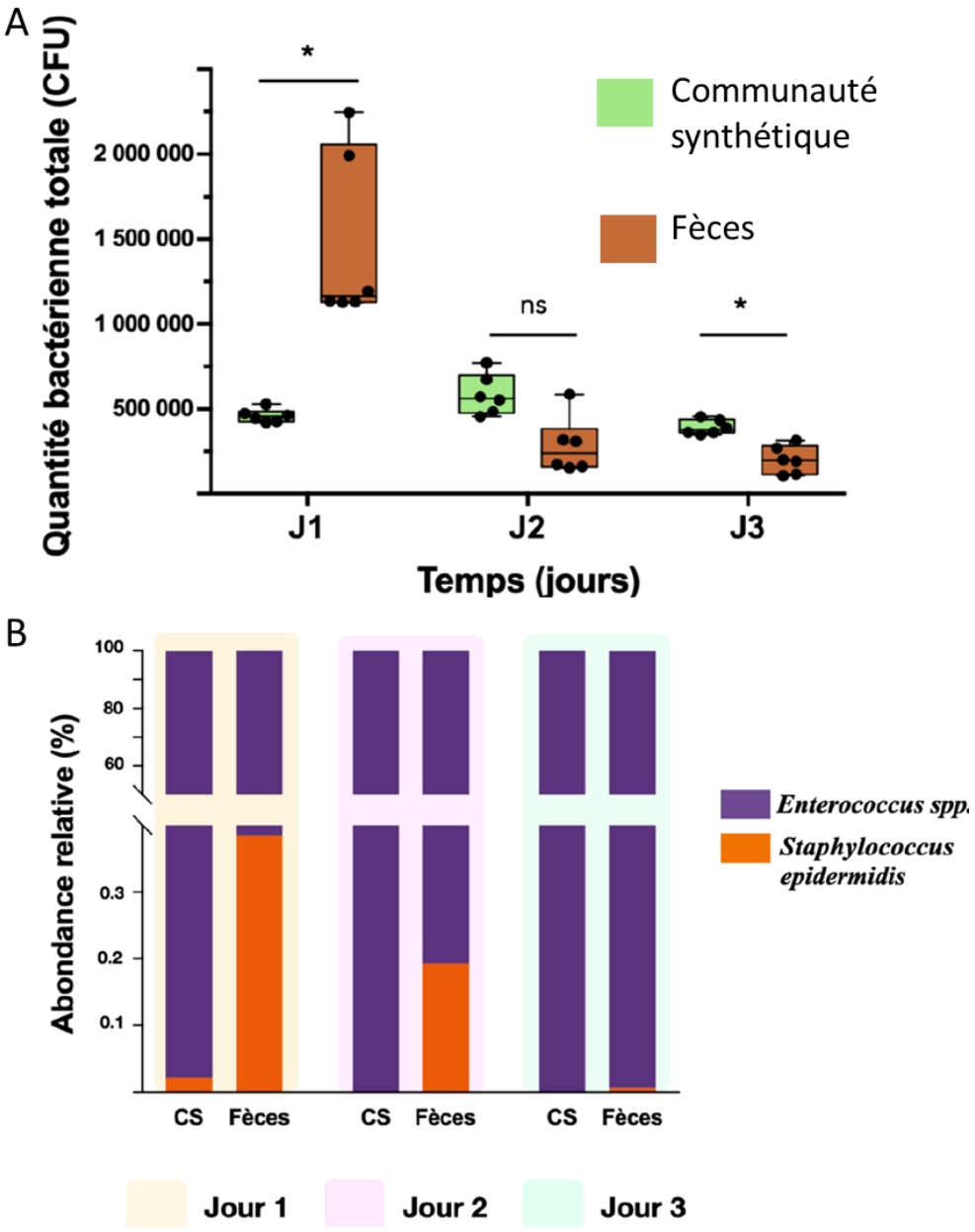


Figure 47 : Comparaison du modèle communauté synthétique et des fèces via la quantification bactérienne

A/ Quantité bactérienne totale (CFU) de la communauté synthétique (vert) et des fèces (orange) en culture pendant trois jours. Test de Wilcoxon.
B/ Abondance relative d'Enterococcus (violet) et de Staphylococcus epidermidis (orange) durant les trois jours.

Impact de *Candida albicans* et de xénobiotiques sur une communauté synthétique bactérienne correspondant à un échantillon de l'entérotype *Enterococcus*

Une communauté synthétique bactérienne a été exposée à trois xénobiotiques : dompéridone, bisphénol A (BPA) et bisphénol S (BPS) ainsi qu'à *Candida albicans*.

La quantité de bactéries pour la communauté synthétique traitée avec domperidone était plus faible au deuxième jour par rapport au groupe sans traitement (p=0.004). Cependant, elle était plus importante pour les groupes traités avec dompéridone au troisième jour par rapport au groupe non traité (p=0.004). De façon globale, une diminution de la quantité de bactéries du groupe non traité de J1 à J3 est détectée (p=0.01), mais aucune évolution pour le groupe traité avec dompéridone n'est observée **(Figure 48A)**.

Aux jours 1 et 2, une quantité plus faible de bactéries dans le groupe exposé au BPS est détectée par rapport au groupe non traité (p=0.002 et p=0.01 respectivement). Le troisième jour, les quantités bactériennes pour le groupe exposé au BPS étaient plus importantes que celles du groupe non traité (p=0.04). Une augmentation globale de la quantité bactérienne a été identifiée pour le groupe exposé au BPS du premier au dernier jour (p=0.002) **(Figure 48B)**.

Aucune différence dans la quantité bactérienne n'est retrouvée entre le groupe contrôle et le groupe exposé au BPA mais une diminution de la quantité bactérienne entre le premier et le dernier jour pour le groupe exposé au BPA (p=0.004) qui suit celle du groupe contrôle est détectée **(Figure 48C)**.

La co-culture avec *Candida albicans* n'avait montré aucune différence de quantité bactérienne entre les deux groupes pour le premier et le deuxième jour. Cependant, au troisième jour, le groupe en co-culture avec *Candida albicans* contenait une quantité supérieure de bactéries par rapport au groupe contrôle (p=0.01). Aucune différence sur la quantité bactérienne entre le premier et le dernier jour pour le groupe en co-culture avec *Candida albicans* n'est détectée **(Figure 48D)**.

Aucune différence significative n'était retrouvée dans la quantité à J1 de *Staphylococcus epidermidis* entre les groupes traités et le contrôle. Cependant, cette quantité était légèrement plus importante dans les groupes traités au BPS (0.3%) ou en co-culture avec *Candida albicans* (0.3%) en comparaison au groupe sans traitement (0.1%) **(Figure 48F, H)**. De même, elle était

diminuée de moitié dans le groupe traité avec BPA (0.05%) **(Figure 48G)** et avait une abondance proche de celle du groupe contrôle au premier jour pour le groupe avec dompéridone **(Figure 48E)**.

L'abondance de *Staphylococcus epidermidis* n'était plus détectée à partir du deuxième jour pour la communauté synthétique contrôle et devenait très faible au deuxième jour (<0.05%) pour les groupes traités ou en co-culture avec *Candida albicans*. Elle n'était plus détectée au troisième jour.

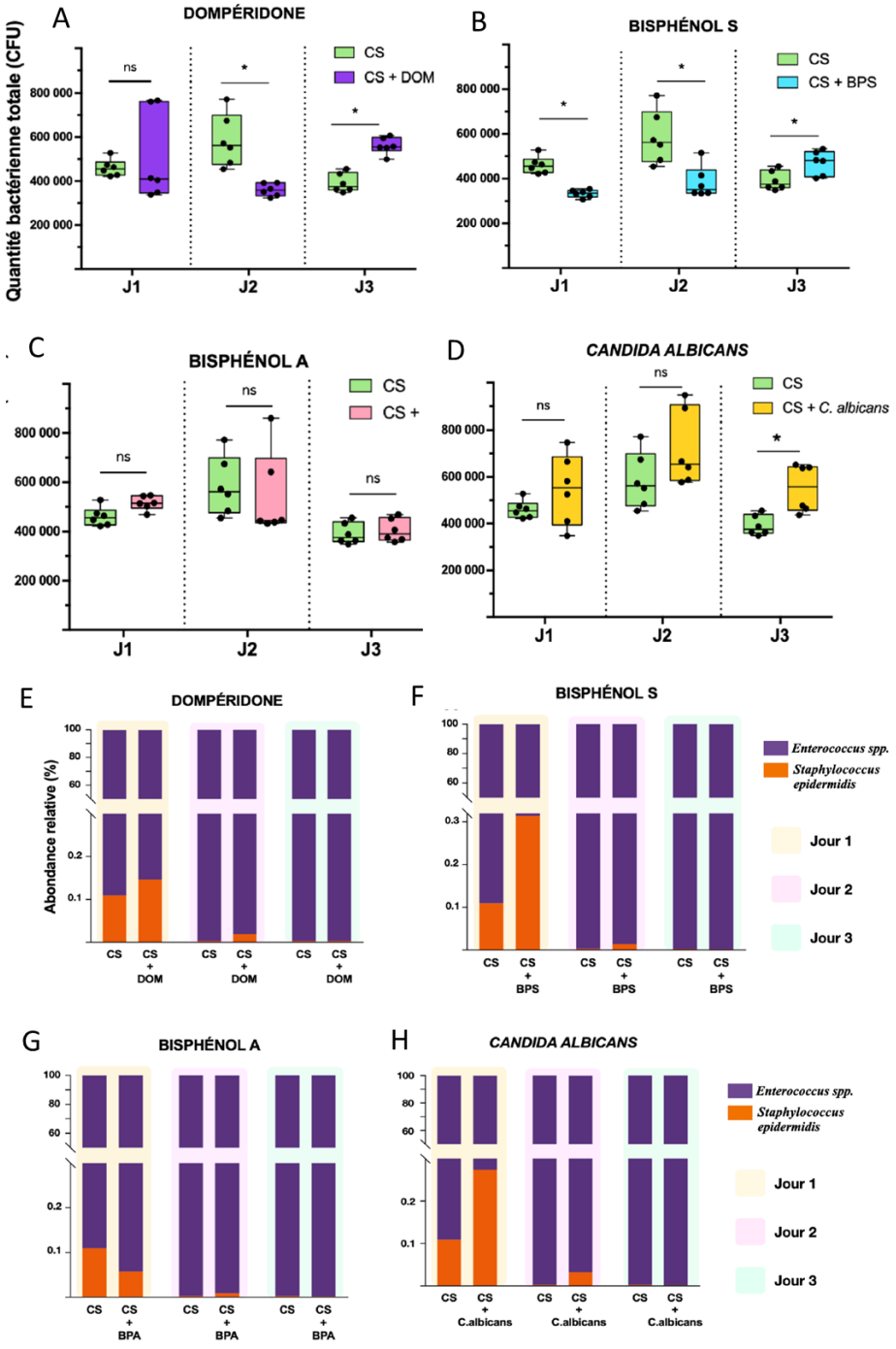


Figure 48 : Exposition aux xénobiotiques et co-culture avec Candida albicans sur des communautés synthétiques

A-D/ Quantité bactérienne totale (CFU) pour les communautés synthétiques traitées au dompéridone (A), au bisphénol S (B), au bisphénol A (C) et en co-culture avec Candida albicans (D). E-H : Abondance relative de Staphylococcus epidermidis et Enterococcus dans les communautés synthétiques traitées au dompéridone (E), au bisphénol S (F), au bisphénol A (G) et en co-culture avec Candida albicans (H). CS=Communauté synthétique ; DOM=Dompéridone ; BPS=Bisphénol S ; BPA=Bisphénol A.

3. Discussion

Nous avons pu isoler un grand nombre d'espèces détectées en métagénomique shotgun à partir de trois échantillons congelés de fèces d'enfants grands-prématurés d'entérotypes différents telles qu'*Enterobacter hormaechei, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Clostridium perfringens, Clostridium butyricum, Escherichia coli ou Staphylococcus epidermidis*. Les genres détectés en métagénomique shotgun l'étaient également en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S. Inversement, de nombreux genres à faibles abondances ont été détectés en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S mais pas en métagénomique shotgun. Cependant, deux genres bactériens détectés en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S mais pas en métagénomique de l'entérotype *Enterococcus* ont étés isolés : *Klebsiella variicola* et *Enterobacter hormaechei*. *Escherichia*, qui est le deuxième genre bactérien détecté en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S de l'entérotype *Enterobacter* avait la possibilité de croître sur le milieu BEA mais nous n'en avons pas isolé.

Nous n'avons pu isoler que l'espèce *Staphylococcus epidermidis* et pas *Staphylococcus haemolyticus* pour les entérotypes *Enterobacter* et *Enterococcus* mais ces deux genres très proches pourraient être confondus. L'espèce *Staphylococcus haemolyticus* est toutefois présente dans le microbiote intestinal des prématurés et sur les surfaces des USINs [263]. Il est donc possible que nous n'ayons pas réussi à isoler *Staphylococcus haemolyticus* dans le milieu, car ces deux espèces de *Staphylococcus* sont mannitol positif [264] et sont de couleur jaune sur le milieu Chapman sélectif utilisé et ne sont donc pas distinctes.

Nous n'avons pas réussi à isoler des souches de *Bifidobacterium*. La détection de ce genre par les deux méthodes de séquençage à des pourcentages importants appuie le fait qu'il devait être présent dans le microbiote intestinal de cet enfant. Cependant, la culture et l'isolement des *Bifidobacterium* sont difficiles, car elles sont strictement anaérobies [265]. De plus, les échantillons de fèces étaient conservés depuis plusieurs années à -80°C sans agents conservateurs, conditions non optimales pour l'isolement de souches bactériennes. Enfin, il se peut que le milieu utilisé ne fût pas assez spécifique.

La croissance des bactéries de l'échantillon de l'entérotype *Enterococcus* est plus rapide avec un milieu mixte YM+mGAM qu'avec un milieu mGAM. *Candida albicans* a une croissance plus rapide en milieu mixte par rapport au milieu YM. Cela pourrait être dû à un apport de

nutriments supplémentaire en raison du mélange de ces deux milieux. Le milieu YM contient de l'extrait de malt, absent du milieu mGAM pouvant apporter du maltose aux genres *Enterococcus* et *Streptococcus* via la maltose phosphotransférase [266] tandis que le milieu mGAM pourrait apporter de la vitamine K1 et du tryptophane à *Candida albicans*, non retrouvé dans le milieu YM.

Les communautés synthétiques sont des consortiums de deux ou plusieurs espèces microbiennes connues dans des conditions définies, mais peuvent ne pas refléter la réelle complexité et diversité du microbiote [267]. Les souches utilisées peuvent ne pas être représentatives de la diversité du microbiote intestinal. C'est pour cela que nous avons voulu réaliser cette communauté à partir de bactéries isolées et avec des ratios au plus proche de ce qui est observé en métagénomique shotgun. Les communautés synthétiques sont généralement cultivées dans des environnements de laboratoire contrôlés, ce qui peut différer des conditions réelles et rendant plus complexe le maintien à long terme des communautés synthétiques.

Lors des analyses de qPCR, les espèces *Enterococcus faecalis et Enterococcus faecium* n'ont pas pu être distinguées car nous n'avons pas réussi à obtenir des amorces assez spécifiques pour les discriminer.

Cependant, nous avons pu remarquer que *Staphylococcus* n'était, assez rapidement, plus détecté dans les fèces, les communautés synthétiques et les communautés synthétiques exposées aux xénobiotiques ou en co-culture avec *Candida albicans*. Nous avions vu que chaque bactérie poussait correctement dans le milieu mGAM et qu'il ne s'agissait donc pas d'une sélection du milieu mais potentiellement d'une compétition entre espèces étant donné que la quantité de *Staphylococcus* de départ est très faible. Le genre *Enterococcus faecalis* a un potentiel inhibiteur sur une espèce de *Staphylococcus* [268]. De plus, la quantité de départ de *Staphylococcus* est assez variable en début d'expérience. Le faible pourcentage de cette bactérie au sein de la communauté synthétique est compliqué à mettre en place et nécessiterait une mise au point. Toutefois, le pourcentage de *Staphylococcus* dans les fèces au jour 1 correspond bien au pourcentage retrouvé en métagénomique globale. On ne peut pas conclure que la disparition de *Staphylococcus* soit due à l'impact des xénobiotiques et à la présence de *Candida albicans* sachant que les groupes contrôles voient également ce genre diminuer. Cependant, la disparition de *Staphylococcus* est plus lente pour les groupes en co-

culture avec *Candida albicans* et exposés au BPS mais ces deux groupes au J1 avaient plus de 2 fois plus de *Staphylococcus* que le groupe contrôle donc la diminution de *Staphylococcus* plus lente peut être due à la quantité plus importante du début. Cependant, les groupes exposés aux BPA et au dompéridone au J1 avaient environ la même quantité de *Staphylococcus* avec une plus lente disparition de ce genre au J2 donc potentiellement dû à la présence de ces xénobiotiques. D'autres études sont toutefois nécessaires pour confirmer ces observations.

Avec l'exposition à la dompéridone et *Candida albicans* la quantité bactérienne ne change pas au cours du temps. En revanche, la quantité bactérienne diminue dans le groupe contrôle au cours du temps. La dompéridone et *Candida albicans* pourraient maintenir une stabilisation de la culture. Il est toutefois montré que la dompéridone influence le microbiote intestinal en diminuant la prolifération bactérienne [269].

Le bisphénol S impacte la quantité bactérienne dès le premier jour avec une diminution de la quantité bactérienne à l'inverse de bisphénol A qui n'a pas d'impact. Le BPS augmente la quantité bactérienne au cours du temps et chaque jour par rapport au groupe contrôle en augmentant la quantité d'*Enterococcus*. Ces résultats suggèrent potentiellement une adaptation d'*Enterococcus* à ce stress par le biais de pompes d'efflux, de transporteurs ou d'une dégradation des xénobiotiques [270]. Le BPS est connu pour avoir un impact sur le microbiote intestinal du poisson-zèbre en faisant disparaître certaines espèces [271]. Le bisphénol A n'a pas d'impact différent du groupe contrôle, mais est connu pour induire une dysbiose du microbiote intestinal [272].

4. Conclusion

La métagénomique shotgun est plus fiable au niveau de l'espèce [273] et nos résultats montraient une plus grande similitude entre les bactéries détectées en métagénomique shotgun et les bactéries isolées plutôt qu'avec les bactéries détectées en séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S. Le séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S indiquait également des genres en très faible quantité ni retrouvés dans la métagénomique shotgun ni dans l'isolement des bactéries.

Le BPS aurait un impact plus fort sur le microbiote intestinal que le BPA, il est donc important de comprendre son impact sur le microbiote intestinal. Remplacer le BPA par le BPS dans la formation du plastique n'améliorerait pas l'impact du plastique sur le microbiote intestinal.

DISCUSSION

L'étude du microbiote intestinal des enfants nés grands prématurés revêt une importance considérable dans le domaine de la santé infantile. En raison de leur naissance prématurée, ces nourrissons ont un système immunitaire et un développement intestinal encore immature, ce qui peut les rendre vulnérables à diverses complications de santé à court et long terme. Le microbiote intestinal en début de vie joue un rôle crucial dans le développement du système immunitaire, la digestion, l'absorption des nutriments et même la régulation de l'inflammation. En étudiant une cohorte de 73 enfants nés grands prématurés, nous avons entrepris d'explorer la relation entre le microbiote intestinal et l'hôte chez ces nourrissons.

Étudier ce lien entre le microbiote intestinal et l'hôte à travers l'analyse des fèces présente plusieurs avantages. Tout d'abord, les fèces fournissent un échantillon non invasif et facilement accessible pour évaluer la composition du microbiote intestinal. Étant donné la fragilité de la santé chez les enfants grands prématurés, cela revêt une importance considérable. Les fèces permettent d'obtenir des informations sur la diversité et la composition bactérienne ainsi que les interactions et les dynamiques entre les microorganismes présents dans le tractus gastro-intestinal. Elles reflètent donc les interactions entre le microbiote et l'hôte, car elles contiennent des métabolites sécrétés par les cellules intestinales et les microorganismes. L'analyse des fèces offre donc une fenêtre sur la communication complexe entre le microbiote et l'hôte, permettant de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans la régulation du métabolisme, de l'immunité et même du développement cérébral.

Une étude récente menée en 2021 a mis en évidence que le métabolome fécal était davantage corrélé au microbiote intestinal à l'âge de 6 semaines qu'à l'âge de 1 an, suggérant un effet temporel variable. Cette étude a identifié un nombre plus élevé de métabolites bien prédits à 6 semaines qu'à 1 an grâce à une analyse de prédiction fonctionnelle du métabolisme des communautés microbiennes [274]. Ces résultats soulignent l'importance d'étudier précocement l'interaction entre le métabolome fécal et le microbiote intestinal chez les nourrissons afin d'éviter les biais liés à la nutrition, qui peut également influencer la présence de métabolites variés. Cependant, au bout de 24 semaines, le microbiote se rétablit et les traces de facteurs tels que le mode d'accouchement s'atténuent. Le méconium, première fèces des enfants, n'est pas toujours représentatif du métabolisme et de la composition bactérienne chez

les enfants. Il est formé principalement à partir de sécrétions fœtales et de liquide amniotique ingéré par le fœtus. Les principaux métabolites présents dans le méconium sont soit produits par le fœtus lui-même, soit issus d'un transfert placentaire [275]. Il peut donc refléter les conditions *in utero* plutôt que l'établissement complet du microbiote intestinal postnatal et peut être influencé par le régime alimentaire de la mère pendant la grossesse. Bien que l'étude du méconium puisse offrir des aperçus intéressants sur le développement précoce du microbiote intestinal, il ne doit pas être considéré comme représentatif du métabolisme et de la composition bactérienne à long terme chez les enfants. Les échantillons de fèces collectés par la suite peuvent fournir une image plus complète et dynamique du microbiote et de son rôle dans la santé humaine. C'est pour cela que nous avons voulu analyser le microbiote intestinal des enfants grands prématurés à 1 mois de vie qui était le premier prélèvement de fèces dont nous disposions après le méconium.

Nous avons souhaité appliquer une approche multi-omique en combinant des informations provenant de différentes méthodes telles que la métabolomique, la métagénomique et la transcriptomique. L'avantage de cette approche est qu'elle permet une compréhension plus complète des échantillons biologiques avec une intégration de données qui peut conduire à une validation croisée plus robuste des résultats en identifiant des corrélations et des relations entre les différentes molécules et les processus biologiques. L'approche multi-omique nous a permis de répondre à nos objectifs 1 et 2 c'est-à-dire **d'étudier la mise en place du dialogue microbiote intestinal-hôte** et la **réponse de l'hôte**. Nous avons pu mettre à jour des modèles sur l'impact des facteurs/conditions lors de la naissance sur le microbiote intestinal et son implication dans le métabolisme à 1 mois des enfants nés grands prématurés.

Enfin, des différences entre les résultats des analyses séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S, de métagénomique shotgun et d'isolement bactérien au sein du même échantillon ont étés observées. Ces constatations soulignent la complexité de la détermination précise de la composition du microbiote, en particulier pour les bactéries peu abondantes. De plus, la métagénomique globale peut fournir une identification fiable jusqu'au niveau de l'espèce [273] ce qui est rarement le cas pour le séquençage du gène codant l'ARNr de l'amplicon de l'ARNr 16S. De plus, les résultats de l'analyse du séquençage de l'amplicon de l'ARNr 16S peuvent varier en fonction des bases de données utilisées. Dans l'ensemble, nos résultats indiquaient une meilleure concordance entre les bactéries détectées par la métagénomique globale et celles isolées des fèces, par rapport à celles identifiées par le séquençage de l'amplicon de

l'ARNr 16S. Les bactéries du microbiote essentiellement anaérobies sont également difficilement cultivables c'est pourquoi les analyses de séquençage sont prédominantes. Il est donc crucial de tenir compte de ces biais de techniques lors de l'analyse de la composition du microbiote intestinal. Cependant, en combinant ces différentes méthodes, nous avons pu obtenir des informations concernant la composition et la fonctionnalité du microbiote intestinal des enfants nés grands prématurés à l'âge de 1 mois. Il est à noter que nous avons réussi à isoler un grand nombre de bactéries à partir de fèces congelées depuis plusieurs années, sans conservation au glycérol. Dans ce contexte, il convient toutefois de considérer que la diversité bactérienne pourrait avoir évolué par rapport à des échantillons de fèces fraîches.

Au sein de notre sous-cohorte, les 73 enfants nés grands prématurés à 1 mois étaient répartis en trois clusters. Le Cluster A était composé des enfants de l'entérotype *Escherichia*. Le Cluster B était composé des enfants des entérotypes *Clostridium* et *Enterobacter/Klebsiella* et le Cluster C était composé des enfants des entérotypes *Staphylococcus* et *Enterococcus* ainsi que de l'entérotype comprenant les enfants avec une très faible charge bactérienne. Le Cluster A est considéré comme le plus mature dû à l'âge plus avancé des enfants le composant et le Cluster C comme le plus immature [28]. Des études ont montré que le microbiote intestinal des enfants prématurés était différent de celui d'enfants nés à terme avec une abondance plus importante des *Enterococcus, Enterobacter* ou *Staphylococcus* mais à notre connaissance, peu d'études se sont intéressées aux variables/facteurs expliquant la formation des entérotypes et leurs conséquences métaboliques.

L'âge gestationnel avancé, le **poids plus élevé** et une **naissance par voie basse** induisent, chez les grands prématurés de cette cohorte, un microbiote intestinal majoritairement composé d'*Escherichia* à 1 mois. L'étude de Rozé *et al* décrit ces facteurs de naissance comme favorables pour faire partie du Cluster A [28]. L'âge gestationnel avancé induit une plus forte probabilité d'accouchement par voie basse avec en conséquence un poids plus élevé [276,277]. Lors d'une naissance par voie basse, le nouveau-né entre en contact direct avec le microbiote vaginal et fécal de la mère, facilitant ainsi une première colonisation appropriée avec des bactéries différentes de celles observées lors d'une naissance par césarienne. Une étude

indique que chez les enfants nés par voie basse, 74,39% du microbiote précoce chez les nourrissons est issu de souches microbiennes maternelles contre seulement 12,56% chez les enfants nés par césarienne [59]. Le genre *Escherichia* fait partie des bactéries potentiellement acquises à la naissance par un accouchement par voie basse [59]. **Une alimentation au lait maternel** au cours des premiers jours de vie va induire une présence majoritaire d'*Escherichia* dans le microbiote intestinal des enfants à 1 mois. Cette alimentation introduit des oligosaccharides spécifiques du lait maternel (HMOs) que le nouveau-né ne peut pas utiliser comme nutriments, mais qui agissent comme prébiotiques pour *Bifidobacterium*, un élément majeur du microbiote intestinal des nourrissons nés à terme, mais également *Escherichia* via notamment le 2'-Fucosyllactose (2'FL) [278]. De plus, l'établissement d'un **transit intestinal régulier** dès la première semaine de vie influe sur le microbiote intestinal des nourrissons à 1 mois, favorisant une augmentation notable d'*Escherichia* à cet âge. Contrairement aux conclusions de Rozé *et al* [28], nous n'avons pas observé de corrélation entre la pratique du peau à peau et la composition du microbiote intestinal à 1 mois. Cependant, en sélectionnant les enfants de notre cohorte, nous avons constaté que le pourcentage d'enfants ayant eu des sessions de peau à peau dans le Cluster C était similaire à celui du Cluster A, ce qui différait de ce qui avait été observé dans l'étude de Rozé *et al* [28].

Ainsi, une variété de facteurs pendant la première semaine de vie exerce une influence significative sur le microbiote intestinal entraînant une abondance d'*Escherichia* à 1 mois chez les nourrissons nés grands prématurés. Cette interaction complexe peut engendrer un profil métabolique intestinal particulier dans cette population.

Leur production d'énergie par le biais du **métabolisme du cycle de l'acide tricarboxylique** (TCA) semblait plus efficace notamment, car *Escherichia* est positivement corrélé avec le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), qui est un facteur limitant pour le cycle du TCA. Le genre *Escherichia* peut produire du NAD [279] et le gène eucaryote *nampt* impliqué dans la voie de production du NAD de l'hôte est plus exprimé dans le Cluster A.

La production **d'histamine** était plus importante chez les enfants du Cluster A. Le genre *Escherichia* peut produire de l'histamine dans le microbiote intestinal grâce à leur activité d'histidine décarboxylase [280,281]. L'histamine est un acide gamma-aminobutyrique (GABA), essentiels aux processus neurodéveloppementaux et à la neurophysiologie [128].

La production **d'indole et de ses dérivés** sera plus élevée dans ce cluster, notamment grâce à la capacité d'*Escherichia* à cataboliser le tryptophane en indolelactate par exemple [241]. De plus, le métabolite indoxyl-3-sulfate, dérivé de l'indole, sera présent en quantité supérieure chez les enfants ayant connu un transit intestinal régulier dès la première semaine de vie et ceux du Cluster A. Ce métabolite est reconnu pour ses bienfaits sur la maturation du tractus digestif et les fonctions cérébrales. *Escherichia*, abondamment présent au début de la vie, est un producteur d'indole [241] ce qui en fait un bon primo-colonisateur pour le développement du métabolisme du tryptophane. Les métabolites de la voie de catabolisme du tryptophane par la **kynurénine** sont également plus abondants. La régulation de la voie de la kynurénine est importante tout au long de la vie, mais surtout pendant les périodes sensibles du développement neurologique précoce [282]. Elle est importante dans la modulation du cerveau en développement.

De manière similaire à l'indoxyl-3-sulfate, le **triméthylamine-N-oxyde** (TMAO) est présent en quantité plus élevée chez les enfants ayant connu un transit régulier dès la première semaine de vie ainsi que chez ceux du Cluster A. Le métabolisme de la carnitine, incluant la formation de TMAO, est plus prononcé dans le Cluster A. Cette dégradation est médiée par les enzymes cntA/B, présentes chez *Escherichia* [232,233]. Le TMAO est associé aux troubles cognitifs et aux dysfonctionnements mitochondriaux [283]. Son rôle dans le microbiote intestinal des nouveau-nés n'est pas encore complètement élucidé.

Un effet de ce microbiote sur la réponse de l'hôte est observé. La **calprotectine** ainsi que la **cathélicidine**, sont davantage exprimées chez les enfants du Cluster A. La présence accrue de calprotectine fécale à 3 mois est positivement associée avec les capacités motrices, les compétences socio-émotionnelles et le langage mesuré à 2 ans par l'échelle de Bayley [257]. Cependant, il n'y a pas d'influence de l'augmentation de la calprotectine sur la santé neurologique des adultes atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [258] ce qui suggère que l'effet bénéfique sur la santé neurologique est spécifique au développement infantile et ne persiste pas à l'âge adulte. Il est possible que cette augmentation physiologique de l'immunité médiée par la calprotectine soit nécessaire pour le développement de l'individu en croissance.

Enfin, nos résultats concordent avec ceux de Rozé *et al* [28], démontrant l'influence bénéfique de l'abondance d'*Escherichia* dans le microbiote intestinal à l'âge de 1 mois des enfants nés

grands prématurés sur le développement neurologique global évalué par un **score d'ASQ** à 2 ans. Ceci pourrait être attribué au métabolisme spécifique de ce genre bactérien, lequel semble jouer un rôle dans le développement neurologique.

Une forte corrélation négative est observée entre *Escherichia* et *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal des nourrissons nés grands prématurés à l'âge d'un mois. Cette relation inverse entre *Staphylococcus* et *Escherichia* pourrait être attribuée à une activité antibiotique exercée par *Escherichia* sur *Staphylococcus* par le biais des îlots pks [284].

De plus, les enfants appartenant au Cluster C ont connu des conditions de naissance inverse avec celles du Cluster A. En effet, les enfants affichant une proportion accrue de *Staphylococcus* dans leur microbiote intestinal à l'âge d'un mois présentent un **âge gestationnel le plus précoce** et sont plus susceptibles d'être nés par **césarienne**. Ces observations confirment les conclusions préalablement établies par Roze *et al* [28]. L'âge gestationnel plus précoce est lié avec une plus forte probabilité de naissance par césarienne [277]. Contrairement aux enfants nés par voie basse, les nourrissons nés par césarienne entrent en contact dès leur naissance avec la peau du personnel soignant et de leurs parents. Les communautés bactériennes présentes dans le microbiote intestinal de ces nourrissons sont comparables à celles présentes sur la peau de leur mère et dominées par *Staphylococcus* [59]. De plus, la diversité bactérienne du microbiote à la naissance chez les enfants nés par césarienne est moindre que chez ceux nés par voie basse, mais semble se rétablir à l'âge d'un mois [59]. Effectivement, nous avons observé une diminution de la diversité bactérienne chez les enfants du Cluster C, mais pas chez les enfants nés par césarienne à 1 mois. *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce que nous avons pu isoler des échantillons de fèces de la cohorte. C'est effectivement une bactérie commensale de la peau retrouvée dans le microbiote intestinal des enfants nés par césarienne [285].

Aucun lien n'a été établi entre l'abondance de *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal des grands prématurés à l'âge d'un mois et leur poids de naissance ou leur mode de nutrition. Cependant, une étude suggère que *Staphylococcus* est présent dans le lait maternel [286] même si ce genre ne consomme pas d'HMO [278]. La qualité du transit à 1 semaine de vie n'est pas associée à la présence de *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal à 1 mois tandis que Roze *et al* [28] avait démontré une diminution du risque d'appartenance à l'entérotype *Staphylococcus* avec un transit régulier.

Ainsi, l'âge gestationnel précoce conduisant souvent à un mode d'accouchement par césarienne induit une quantité plus abondante de *Staphylococcus* dans le microbiote intestinal des nourrissons nés grands prématurés à 1 mois. De la même façon qu'*Escherichia*, *Staphylococcus* à 1 mois va induire un profil métabolique intestinal particulier au sein du Cluster C. En raison de l'opposition de leurs genres majoritaires dans le microbiote intestinal à 1 mois et des facteurs périnataux desquels ils découlent, les Clusters A et C vont avoir un métabolisme différent à 1 mois de vie.

Une altération de **l'absorption des lipides et de la vitamine D** a été observée à la fois dans ce cluster et dans le groupe d'âge gestationnel le plus précoce, ce qui se manifeste notamment par une libération accrue de ces éléments dans les fèces. On constate une corrélation positive entre la présence de *Staphylococcus* et les acides biliaires secondaires dans les fèces, ce qui suggère une fuite de ces acides biliaires. *Staphylococcus* est reconnu pour être associé à un profil de mauvaise absorption des lipides et il est établi que les enfants prématurés ont une capacité d'absorption des lipides et des vitamines plus limitée par rapport aux enfants nés à terme [213,239]. Cette mauvaise absorption semble également être associée avec l'âge le plus précoce, facteur qui joue un rôle déterminant pour la prédominance de *Staphylococcus* dans le microbiote à 1 mois de vie. Ces lipides peuvent être transportés vers le cerveau où ils sont réutilisés comme précurseur pour la biosynthèse *de novo* des lipides cérébraux [287]. La vitamine D est associée à la fonction cognitive, influence le développement du cerveau et des neurones et peut moduler les réponses immunitaires de l'hôte [288].

Une altération du **métabolisme du TCA** a été identifiée avec des corrélations positives entre *Staphylococcus* et les métabolites de début de cycle du TCA. Cela pourrait être attribué à une production réduite de NAD, un cofacteur essentiel dans ce processus. Le Cluster C présente la quantité la plus faible de NAD entre les clusters. Ce composé peut être généré à la fois par des bactéries et par l'organisme hôte. Le gène *nampt*, responsable d'une production de NAD chez l'hôte, est moins exprimé dans ce cluster et *Staphylococcus* n'est pas détecté comme producteur de NAD inversement à *Escherichia*.

Une augmentation de la **tryptamine** dans les fèces du Cluster C est détectée. La tryptamine peut inhiber la voie de la kynurénine ayant un impact bénéfique sur le développement neurologique [282]. La détection de ce métabolite dans les fèces revêt une importance cruciale,

car elle reflète sa production au sein du microbiote intestinal, contrairement à la tryptamine présente dans le sang qui n'est pas influencée par la production du microbiote intestinal [289].

Le Cluster C est également composé **d'*Enterococcus*** en genre majoritaire. Il est retrouvé dans le microbiote intestinal des enfants à 1 mois ayant eu une **nutrition parentérale à la naissance**.

Le dernier entérotype compris dans le Cluster C est l'entérotype **dépourvu de bactéries détectables (Entérotype 6)**. Nous n'avons pas pu déterminer de liens avec les facteurs périnataux. Cependant, nos observations ont démontré que l'absence de bactéries détectables dans le microbiote intestinal à 1 mois conduit à une réduction de l'expression de la calprotectine au début de la vie pouvant entraîner une altération de l'immunité physiologique. L'expression de la **calprotectine** et de la **cathélicidine** ne semble pas impactée par la présence de *Staphylococcus* et d'*Enterococcus* ainsi que par l'appartenance des enfants au Cluster C.

Dans cette cohorte d'enfants nés grands prématurés nous n'avons pas pu démontrer un impact significatif sur l'ASQ à 2 ans des entérotypes *Staphylococcus, Enterococcus* et de l'entérotype 6 mais Roze *et al* [28] avaient pu montrer un impact néfaste de ces entérotypes sur l'ASQ, la mortalité et la morbidité conformément à l'association décrite entre un âge gestationnel bas et un retard de développement neurologique dans la cohorte EPIPAGE 2 [28].

Le genre *Klebsiella*, l'un de ceux prédominant dans le Cluster B, n'avait aucun lien avec les variables périnatales ni avec le métabolisme à l'âge d'un mois.

D'autre part, le genre *Enterobacter*, également prédominant dans le Cluster B, est observé en plus grande abondance dans le microbiote des nourrissons âgés d'un mois lorsqu'ils ont été nourris **par voie parentérale**.

Ne pas avoir eu **d'antibiothérapie secondaire** chez les grands prématurés de cette cohorte était associé à un microbiote intestinal majoritairement composé de *Clostridium* à 1 mois. Ces enfants avec un microbiote enrichi en *Clostridium* sont également retrouvés dans le Cluster B. Ce genre, ainsi qu'*Escherichia* et *Faecalibacterium*, est également trouvé en plus grande abondance chez les enfants ayant eu un **transit régulier** au cours de la première semaine. Il serait intéressant d'analyser l'évolution des microbiotes entre les deux groupes en fonction du transit dès la première semaine, voire dès le méconium, afin de déterminer si la composition

évolue de manière distincte entre les deux groupes et si cette différence s'estompe avec le temps.

Les espèces de *Clostridium* que nous avons pu isoler des fèces d'enfants de la cohorte sont *Clostridium perfringens* et *Clostridium butyricum*. Cette dernière pourrait inhiber certaines bactéries pathogènes [181]. Ces deux espèces sont connues comme **productrices de p-crésol** [290,291] que nous retrouvons en abondance plus importante dans le métabolome fécal des enfants nés à 1 mois de l'entérotype *Clostridium*. Une quantité importante de p-crésol modifierait le métabolisme cérébral de la dopamine et exacerberait les troubles neurologiques chez les souris [292].

De plus, cette bactérie semble avoir un impact sur le métabolisme du tryptophane à travers la voie des **ligands AhR**. Il y a une plus forte abondance de ligands AhR dans le microbiote intestinal des enfants du Cluster B. Certaines espèces de *Clostridium* peuvent cataboliser le tryptophane en indolelactate [241] retrouvé en plus grande abondance dans les Clusters A et B. *Clostridium* et *Escherichia* peuvent également cataboliser le tryptophane en indoleactetate [241] retrouvé en plus grande abondance dans le Cluster B. Les ligands AhR contribuent à l'activation d'IL-22, au contrôle des lymphocytes T, à la diminution de la perméabilité intestinale et au renouvellement épithélial [293,294]. La signalisation AhR joue un rôle dans l'axe intestin-cerveau grâce à divers mécanismes, notamment l'activation de l'AhR dans les cellules du système nerveux central par des métabolites microbiens, ainsi que la modulation, médiée par l'AhR, des cellules immunitaires qui migrent vers le système nerveux central [293].

Dans cette cohorte d'enfants grands prématurés nous n'avons pas pu démontrer un impact significatif sur l'ASQ à 2 ans des entérotypes composant le Cluster B. Roze *et al* [28] n'ont pas pu démontrer d'impact de ces entérotypes sur l'ASQ. Ce cluster est assez hétérogène au niveau du devenir des enfants grands prématurés de la cohorte.

Nous avons examiné l'impact des variables périnatales sur le microbiote intestinal à l'âge d'un mois et le microbiote intestinal à cet âge semble fournir des indications sur son métabolisme microbien ainsi que sur le développement neurologique global à l'âge de 2 ans. Il est clair que les modifications du microbiote en début de vie ont des répercussions importantes sur le développement neurologique de l'enfant. D'autres facteurs non documentés dans les variables périnatales de la cohorte EPIPAGE2 pourraient également influencer le microbiote et ses

interactions avec l'hôte et c'est pour cela nous avons cherché à comprendre l'effet de certains xénobiotiques, auxquels les enfants prématurés pourraient être exposés, et de *Candida albicans* (champignon majoritaire dans le microbiote intestinal des enfants prématurés) sur le microbiote intestinal. Lors d'un projet de stage de Master 2, nous avons entrepris une étude ciblée sur plusieurs xénobiotiques, notamment la dompéridone (un antiémétique administré aux mères pour stimuler la lactation), le bisphénol A (BPA) et le bisphénol S (BPS), ce dernier étant présent dans le matériel médical en plastique tel que les couveuses et les sondes. Nous avions constaté la présence de la dompéridone dans les fèces de certains enfants prématurés de notre cohorte.

En utilisant des communautés synthétiques recréant le microbiote intestinal d'un enfant du Cluster C, nous avons obtenu des résultats préliminaires sur l'impact de ces xénobiotiques sur le microbiote intestinal. Par exemple, la dompéridone et *Candida albicans* semblent stabiliser la quantité totale de bactéries dans ces communautés synthétiques. Paradoxalement, le BPA n'a pas eu d'effet sur les bactéries de la communauté synthétique, contrairement au BPS qui a entraîné une augmentation de la quantité bactérienne au fil du temps. Il est à noter que le BPA est en cours de remplacement dans les produits en plastique en raison de sa toxicité potentielle par le BPS. Cependant, nos résultats préliminaires indiquent une influence potentiellement plus importante du BPS que du BPA sur le microbiote intestinal. Des études supplémentaires sont nécessaires pour parvenir à des conclusions définitives sur cet impact.

Cette étude présente des limites. Nous avons examiné l'impact de ces xénobiotiques à une seule dose et sur une seule communauté synthétique, ce qui ne représente qu'un seul individu de la cohorte. Pour obtenir des résultats plus robustes, il serait nécessaire de tester différentes concentrations de ces xénobiotiques sur différentes communautés synthétiques ou même directement sur diverses souches bactériennes isolées à partir des échantillons de fèces. De plus, une étude plus étendue dans le temps serait bénéfique pour évaluer l'évolution des effets des xénobiotiques. Il serait également intéressant d'explorer la co-culture bactérienne avec *Candida albicans* en présence de ces xénobiotiques. Cela pourrait nous fournir des informations plus précises sur les interactions complexes entre les microorganismes et les xénobiotiques, ainsi que sur leurs effets combinés sur le microbiote intestinal.

Il est pertinent de noter que cette thèse comporte quelques limitations. La sélection des échantillons basée sur des variables périnatales pourrait influencer les résultats obtenus. L'analyse du microbiote d'un seul échantillon à 1 mois de vie ne montre pas l'évolution et la dynamique du microbiote intestinal des enfants. Pour obtenir une vue plus complète, il serait intéressant d'étudier cette dynamique au sein de chaque cluster. Cependant, malgré ces limitations, l'étude a réussi à mettre en évidence des différences métaboliques au sein de chaque cluster en utilisant des échantillons non invasifs tels que les fèces. Les biomarqueurs potentiels pour le développement neurologique global à l'âge de 2 ans pourraient être déterminés à partir des échantillons de fèces. Une voie intéressante pour approfondir la compréhension de ces différences métaboliques serait d'examiner l'expression des transporteurs de la tryptamine et des lipides, par exemple. Cela pourrait aider à confirmer si une augmentation de leur excrétion dans les fèces est due à un manque d'absorption ou à une production accrue.

Pour la suite de ce projet, il serait important d'étendre l'analyse en isolant davantage de souches bactériennes à partir des échantillons de fèces. Tester les hypothèses relatives au métabolisme sur des modèles cellulaires d'entérocytes matures (HT29, Caco2...) ou immatures (CCD 841 CoN) ou sur des modèles *in vivo* pourrait permettre de déterminer comment et dans quelle mesure les différences métaboliques pourraient influencer la maturation du système digestif et, en conséquence, le développement neurologique global. Cette perspective ouvre la voie à de nouvelles études approfondies qui pourraient aider à élucider les liens entre le microbiote intestinal en début de vie, le métabolisme bactérien et les résultats neurologiques à plus long terme et la réponse de l'hôte.

CONCLUSION

L'identification de trois clusters distincts au sein de la sous-cohorte a révélé des profils microbiens spécifiques associés à chaque groupe. Cela met en lumière la nécessité de comprendre les mécanismes sous-jacents à la formation de ces entérotypes et leurs implications pour la santé des nourrissons prématurés.

Cette étude a mis en évidence plusieurs facteurs de la première semaine de vie influençant la composition et le métabolisme du microbiote intestinal chez les enfants nés grands-prématurés à l'âge de 1 mois ainsi que l'impact sur le neurodéveloppement global. Nous avons observé une mise en place du **dialogue microbiote-hôte** différente en fonction de chaque cluster via une **méthode non invasive** (fèces). Les métabolismes microbiens de la carnitine, du cycle du TCA, du tryptophane, du p-crésol, de l'histidine et des acides biliaires secondaires diffèrent en fonction de la composition du microbiote intestinal est sont associés à des bactéries/clusters. Le Cluster A, considéré comme le plus mature, présente un métabolisme bactérien qui semble avoir des effets bénéfiques sur le développement neurologique **(Figure 49)**. En revanche, le Cluster C, représentant le groupe le moins mature, est associé à un métabolisme bactérien ayant potentiellement des impacts négatifs sur le neurodéveloppement **(Figure 49)**. Le Cluster B montre une plus grande hétérogénéité dans son métabolisme en relation avec le neurodéveloppement. De plus, nous avons pu montrer, via l'expression de la calprotectine, une **réponse de l'hôte** à la composition du microbiote. Cette étude pourrait permettre de moduler le microbiote intestinal pour optimiser le neurodéveloppement des enfants nés prématurés. Par exemple, un enfant né par césarienne pourrait être exposé via la nutrition, à des souches d'*Escherichia* ou encore, un microbiote très pauvre en bactéries à 1 mois pourrait être supplémenté par des bactéries probiotiques pour permettre une meilleure maturation de l'immunité physiologique via la calprotectine.

Cependant, il est essentiel de continuer à approfondir ces observations et à clarifier les mécanismes précis par lesquels les bactéries et leurs métabolites interagissent avec le système nerveux en développement.

Cette étude a également permis de formuler des hypothèses sur les effets potentiels de la dompéridone, du bisphénol A et S, ainsi que de la co-culture avec *Candida albicans* sur les communautés microbiennes synthétiques. Bien que ces résultats préliminaires suggèrent des

interactions complexes entre ces xénobiotiques et les communautés microbiennes, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer et approfondir ces observations. Les conclusions tirées de ces hypothèses pourraient potentiellement fournir des informations précieuses sur les effets des expositions environnementales et médicamenteuses sur le microbiote intestinal des enfants prématurés.

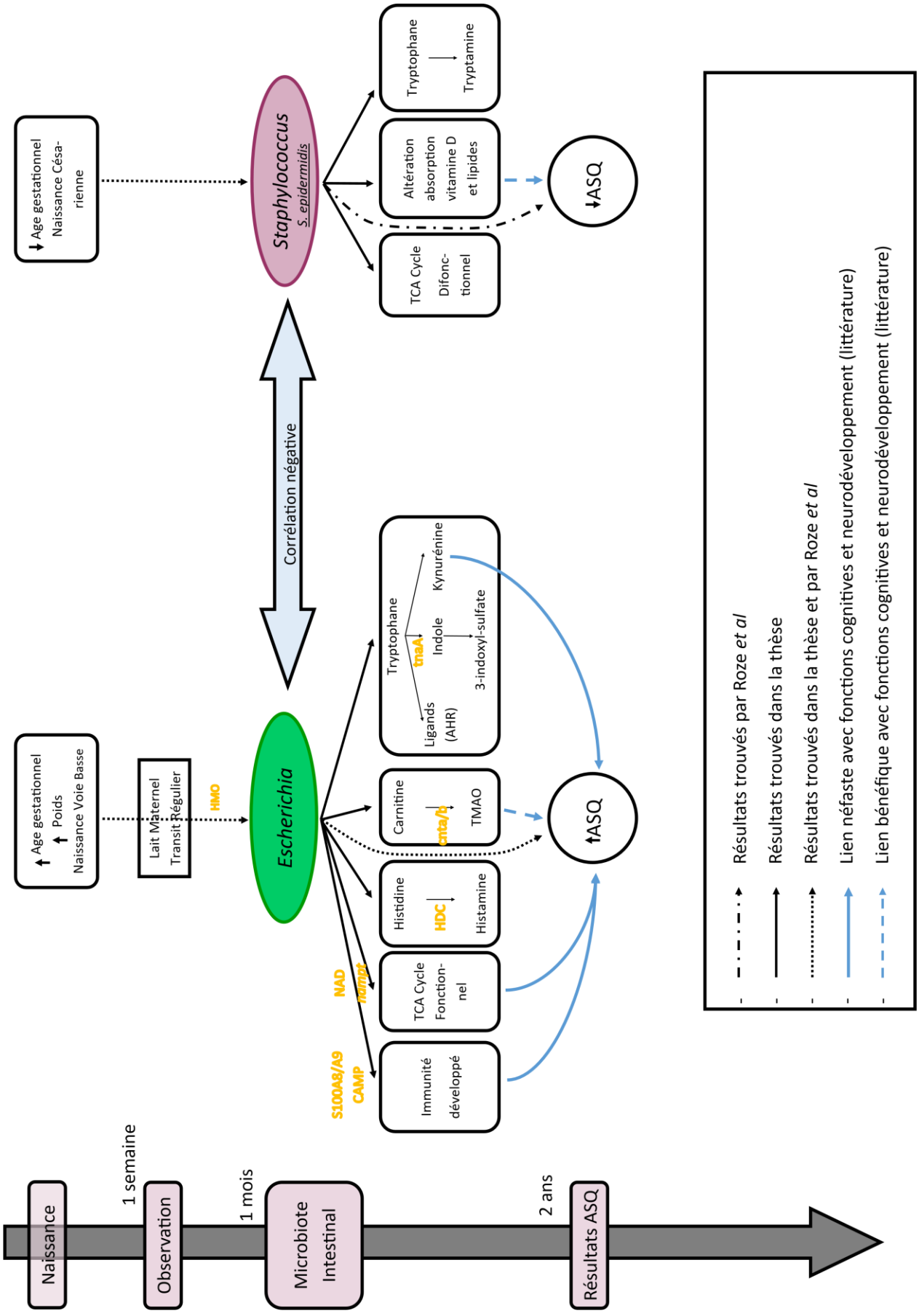


Figure 49 : Résumé graphique

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE ET ACTIVITES D'ENSEIGNEMENTS

1. Publication

- Publication soumise à Gut Microbes: *Crosstalk between the gut microbiome and host: Impact of preterm birth on TCA cycle and immunity in 1-month-old infants*
  Constance Patin, Céline Monot, Laetitia Marchand-Martin, Pierre-Yves Ancel, Marie-José Butel, Jean-Christophe Rozé, Patricia Lepage

- Publication en préparation: *Early intestinal transit in preterm infants is associated with microbiome functional signatures at 1 month of age*
  Constance Patin, Céline Monot, Laetitia Marchand-Martin, Pierre-Yves Ancel, Marie-José Butel, Jean-Christophe Rozé, Patricia Lepage

2. Communication

- Présentation d'un poster au congrès de la Société Française de Microbiologie en Octobre 2022 : *Early intestinal transit in preterm infants is associated with microbiome functional signatures at 1 month of age*
  Constance Patin, Karine Le Roux, Pierre Yves Ancel, Marie José Butel , Jean Christophe Rozé, Patricia Lepage

- Présentation d'un poster à la journée de l'école doctorale en Juin 2023 : *Escherichia/Shigella at 1 month impact epithelial cells which expressed higher calprotectin and cathelicidin*
  Constance Patin, Karine Le Roux, Pierre Yves Ancel, Marie José Butel, Jean Christophe Rozé, Patricia Lepage

3. Co-encadrement

- Emma Feray – Master 1 - « Etude de l'impact de mycotoxines émergentes sur le microbiote intestinal de porcelets ». Avril à Juin 2021.

- Alexandre Fricot – Magistère - « Analyse du dialogue microbiome-hôte chez l'enfant prématuré ». Avril à Juillet 2021.

- Hugues Samueli – 2ème année de licence - « Impact de deux xénobiotiques sur la croissance de *Escherichia coli* ». Avril à Juin 2022.

- Antoine Malet – 3ème année de licence – « Analyse bio-informatique de données de séquençage d'amplicons à haut-débit » – Septembre à Octobre 2022

- Solène Blin – Master 2 - « Interactions bactéries-champignons du microbiote de l'enfant prématuré et impact des xénobiotiques sur ces microorganismes ». Janvier à Juin 2023.

4. Enseignement

- Travaux dirigés (12h) de Master 1 Biologie Intégrative et Physiologie – « Adopte un gène » - Novembre 2021
- Travaux pratiques (8h) de Master 2 de Sciences du Médicament à Paris Saclay – « Analyses du microbiome intestinal » - Décembre 2022

REFERENCES

1 Preterm birth. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth

2 psychomotmaison. https://www.psychomotmaison.com/la-prematurite/

3 Nourrissons prématurés - Pédiatrie - Édition professionnelle du Manuel MSD. https://www.msdmanuals.com/fr/professional/pédiatrie/problèmes-périnataux/nourrissons-prématurés

4 Bagein G, Costemalle V, Deroyon T, *et al.* L'état de santé de la population en France.

5 Erbani R. Impact de la perte d ' humidité dans les couveuses sur le métabolisme du prématuré selon le mode de régulation thermique To cite this version : HAL Id : dumas-01937903 Thèse n ° 2017 - 139 Impact de la perte d ' humidité dans les couveuses sur le métaboli. 2018.

6 Lavventura. Le Monde. https://www.lemonde.fr/blog/lavventura/2019/11/07/les-bebes-inattendus-naitre-a-500-grammes/

7 Prématurité · Inserm, La science pour la santé. https://www.inserm.fr/dossier/prematurite/

8 Malley CS, Kuylenstierna JCI, Vallack HW, *et al.* Preterm birth associated with maternal fine particulate matter exposure: A global, regional and national assessment. *Environ Int* 2017;**101**:173–82. doi:10.1016/J.ENVINT.2017.01.023

9 Graff I, De Broucker C, Vargas J, *et al.* COVID-19 et confinement : impact sur les complications de la grossesse. *Gynecol Obstet Fertil Senol* 2022;**50**:236. doi:10.1016/J.GOFS.2021.12.004

10 Respiratory Distress Syndrome (RDS) in Premature Babies - Health Encyclopedia - University of Rochester Medical Center. https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P02371

11 Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: Implications for nutrition support. *Nutr Clin Pract* 2007;**22**:159–73. doi:10.1177/0115426507022002159

12 Indrio F, Neu J, Pettoello-Mantovani M, *et al.* Development of the Gastrointestinal Tract in Newborns as a Challenge for an Appropriate Nutrition: A Narrative Review. *Nutrients* 2022;**14**. doi:10.3390/NU14071405

13 Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: Implications for nutrition support. *Nutr Clin Pract* 2007;**22**:159–73. doi:10.1177/0115426507022002159

14 L'étude Epipage 2. https://epipage2.inserm.fr/index.php/fr/l-etude/199-qu-est-ce-qu-epipage-2

15 Laforest-Lapointe I, Arrieta MC. Patterns of Early-Life Gut Microbial Colonization during Human Immune Development: An Ecological Perspective. *Front Immunol* 2017;**8**:1. doi:10.3389/FIMMU.2017.00788

16 Chiapperino L, Panese F, Simeoni U. L'épigénétique et le concept DOHaD. Vers de nouvelles temporalitésde la médecine « personnalisée » ? *Rev Med Suisse* 2017;**13**:334–6. doi:10.53738/REVMED.2017.13.548.0334

17 Charles MA, Delpierre C, Breánt B. Le concept des origines développementales de la santé - Évolution sur trois décennies. *médecine/sciences* 2016;**32**:15–20. doi:10.1051/MEDSCI/20163201004

18 Aversa Z, Atkinson EJ, Schafer MJ, *et al.* Association of Infant Antibiotic Exposure With Childhood Health Outcomes. *Mayo Clin Proc* 2021;**96**:66. doi:10.1016/J.MAYOCP.2020.07.019

19 Bianco-Miotto T, Craig JM, Gasser YP, *et al.* Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *J Dev Orig Health Dis* 2017;**8**:513–9. doi:10.1017/S2040174417000733

20 Quinn EB, Hsiao CJ, Maisha FM, *et al.* Prenatal maternal stress is associated with site-specific and age acceleration changes in maternal and newborn DNA methylation. *Epigenetics* 2023;**18**:2222473. doi:10.1080/15592294.2023.2222473

21 Quinn EB, Hsiao CJ, Maisha FM, *et al.* Low birthweight is associated with epigenetic age acceleration in the first 3 years of life. *Evol Med public Heal* 2023;**11**. doi:10.1093/EMPH/EOAD019

22 L'étude Epipage 1. https://epipage2.inserm.fr/index.php/fr/prematurite/241-l-etude-epipage-2

23 Synchros | EPIPAGE 1.

24 Guellec I, Charkaluk ML, Fresson J, *et al.* Effect of Intra- and Extrauterine Growth on Long-Term Neurologic Outcomes of Very Preterm Infants. *J Pediatr* 2016;**175**:93-99.e1. doi:10.1016/J.JPEDS.2016.05.027

25 Mitha A, Foix-L'Hélias L, Arnaud C, *et al.* Neonatal infection and 5-year neurodevelopmental outcome of very preterm infants. *Pediatrics* 2013;**132**. doi:10.1542/PEDS.2012-3979

26 Hadchouel A, Rousseau J, Rozé JC, *et al.* Association between asthma and lung function in adolescents born very preterm: results of the EPIPAGE cohort study. *Thorax* 2018;**73**. doi:10.1136/THORAXJNL-2017-211115

27 Beaino G, Khoshnood B, Kaminski M, *et al.* Predictors of the risk of cognitive deficiency in very preterm infants: the EPIPAGE prospective cohort. *Acta Paediatr* 2011;**100**:370–8. doi:10.1111/J.1651-2227.2010.02064.X

28 Rozé JC, Ancel PY, Marchand-Martin L, *et al.* Assessment of Neonatal Intensive Care Unit Practices and Preterm Newborn Gut Microbiota and 2-Year Neurodevelopmental Outcomes. *JAMA Netw Open* 2020;**3**:1–14. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.18119

29 Li J, Jia H, Cai X, *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 2014;**32**:834–41. doi:10.1038/nbt.2942

30 Farré R, Fiorani M, Rahiman SA, *et al.* Intestinal permeability, inflammation and the role of nutrients. *Nutrients* 2020;**12**:1–18. doi:10.3390/nu12041185

31 Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*

2019;**76**:473–93. doi:10.1007/s00018-018-2943-4

32 Valdes AM, Walter J, Segal E, *et al*. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018;**361**:36–44. doi:10.1136/BMJ.K2179

33 Yang Z, Liu X, Wu Y, *et al*. Effect of the Microbiome on Intestinal Innate Immune Development in Early Life and the Potential Strategy of Early Intervention. *Front Immunol* 2022;**13**:1–16. doi:10.3389/fimmu.2022.936300

34 Stagg AJ, Norin KE, Midtvedt T, *et al*. Mesenteric dendritic cells from germ-free mice cause less T-cell stimulation but still induce α4β7 integrin. *Microb Ecol Health Dis* 2007;**19**:171–83. doi:10.1080/08910600701474263

35 Satoh-Takayama N, Vosshenrich CAJ, Lesjean-Pottier S, *et al*. Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells that Provide Innate Mucosal Immune Defense. *Immunity* 2008;**29**:958–70. doi:10.1016/j.immuni.2008.11.001

36 Shaw MH, Kamada N, Kim YG, *et al*. Microbiota-induced IL-1β, but not IL-6, is critical for the development of steady-state T H17 cells in the intestine. *J Exp Med* 2012;**209**:251–8. doi:10.1084/jem.20111703

37 Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res 2020 306* 2020;**30**:492–506. doi:10.1038/s41422-020-0332-7

38 Liu Y, Wang J, Wu C. Modulation of Gut Microbiota and Immune System by Probiotics, Pre-biotics, and Post-biotics. *Front Nutr* 2022;**8**:1–14. doi:10.3389/fnut.2021.634897

39 Khan I, Bai Y, Zha L, *et al*. Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;**11**:1–19. doi:10.3389/fcimb.2021.716299

40 Yao Y, Cai X, Ye Y, *et al*. The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood. *Front Immunol* 2021;**12**:1–21. doi:10.3389/fimmu.2021.708472

41 Romyasamit C, Thatrimontrichai A, Aroonkesorn A, *et al*. Enterococcus faecalis Isolated From Infant Feces Inhibits Toxigenic Clostridioides (Clostridium) difficile. *Front Pediatr* 2020;**8**:572633. doi:10.3389/FPED.2020.572633/FULL

42 Sanidad KZ, Zeng MY. Neonatal gut microbiome and immunity. *Curr Opin Microbiol* 2020;**56**:30–7. doi:10.1016/j.mib.2020.05.011

43 Lee SH, Yoon SH, Jung Y, *et al*. Emotional well-being and gut microbiome profiles by enterotype. *Sci Rep* 2020;**10**:1–9. doi:10.1038/s41598-020-77673-z

44 Butler MI, Bastiaanssen TFS, Long-Smith C, *et al*. The gut microbiome in social anxiety disorder: evidence of altered composition and function. *Transl Psychiatry* 2023;**13**:1–12. doi:10.1038/s41398-023-02325-5

45 Taniya MA, Chung HJ, Al Mamun A, *et al*. Role of Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder and Its Therapeutic Regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;**12**:1–13. doi:10.3389/fcimb.2022.915701

46 Cheng Z, Zhang L, Yang L, *et al*. The critical role of gut microbiota in obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;**13**:1–14. doi:10.3389/fendo.2022.1025706

47 Di Lodovico L, Mondot S, Doré J, *et al*. Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic

review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2021;**106**:110114. doi:10.1016/j.pnpbp.2020.110114

48 Dhurjad P, Dhavaliker C, Gupta K, *et al*. Exploring Drug Metabolism by the Gut Microbiota: Modes of Metabolism and Experimental Approaches. *Drug Metab Dispos* 2022;**50**:224–34. doi:10.1124/dmd.121.000669

49 Microbiote humain et santé. https://svtlyceedevienne.com/seconde/microorganismes-et-sante/microbiote-humain-et-sante/

50 Bonnin A, Dalle F. Candida albicans: A model organism to study the role of micromycetes in the intestinal microbiota. *Bull Acad Natl Med* 2018;**202**:1401–12. doi:10.1016/s0001-4079(19)30206-7

51 Pérez JC. The interplay between gut bacteria and the yeast Candida albicans. *Gut Microbes* 2021;**13**. doi:10.1080/19490976.2021.1979877

52 Hallen-Adams HE, Suhr MJ. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence* 2017;**8**:352–8. doi:10.1080/21505594.2016.1247140

53 James SA, Phillips S, Telatin A, *et al*. Preterm Infants Harbour a Rapidly Changing Mycobiota That Includes Candida Pathobionts. *J Fungi* 2020;**6**:1–16. doi:10.3390/JOF6040273

54 Chow BDW, Linden JR, Bliss JM. Candida parapsilosis and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;**10**:935. doi:10.1586/ERI.12.74

55 Hrncir T. Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms* 2022;**10**. doi:10.3390/microorganisms10030578

56 Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, *et al*. A critical assessment of the 'sterile womb' and 'in utero colonization' hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 2017;**5**:1–19. doi:10.1186/s40168-017-0268-4

57 Olaniyi KS, Moodley J, Mahabeer Y, *et al*. Placental Microbial Colonization and Its Association With Pre-eclampsia. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;**10**:1–11. doi:10.3389/fcimb.2020.00413

58 MOREAU M-C, THOMASSON M, DUCLUZEAU R, *et al*. Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait. *Reprod Nutr Développement* 1986;**26**:745–53. doi:10.1051/rnd:19860429

59 Zhang C, Li L, Jin B, *et al*. The Effects of Delivery Mode on the Gut Microbiota and Health: State of Art. *Front Microbiol* 2021;**12**:724449. doi:10.3389/FMICB.2021.724449

60 Hoang DM, Levy EI, Vandenplas Y. The impact of Caesarean section on the infant gut microbiome. *Acta Paediatr* 2021;**110**:60–7. doi:10.1111/APA.15501

61 Martinson JN V., Walk ST. Escherichia coli residency in the gut of healthy human adults. *EcoSal Plus* 2020;**9**. doi:10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0003-2020

62 Senn V, Bassler D, Choudhury R, *et al*. Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood—A Comprehensive Review. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;**10**:637.

doi:10.3389/FCIMB.2020.573735/BIBTEX

63 Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol* 2019;**27**:997–1010. doi:10.1016/j.tim.2019.08.001

64 Henderickx JGE, Zwittink RD, Renes IB, *et al*. Maturation of the preterm gastrointestinal tract can be defined by host and microbial markers for digestion and barrier defense. *Sci Rep* 2021;**11**. doi:10.1038/S41598-021-92222-Y

65 Aguilar-Lopez M, Dinsmoor AM, Ho TTB, *et al*. A systematic review of the factors influencing microbial colonization of the preterm infant gut. *Gut Microbes* 2021;**13**:1–33. doi:10.1080/19490976.2021.1884514

66 Plummer EL, Bulach DM, Murray GL, *et al*. Gut microbiota of preterm infants supplemented with probiotics: Sub-study of the ProPrems trial. *BMC Microbiol* 2018;**18**:1–8. doi:10.1186/s12866-018-1326-1

67 Jia J, Xun P, Wang X, *et al*. Impact of Postnatal Antibiotics and Parenteral Nutrition on the Gut Microbiota in Preterm Infants During Early Life. *J Parenter Enter Nutr* 2020;**44**:639–54. doi:10.1002/JPEN.1695

68 Butel MJ, Suau A, Campeotto F, *et al*. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: A prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;**44**:577–82. doi:10.1097/MPG.0b013e3180406b20

69 Toubon G, Butel M-J, Rozé J-C, *et al*. Early Life Factors Influencing Children Gut Microbiota at 3.5 Years from Two French Birth Cohorts. *Microorganisms* 2023;**11**:1390. doi:10.3390/microorganisms11061390

70 Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. A critical review of the bacterial baptism hypothesis and the impact of cesarean delivery on the infant microbiome. *Front Med* 2018;**5**. doi:10.3389/fmed.2018.00135

71 Stewart CJ, Embleton ND, Clements E, *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**:1–9. doi:10.3389/fmicb.2017.01008

72 Katherine E. Gregory, PhD, RN, Rose D. LaPlante, BSN, RN, Gururaj Shan, BS, Deepak Vijaya Kumar, PhD, and Matt Gregas PA. Mode of birth influences preterm infant intestinal colonization with Bacteroides over the Early Neonatal period. 2015;**176**:139–48. doi:10.4049/jimmunol.1801473.The

73 Inizan C. Les facteurs influençant la décision de voie d ' accouchement entre 26 et 32 SA et. 2016.

74 Hall MA, Cole CB, Smith SL, *et al*. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990;**65**:185–8. doi:10.1136/adc.65.2.185

75 Arboleya S, Sánchez B, Milani C, *et al*. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr* 2015;**166**:538–44. doi:10.1016/j.jpeds.2014.09.041

76 Patel K, Konduru K, Patra AK, *et al*. Trends and determinants of gastric bacterial colonization of preterm neonates in a NICU setting. *PLoS One* 2015;**10**:1–21. doi:10.1371/journal.pone.0114664

77 Cerdó T, García-Santos JA, Rodríguez-Pöhnlein A, *et al*. Impact of Total Parenteral Nutrition on Gut Microbiota in Pediatric Population Suffering Intestinal Disorders. *Nutrients* 2022;**14**:1–25. doi:10.3390/nu14214691

78 Hill DR, Buck RH. Infants Fed Breastmilk or 2′-FL Supplemented Formula Have Similar Systemic Levels of Microbiota-Derived Secondary Bile Acids. *Nutrients* 2023;**15**. doi:10.3390/nu15102339

79 Xu W, Judge MP, Maas K, *et al*. Systematic Review of the Effect of Enteral Feeding on Gut Microbiota in Preterm Infants. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2018;**47**:451–63. doi:10.1016/J.JOGN.2017.08.009

80 Vos WM de, Tilg H, Hul M Van, *et al*. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut* 2022;**0**:gutjnl-2021-326789. doi:10.1136/GUTJNL-2021-326789

81 Alsharairi NA. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between a Very Low-Calorie Ketogenic Diet and the Infant Gut Microbiota and Its Therapeutic Implications for Reducing Asthma. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:1–21. doi:10.3390/IJMS21249580

82 Liu L, Li Q, Yang Y, *et al*. Biological Function of Short-Chain Fatty Acids and Its Regulation on Intestinal Health of Poultry. *Front Vet Sci* 2021;**8**:736739. doi:10.3389/FVETS.2021.736739/BIBTEX

83 Pham NHT, Joglekar M V, Wong WKM, *et al*. Short-chain fatty acids and insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* Published Online First: 8 June 2023. doi:10.1093/NUTRIT/NUAD042

84 May KS, Den Hartigh LJ. Modulation of Adipocyte Metabolism by Microbial Short-Chain Fatty Acids. *Nutrients* 2021;**13**. doi:10.3390/NU13103666

85 Yang LL, Millischer V, Rodin S, *et al*. Enteric short-chain fatty acids promote proliferation of human neural progenitor cells. *J Neurochem* 2020;**154**:635–46. doi:10.1111/JNC.14928

86 Sarubbo F, Cavallucci V, Pani G. The Influence of Gut Microbiota on Neurogenesis: Evidence and Hopes. *Cells 2022, Vol 11, Page 382* 2022;**11**:382. doi:10.3390/CELLS11030382

87 Favre A, Rondeau C, Gold F, *et al*. Diet, length of gestation, and fecal short chain fatty acids in healthy premature neonates. *J Parenter Enter Nutr* 2002;**26**:51–6. doi:10.1177/014860710202600151

88 Alsharairi NA. Therapeutic Potential of Gut Microbiota and Its Metabolite Short-Chain Fatty Acids in Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Life* 2023;**13**. doi:10.3390/life13020561

89 Inagaki T, Moschetta A, Lee YK, *et al*. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:3920–5. doi:10.1073/pnas.0509592103

90 Knapp S, Kehring A, Stepp J, *et al*. Elevated Coefficient of Variation in Total Fecal Bile Acids Precedes Diagnosis of Necrotizing Enterocolitis. *Sci Rep* 2020;**10**:1–10. doi:10.1038/s41598-019-57178-0

91 Hulzebos C V., Van Zoonen AGJF, Hulscher JBF, *et al*. Fecal Bile Salts and the Development of Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants. *PLoS One* 2017;**12**.

doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0168633

92 Sudo N. Biogenic Amines: Signals Between Commensal Microbiota and Gut Physiology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;**10**:1–7. doi:10.3389/fendo.2019.00504

93 Shulman RJ, Schanler RJ, Lau C, *et al.* Early feeding, feeding tolerance, and lactase activity in preterm infants. *J Pediatr* 1998;**133**:645–9. doi:10.1016/S0022-3476(98)70105-2

94 Shulman RJ. Effect of enteral administration of insulin on intestinal development and feeding tolerance in preterm infants: A pilot study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002;**86**:131–3. doi:10.1136/fn.86.2.f131

95 Camilia R. Martin, MD MS1, 2, Antonio Cheesman, MD3, Joanne Brown, MS3 MM, BA3, Allison J. Kutner, MD3, Deborah DaSilva, RN3, Munir Zaman, MD3 and SD, Freedman, MD PhD2 3. Factors Determining Optimal Fatty Acid Absorption in Preterm Infants. 2016;**2**:1–17. doi:10.1097/MPG.0000000000000934.Factors

96 Berseth CL. Gestational evolution of small intestine motility in preterm and term infants. *J Pediatr* 1989;**115**:646–51. doi:10.1016/S0022-3476(89)80302-6

97 Allaire JM, Crowley SM, Law HT, *et al.* The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol* 2018;**39**:677–96. doi:10.1016/j.it.2018.04.002

98 Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: The expected slimy partners? *Gut* 2020;**69**:2232–43. doi:10.1136/gutjnl-2020-322260

99 Demers-Mathieu V. The immature intestinal epithelial cells in preterm infants play a role in the necrotizing enterocolitis pathogenesis: A review. *Heal Sci Rev* 2022;**4**:100033. doi:10.1016/j.hsr.2022.100033

100 Zhou A, Yuan Y, Yang M, *et al.* Crosstalk Between the Gut Microbiota and Epithelial Cells Under Physiological and Infectious Conditions. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;**12**:1–11. doi:10.3389/fcimb.2022.832672

101 Barreto e Barreto L, Rattes IC, da Costa A V., *et al.* Paneth cells and their multiple functions. *Cell Biol Int* 2022;**46**:701–10. doi:10.1002/cbin.11764

102 Golubkova A, Hunter CJ. Development of the Neonatal Intestinal Barrier, Microbiome, and Susceptibility to NEC. *Microorganisms* 2023;**11**. doi:10.3390/microorganisms11051247

103 Liu XC, Du TT, Gao X, *et al.* Gut microbiota and short-chain fatty acids may be new biomarkers for predicting neonatal necrotizing enterocolitis: A pilot study. *Front Microbiol* 2022;**13**:1–12. doi:10.3389/fmicb.2022.969656

104 Slifer ZM, Blikslager AT. The integral role of tight junction proteins in the repair of injured intestinal epithelium. *Int J Mol Sci* 2020;**21**. doi:10.3390/ijms21030972

105 Aguanno D, Coquant G, Postal BG, *et al.* The intestinal quorum sensing 3-oxo-C12:2 Acyl homoserine lactone limits cytokine-induced tight junction disruption. *Tissue Barriers* 2020;**8**. doi:10.1080/21688370.2020.1832877

106 Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* 2018;**50**. doi:10.1038/s12276-018-0126-x

107 Szentkuti L, Riedesel H, Enss ML, *et al.* Pre-epithelial mucus layer in the colon of

conventional and germ-free rats. *Histochem J* 1990;**22**:491–7. doi:10.1007/BF01007234

108 Sommer F, Nookaew I, Sommer N, *et al*. Site-specific programming of the host epithelial transcriptome by the gut microbiota. *Genome Biol* 2015;**16**:1–15. doi:10.1186/s13059-015-0614-4

109 Tomas J, Wrzosek L, Bouznad N, *et al*. Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J* 2013;**27**:645–55. doi:10.1096/FJ.12-216861

110 Tomas J, Reygner J, Mayeur C, *et al*. Early colonizing Esche richia coli elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *ISME J 2015 91* 2014;**9**:46–58. doi:10.1038/ismej.2014.111

111 Richards AL, Muehlbauer AL, Alazizi A, *et al*. Gut Microbiota Has a Widespread and Modifiable Effect on Host Gene Regulation. *mSystems* 2019;**4**. doi:10.1128/MSYSTEMS.00323-18/SUPPL_FILE/MSYSTEMS.00323-18-ST006.TXT

112 Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell* 2010;**140**:859–70. doi:10.1016/j.cell.2010.01.023

113 Bougnères P, Chanson P. Le BDNF régule l'expression des récepteurs dopaminergiques D3. *Médecine thérapeutique / Endocrinol* 2001;**3**.

114 Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) Clinisciences. https://www.clinisciences.com/lire/facteurs-de-croissance-54/le-facteur-de-croissance-derive-211.html

115 Seki D, Mayer M, Hausmann B, *et al*. Aberrant gut-microbiota-immune-brain axis development in premature neonates with brain damage. *Cell Host Microbe* 2021;**29**:1558-1572.e6. doi:10.1016/j.chom.2021.08.004

116 (PDF) Rôle des extensines et leur glycosylation dans la défense racinaire. https://www.researchgate.net/publication/336229966_Role_des_extensines_et_leur_glycosylation_dans_la_defense_racinaire/figures?lo=1

117 Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 2012;**5**:354–66. doi:10.1038/mi.2012.24

118 Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Front Neurosci* 2013;**7**:48149. doi:10.3389/FNINS.2013.00079/BIBTEX

119 Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:667–85. doi:10.1038/nri3738

120 Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:329–42. doi:10.1038/nri3661

121 Jukic A, Bakiri L, Wagner EF, *et al*. Calprotectin: From biomarker to biological function. *Gut* 2021;:1978–88. doi:10.1136/gutjnl-2021-324855

122 Rugtveit, Jarle*; Fagerhol MK. Age-Dependent Variations in Fecal Calprotectin Concentration...: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2002.https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2002/03000/Age_Dependent_Variations_in_Fecal_Calprotectin.23.aspx

123 Kapel N, Campeotto F, Kalach N, *et al*. Faecal calprotectin in term and preterm neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;**51**:542–7. doi:10.1097/MPG.0B013E3181E2AD72

124 Rougé C, Butel MJ, Piloquet H, *et al*. Fecal Calprotectin Excretion in Preterm Infants during the Neonatal Period. *PLoS One* 2010;**5**. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0011083

125 Marret S, Chollat C, de Quelen R, *et al*. Parcours et développement neurologique et comportemental de l'enfant prématuré. *Arch Pediatr* 2015;**22**:195–202. doi:10.1016/j.arcped.2014.11.016

126 Bhutta AT, Cleves MA, Casey PH, *et al*. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: A meta-analysis. *JAMA* 2002;**288**:728–37. doi:10.1001/JAMA.288.6.728

127 Mayer EA, Nance K, Chen S. The Gut–Brain Axis. *https://doi.org/101146/annurev-med-042320-014032* 2022;**73**:439–53. doi:10.1146/ANNUREV-MED-042320-014032

128 Laue HE, Coker MO, Madan JC. The Developing Microbiome From Birth to 3 Years: The Gut-Brain Axis and Neurodevelopmental Outcomes. *Front Pediatr* 2022;**10**:1–10. doi:10.3389/fped.2022.815885

129 Li L, Yang J, Liu T, *et al*. Role of the gut-microbiota-metabolite-brain axis in the pathogenesis of preterm brain injury. *Biomed Pharmacother* 2023;**165**:115243. doi:10.1016/j.biopha.2023.115243

130 Guo S, Huang K, Liu R, *et al*. Regulation of Gut Microbiota through Breast Milk Feeding Benefits Language and Cognitive Development of Preterm Toddlers. *Microorganisms* 2023;**11**. doi:10.3390/MICROORGANISMS11040866

131 Dinan TG, Stilling RM, Stanton C, *et al*. Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. *J Psychiatr Res* 2015;**63**:1–9. doi:10.1016/J.JPSYCHIRES.2015.02.021

132 Kartjito MS, Yosia M, Wasito E, *et al*. Defining the Relationship of Gut Microbiota, Immunity, and Cognition in Early Life—A Narrative Review. *Nutrients* 2023;**15**:2642. doi:10.3390/nu15122642

133 Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, *et al*. Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* 2019;**101**:246-259.e6. doi:10.1016/j.neuron.2018.11.018

134 Tamana SK, Tun HM, Konya T, *et al*. Bacteroides-dominant gut microbiome of late infancy is associated with enhanced neurodevelopment. *Gut Microbes* 2021;**13**:1–17. doi:10.1080/19490976.2021.1930875

135 Bresesti I, Salvatore S, Valetti G, *et al*. The Microbiota-Gut Axis in Premature Infants: Physio-Pathological Implications. *Cells* 2022;**11**. doi:10.3390/cells11030379

136 Lu X, Xue Z, Qian Y, *et al*. Changes in intestinal microflora and its metabolites underlie the cognitive impairment in preterm rats. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;**12**:1–14. doi:10.3389/fcimb.2022.945851

137 Lu J, Martin CR, Claud EC. Neurodevelopmental outcome of infants who develop necrotizing enterocolitis: The gut-brain axis. *Semin Perinatol* 2023;**47**:151694. doi:10.1016/j.semperi.2022.151694

138 Lu J, Lu L, Yu Y, *et al.* Early preterm infant microbiome impacts adult learning. *Sci Reports 2022 121* 2022;**12**:1–14. doi:10.1038/s41598-022-07245-w

139 Qiu J, Children's Hospital H, Xiang S, *et al.* Association between Gut Microbiota and Neurodevelopmental Outcome in Neonates. 2022;:1–13.

140 Lu J, Drobyshevsky A, Lu L, *et al.* Microbiota from Preterm Infants Who Develop Necrotizing Enterocolitis Drives the Neurodevelopment Impairment in a Humanized Mouse Model. *Microorganisms* 2023;**11**. doi:10.3390/microorganisms11051131

141 Strømmen K, Lyche JL, Moltu SJ, *et al.* High urinary concentrations of parabens and bisphenol A in very low birth weight infants. *Chemosphere* 2021;**271**:129570. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.129570

142 Bisphénol A | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

143 Duty SM, Mendonca K, Hauser R, *et al.* Potential Sources of Bisphenol A in the Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatrics* 2013;**131**:483–9. doi:10.1542/PEDS.2012-1380

144 Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, *et al.* Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 1995;**103**:608–12. doi:10.1289/ehp.95103608

145 Calafat AM, Ye X, Wong LY, *et al.* Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect* 2008;**116**:39. doi:10.1289/EHP.10753

146 Chiu K, Warner G, Nowak RA, *et al.* The Impact of Environmental Chemicals on the Gut Microbiome. *Toxicol Sci* 2020;**176**:253. doi:10.1093/TOXSCI/KFAA065

147 Mao W, Mao L, Zhou F, *et al.* Influence of Gut Microbiota on Metabolism of Bisphenol A, a Major Component of Polycarbonate Plastics. *Toxics* 2023;**11**. doi:10.3390/TOXICS11040340/S1

148 Xu J, Huang G, Guo TL. Developmental bisphenol a exposure modulates immune-related diseases. *Toxics* 2016;**4**. doi:10.3390/toxics4040023

149 N'Tumba-Byn T, Moison D, Lacroix M, *et al.* Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. *PLoS One* 2012;**7**:e51579. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0051579

150 Gayrard V, Lacroix MZ, Grandin FC, *et al.* Oral Systemic Bioavailability of Bisphenol A and Bisphenol S in Pigs. *Environ Health Perspect* 2019;**127**. doi:10.1289/EHP4599

151 Gregerson KA. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Knobil Neill's Physiol Reprod* 2005;**80**:1703–26. doi:10.1016/B978-012515400-0/50037-3

152 Dompéridone - Grossesse et allaitement. 2021;:75012.

153 Paul C, Zénut M, Dorut A, *et al.* Use of Domperidone as a Galactagogue Drug. *https://doi.org/101177/0890334414561265* 2014;**31**:57–63. doi:10.1177/0890334414561265

154 Peck TE, Hill SA. Drugs acting on the gut. *Pharmacol Anaesth Intensive Care* 2014;:280–5. doi:10.1017/cbo9781107477605.022

155 Laudisi F, Stolfi C, Monteleone G. Impact of food additives on gut homeostasis. *Nutrients* 2019;**11**. doi:10.3390/nu11102334

156 Kriegel C, Festag M, Kishore RSK, *et al*. Pediatric safety of polysorbates in drug formulations. *Children* 2020;**7**:1–12. doi:10.3390/children7010001

157 Truffin D, Häusler O, Martin M, *et al*. Polyols Permeability on Caco-2 Cells and Their Effects on Transport of Low-Permeability Drugs. *Futur Pharmacol 2023, Vol 3, Pages 229-237* 2023;**3**:229–37. doi:10.3390/FUTUREPHARMACOL3010016

158 Nellis G, Metsvaht T, Varendi H, *et al*. Potentially harmful excipients in neonatal medicines: a pan-European observational study. *Arch Dis Child* 2015;**100**:694–9. doi:10.1136/ARCHDISCHILD-2014-307793

159 Stinson LF, Keelan JA, Payne MS. Comparison of Meconium DNA extraction methods for use in microbiome studies. *Front Microbiol* 2018;**9**:306524. doi:10.3389/FMICB.2018.00270/BIBTEX

160 Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, *et al*. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy* 2014;**44**:842–50. doi:10.1111/CEA.12253

161 Rutayisire E, Huang K, Liu Y, *et al*. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: A systematic review. *BMC Gastroenterol* 2016;**16**:1–12. doi:10.1186/S12876-016-0498-0/TABLES/2

162 ASQ-3 - Ages and Stages. https://agesandstages.com/products-pricing/asq3/

163 Flannery DD, Ross RK, Mukhopadhyay S, *et al*. Temporal Trends and Center Variation in Early Antibiotic Use Among Premature Infants. *JAMA Netw open* 2018;**1**:e180164. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.0164

164 Couturier J, Lepage P, Jolivet S, *et al*. Gut Microbiota Diversity of Preterm Neonates Is Associated With Clostridioides Difficile Colonization. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;**12**:1–11. doi:10.3389/fcimb.2022.907323

165 Providing Breast Milk for Premature and Ill Newborns - HealthyChildren.org.

166 Heller N, Rüdiger M, Hoffmeister V, *et al*. Mother's Own Milk Feeding in Preterm Newborns Admitted to the Neonatal Intensive Care Unit or Special-Care Nursery: Obstacles, Interventions, Risk Calculation. *Int J Environ Res Public Health* 2021;**18**:4140. doi:10.3390/IJERPH18084140

167 Boquien CY. Human milk: An ideal food for nutrition of preterm newborn. *Front Pediatr* 2018;**6**:416149. doi:10.3389/FPED.2018.00295/BIBTEX

168 Embleton ND, Morgan C, King C. Balancing the risks and benefits of parenteral nutrition for preterm infants: can we define the optimal composition? *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* 2015;**100**:F72–5. doi:10.1136/ARCHDISCHILD-2013-304061

169 Guzzardi MA, Ederveen THA, Rizzo F, *et al*. Maternal pre-pregnancy overweight and neonatal gut bacterial colonization are associated with cognitive development and gut microbiota composition in pre-school-age offspring. *Brain Behav Immun* 2022;**100**:311–20. doi:10.1016/j.bbi.2021.12.009

170 Heida FH, Kooi EMW, Wagner J, *et al.* Weight shapes the intestinal microbiome in preterm infants: results of a prospective observational study. *BMC Microbiol* 2021;**21**:1–12. doi:10.1186/s12866-021-02279-y

171 Draper ES, Manktelow B, Field DJ, *et al.* Prediction of survival for preterm births by weight and gestational age: retrospective population based study. *BMJ Br Med J* 1999;**319**:1093. doi:10.1136/BMJ.319.7217.1093

172 Wu Q, Zhang HY, Zhang L, *et al.* A New Birthweight Reference by Gestational Age: A Population Study Based on the Generalized Additive Model for Location, Scale, and Shape Method. *Front Pediatr* 2022;**10**:810203. doi:10.3389/FPED.2022.810203/FULL

173 Wang Z, Neupane A, Vo R, *et al.* Comparing Gut Microbiome in Mothers' Own Breast Milk- and Formula-Fed Moderate-Late Preterm Infants. *Front Microbiol* 2020;**11**:1–13. doi:10.3389/fmicb.2020.00891

174 Delnord M, Blondel B, Drewniak N, *et al.* Varying gestational age patterns in cesarean delivery: An international comparison. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014;**14**:1–9. doi:10.1186/1471-2393-14-321/TABLES/3

175 Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, *et al.* Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Reports 2018 81* 2018;**8**:1–9. doi:10.1038/s41598-018-20827-x

176 Ríos-Covian D, Langella P, Martín R. From Short- to Long-Term Effects of C-Section Delivery on Microbiome Establishment and Host Health. *Microorganisms* 2021;**9**. doi:10.3390/MICROORGANISMS9102122

177 Dong Y, Speer CP, Glaser K. Beyond sepsis: Staphylococcus epidermidis is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence* 2018;**9**:621. doi:10.1080/21505594.2017.1419117

178 Joubert IA, Otto M, Strunk T, *et al.* Look Who's Talking: Host and Pathogen Drivers of Staphylococcus epidermidis Virulence in Neonatal Sepsis. *Int J Mol Sci 2022, Vol 23, Page 860* 2022;**23**:860. doi:10.3390/IJMS23020860

179 Alyson L. Yee , Elizabeth Millerg, Larry J. Dishawc, Jessica M. Gordonf, Ming Jif, Samia Dutraf, Thao T. B. Hoc, Jack A. Gilbertb, d, e MG. Longitudinal Microbiome Composition and Stability Correlate with Increased Weight and Length of Very-Low-Birth-Weight Infants.

180 Shaw AG, Cornwell E, Sim K, *et al.* Dynamics of toxigenic Clostridium perfringens colonisation in a cohort of prematurely born neonatal infants. *BMC Pediatr* 2020;**20**. doi:10.1186/S12887-020-1976-7

181 Ariyoshi T, Hagihara M, Takahashi M, *et al.* Effect of Clostridium butyricum on Gastrointestinal Infections. *Biomedicines* 2022;**10**. doi:10.3390/BIOMEDICINES10020483

182 Yang XJ, Wang XH, Yang MY, *et al.* Exploring choices of early nutritional support for patients with sepsis based on changes in intestinal microecology. *World J Gastroenterol* 2023;**29**:2034–49. doi:10.3748/wjg.v29.i13.2034

183 Hu C, Xing W, Liu X, *et al.* Effects of dietary supplementation of probiotic Enterococcus faecium on growth performance and gut microbiota in weaned piglets. *AMB Express*

2019;**9**. doi:10.1186/s13568-019-0755-z

184 Tanaka M, Ikeji T, Nakanishi R, *et al*. Protective effects of Enterococcus faecium strain R30 supplementation on decreased muscle endurance under disuse in rats. *Exp Physiol* 2021;**106**:1961–70. doi:10.1113/EP089677

185 Müller M, Canfora EE, Blaak EE. Gastrointestinal Transit Time, Glucose Homeostasis and Metabolic Health: Modulation by Dietary Fibers. *Nutrients* 2018;**10**. doi:10.3390/NU10030275

186 So KW, Ng PC. Erythromycin and gastrointestinal dysmotility in preterm infants. *East J Med* 2010;**15**:146–50.

187 Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 2017;**5**. doi:10.1080/21688370.2017.1373208

188 Stockinger B, Shah K, Wincent E. AHR in the intestinal microenvironment: safeguarding barrier function. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;**18**:559–70. doi:10.1038/s41575-021-00430-8

189 Cai YY, Huang FQ, Lao X, *et al*. Integrated metagenomics identifies a crucial role for trimethylamine-producing Lachnoclostridium in promoting atherosclerosis. *npj Biofilms Microbiomes 2022 81* 2022;**8**:1–12. doi:10.1038/s41522-022-00273-4

190 Yap PSX, Chong CW, Ahmad Kamar A, *et al*. Neonatal intensive care unit (NICU) exposures exert a sustained influence on the progression of gut microbiota and metabolome in the first year of life. *Sci Rep* 2021;**11**:1353. doi:10.1038/S41598-020-80278-1

191 Hirabayashi Y, Nakamura K, Sonehara T, *et al*. Analysis of Serotonin in Human Feces Using Solid Phase Extraction and Column-Switching LC-MS/MS. *Mass Spectrom* 2020;**9**:81. doi:10.5702/MASSSPECTROMETRY.A0081

192 Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, *et al*. L-carnitine--metabolic functions and meaning in humans life. *Curr Drug Metab* 2011;**12**:667–78. doi:10.2174/138920011796504536

193 Longo N, Frigeni M, Pasquali M. CARNITINE TRANSPORT AND FATTY ACID OXIDATION. *Biochim Biophys Acta* 2016;**1863**:2422. doi:10.1016/J.BBAMCR.2016.01.023

194 Olson AL, Nelson SE, Rebouche CJ. Low carnitine intake and altered lipid metabolism in infants. *Am J Clin Nutr* 1989;**49**:624–8. doi:10.1093/AJCN/49.4.624

195 Bhatia J, Greer F, Nutrition and the C on. Use of Soy Protein-Based Formulas in Infant Feeding. *Pediatrics* 2008;**121**:1062–8. doi:10.1542/PEDS.2008-0564

196 Van Aerde JE. In preterm infants, does the supplementation of carnitine to parenteral nutrition improve the following clinical outcomes: Growth, lipid metabolism and apneic spells?: Part B: Clinical commentary. *Paediatr Child Health* 2004;**9**:573. doi:10.1093/PCH/9.8.573

197 Semba RD, Trehan I, Li X, *et al*. Environmental Enteric Dysfunction is Associated with Carnitine Deficiency and Altered Fatty Acid Oxidation. *EBioMedicine* 2017;**17**:57–66. doi:10.1016/j.ebiom.2017.01.026

198 Meadows JA, Wargo MJ. Carnitine in bacterial physiology and metabolism. *Microbiology* 2015;**161**:1161. doi:10.1099/MIC.0.000080

199 Tanaka S, Hamada K, Yamada N, *et al.* Gastric acid secretion in L-histidine decarboxylase-deficient mice. *Gastroenterology* 2002;**122**:145–55. doi:10.1053/gast.2002.30312

200 Smolinska S, Jutel M, Crameri R, *et al.* Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* 2014;**69**:273–81. doi:10.1111/ALL.12330

201 Kimura B, Takahashi H, Hokimoto S, *et al.* Induction of the histidine decarboxylase genes of Photobacterium damselae subsp. damselae (formally P. histaminum) at low pH. *J Appl Microbiol* 2009;**107**:485–97. doi:10.1111/J.1365-2672.2009.04223.X

202 Belleggia L, Milanović V, Cardinali F, *et al.* Prevalence of Histidine Decarboxylase Genes of Gram-Positive Bacteria in Surströmming as Revealed by qPCR. *Indian J Microbiol* 2021;**61**:96. doi:10.1007/S12088-020-00907-1

203 Litwack G. Vitamins and Nutrition. *Hum Biochem* 2018;:645–80. doi:10.1016/B978-0-12-383864-3.00020-X

204 Carthy E, Ellender T. Histamine, Neuroinflammation and Neurodevelopment: A Review. *Front Neurosci* 2021;**15**. doi:10.3389/FNINS.2021.680214

205 Harrison MA, Kaur H, Wren BW, *et al.* Production of p-cresol by Decarboxylation of p-HPA by All Five Lineages of Clostridioides difficile Provides a Growth Advantage. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;**11**:757599. doi:10.3389/FCIMB.2021.757599/BIBTEX

206 Wong X, Carrasco-Pozo C, Escobar E, *et al.* Deleterious Effect of p-Cresol on Human Colonic Epithelial Cells Prevented by Proanthocyanidin-Containing Polyphenol Extracts from Fruits and Proanthocyanidin Bacterial Metabolites. *J Agric Food Chem* 2016;**64**:3574–83. doi:10.1021/ACS.JAFC.6B00656/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2016-006564_0002.JPEG

207 Blachier F, Andriamihaja M. Effects of the l-tyrosine-derived bacterial metabolite p-cresol on colonic and peripheral cells. *Amin Acids 2021 543* 2021;**54**:325–38. doi:10.1007/S00726-021-03064-X

208 Bermudez-Martin P, Becker JAJ, Caramello N, *et al.* The microbial metabolite p-Cresol induces autistic-like behaviors in mice by remodeling the gut microbiota. *Microbiome* 2021;**9**:1–23. doi:10.1186/S40168-021-01103-Z/METRICS

209 Pascucci T, Colamartino M, Fiori E, *et al.* P-cresol Alters Brain Dopamine Metabolism and Exacerbates Autism-Like Behaviors in the BTBR Mouse. *Brain Sci* 2020;**10**. doi:10.3390/BRAINSCI10040233

210 Chiang JYL. Bile Acid Metabolism and Signaling. *Compr Physiol* 2013;**3**:1191. doi:10.1002/CPHY.C120023

211 González-Regueiro JA, Moreno-Castañeda L, Uribe M, *et al.* The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism. *Ann Hepatol* 2017;**16**:S21–6. doi:10.5604/01.3001.0010.5672

212 De Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metab* 2013;**17**:657–69. doi:10.1016/J.CMET.2013.03.013

213 Burge K, Vieira F, Eckert J, *et al*. Lipid composition, digestion, and absorption differences among neonatal feeding strategies: Potential implications for intestinal inflammation in preterm infants. *Nutrients* 2021;**13**:1–19. doi:10.3390/nu13020550

214 Boehm G, Braun W, Moro G, *et al*. Bile acid concentrations in serum and duodenal aspirates of healthy preterm infants: effects of gestational and postnatal age. *Biol Neonate* 1997;**71**:207–14. doi:10.1159/000244419

215 Lynch LE, Hair AB, Soni KG, *et al*. Cholestasis impairs gut microbiota development and bile salt hydrolase activity in preterm neonates. *Gut Microbes* 2023;**15**. doi:10.1080/19490976.2023.2183690/SUPPL_FILE/KGMI_A_2183690_SM7175.DOCX

216 O'Rourke L, Clarke G, Nolan A, *et al*. Tryptophan metabolic profile in term and preterm breast milk: implications for health. *J Nutr Sci* 2018;**7**:1–9. doi:10.1017/JNS.2017.69

217 Li N, Liang S, Chen Q, *et al*. Distinct gut microbiota and metabolite profiles induced by delivery mode in healthy Chinese infants. *J Proteomics* 2021;**232**:104071. doi:10.1016/J.JPROT.2020.104071

218 Brink LR, Mercer KE, Piccolo BD, *et al*. Neonatal diet alters fecal microbiota and metabolome profiles at different ages in infants fed breast milk or formula. *Am J Clin Nutr* 2020;**111**:1190. doi:10.1093/AJCN/NQAA076

219 Karahoda R, Robles M, Marushka J, *et al*. Prenatal inflammation as a link between placental expression signature of tryptophan metabolism and preterm birth. *Hum Mol Genet* 2021;**30**:2053–67. doi:10.1093/HMG/DDAB169

220 Wisniewski PJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Regulation of Intestinal Stem Cell Stemness by the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Ligands. *Front Immunol* 2021;**12**:638725. doi:10.3389/FIMMU.2021.638725

221 Wang XX, Sun SY, Dong QQ, *et al*. Recent advances in the discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors. *Medchemcomm* 2019;**10**:1740. doi:10.1039/C9MD00208A

222 Tsuji A, Ikeda Y, Yoshikawa S, *et al*. The Tryptophan and Kynurenine Pathway Involved in the Development of Immune-Related Diseases. *Int J Mol Sci 2023, Vol 24, Page 5742* 2023;**24**:5742. doi:10.3390/IJMS24065742

223 Bratek-Gerej E, Ziembowicz A, Godlewski J, *et al*. The Mechanism of the Neuroprotective Effect of Kynurenic Acid in the Experimental Model of Neonatal Hypoxia–Ischemia: The Link to Oxidative Stress. *Antioxidants* 2021;**10**. doi:10.3390/ANTIOX10111775

224 Boleij A, Fathi P, Dalton W, *et al*. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) regulates the colonic epithelial cell response to enterotoxigenic Bacteroides fragilis. *Commun Biol 2021 41* 2021;**4**:1–14. doi:10.1038/s42003-021-02014-3

225 Schneditz G, Elias JE, Pagano E, *et al*. GPR35 promotes glycolysis, proliferation, and oncogenic signaling by engaging with the sodium potassium pump. *Sci Signal* 2019;**12**. doi:10.1126/SCISIGNAL.AAU9048

226 Wang J, Simonavicius N, Wu X, *et al*. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem* 2006;**281**:22021–8. doi:10.1074/JBC.M603503200

227 Williams BB, Van Benschoten AH, Cimermancic P, *et al*. Discovery and characterization

of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host Microbe* 2014;**16**:495. doi:10.1016/J.CHOM.2014.09.001

228 Chen Y, Xu J, Chen Y. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutr 2021, Vol 13, Page 2099* 2021;**13**:2099. doi:10.3390/NU13062099

229 Gao K, Mu C, Farzi A, *et al*. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. *Adv Nutr* 2020;**11**:709. doi:10.1093/ADVANCES/NMZ127

230 Philippe C, Szabo de Edelenyi F, Naudon L, *et al*. Relation between Mood and the Host-Microbiome Co-Metabolite 3-Indoxylsulfate: Results from the Observational Prospective NutriNet-Santé Study. *Microorganisms* 2021;**9**. doi:10.3390/MICROORGANISMS9040716

231 Gao J, Xu K, Liu H, *et al*. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;**8**:13. doi:10.3389/FCIMB.2018.00013/BIBTEX

232 Emoto T, Hayashi T, Tabata T, *et al*. Metagenomic analysis of gut microbiota reveals its role in trimethylamine metabolism in heart failure. *Int J Cardiol* 2021;**338**:138–42. doi:10.1016/J.IJCARD.2021.06.003

233 Ding S, Xue J, Zhang Q, *et al*. Trimethylamine-N-oxide is an important target for heart and brain diseases. *Med Rev* 2022;**2**:321–3. doi:10.1515/MR-2022-0026/MACHINEREADABLECITATION/RIS

234 Qaidi S El, Yang J, Zhang JR, *et al*. The Vitamin B6 Biosynthesis Pathway in Streptococcus pneumoniae Is Controlled by Pyridoxal 5′-Phosphate and the Transcription Factor PdxR and Has an Impact on Ear Infection. *J Bacteriol* 2013;**195**:2187. doi:10.1128/JB.00041-13

235 Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 2007;**85**:1185–96. doi:10.1093/AJCN/85.5.1185

236 Passmore IJ, Letertre MPM, Preston MD, *et al*. Para-cresol production by Clostridium difficile affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLoS Pathog* 2018;**14**. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1007191

237 Harrison MA, Faulds-Pain A, Kaur H, *et al*. Clostridioides difficile para-cresol production is induced by the precursor para-hydroxyphenylacetate. *J Bacteriol* 2020;**202**. doi:10.1128/JB.00282-20/SUPPL_FILE/JB.00282-20-S0002.PDF

238 Vinithakumari AA, Padhi P, Hernandez B, *et al*. Clostridioides difficile Infection Dysregulates Brain Dopamine Metabolism. *Microbiol Spectr* 2022;**10**. doi:10.1128/SPECTRUM.00073-22

239 Boehm G, Moro G, Muller D, *et al*. Fecal cholesterol excretion in preterm infants fed breast milk or formula with different cholesterol contents. *Acta Paediatr* 1995;**84**:240–4. doi:10.1111/J.1651-2227.1995.TB13622.X

240 Kazda H, Taylor N, Healy D, *et al*. Maternal, Umbilical, and Amniotic Fluid Concentrations of Tryptophan and Kynurenine after Labor or Cesarean Section. *Pediatr Res 1998 443* 1998;**44**:368–73. doi:10.1203/00006450-199809000-00017

241 Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat*

Commun 2018;**9**. doi:10.1038/S41467-018-05470-4

242 Berstad A, Arslan G, Folvik G. Relationship between intestinal permeability and calprotectin concentration in gut lavage fluid. *Scand J Gastroenterol* 2000;**35**:64–9. doi:10.1080/003655200750024551

243 Shulman RJ, Chichlowski M, Orozco FG, *et al.* Infant behavioral state and stool microbiome in infants receiving Lactocaseibacillus rhamnosus GG in formula: randomized controlled trial. *BMC Pediatr* 2022;**22**:1–15. doi:10.1186/S12887-022-03647-X/FIGURES/8

244 Li F, Ma J, Geng S, *et al.* Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months. *PLoS One* 2015;**10**:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0119574

245 Josefsson S, Bunn SK, Domellöf M. Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;**44**:407–13. doi:10.1097/MPG.0B013E3180320643

246 Park JS, Cho JY, Chung C, *et al.* Dynamic Changes of Fecal Calprotectin and Related Clinical Factors in Neonates. *Front Pediatr* 2020;**8**:326. doi:10.3389/FPED.2020.00326

247 Łoniewska B, Adamek K, Węgrzyn D, *et al.* Analysis of Faecal Zonulin and Calprotectin Concentrations in Healthy Children During the First Two Years of Life. An Observational Prospective Cohort Study. *J Clin Med* 2020;**9**:777. doi:10.3390/JCM9030777

248 Ho TTB, Groer MW, Kane B, *et al.* Enteric Dysbiosis and Fecal Calprotectin Expression in Premature Infants. *Pediatr Res* 2019;**85**:361. doi:10.1038/S41390-018-0254-Y

249 Šplíchal I, Fagerhol MK, Trebichavský I, *et al.* The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with Escherichia coli on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. *Immunobiology* 2005;**209**:681–7. doi:10.1016/J.IMBIO.2004.09.009

250 Campeotto F, Kalach N, Lapillonne A, *et al.* Time course of faecal calprotectin in preterm newborns during the first month of life. *Acta Pædiatrica* 2007;**96**:1531–3. doi:10.1111/J.1651-2227.2007.00457.X

251 Howarth C, Banerjee J, Eaton S, *et al.* Biomarkers of gut injury in neonates – where are we in predicting necrotising enterocolitis? *Front Pediatr* 2022;**10**. doi:10.3389/FPED.2022.1048322

252 Jenke ACW, Zilbauer M, Postberg J, *et al.* Human β-defensin 2 expression in ELBW infants with severe necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res 2012 725* 2012;**72**:513–20. doi:10.1038/pr.2012.110

253 Kaczmarczyk M, Löber U, Adamek K, *et al.* The gut microbiota is associated with the small intestinal paracellular permeability and the development of the immune system in healthy children during the first two years of life. *J Transl Med* 2021;**19**:177. doi:10.1186/S12967-021-02839-W

254 Pang T, Leach ST, Katz T, *et al.* Fecal biomarkers of intestinal health and disease in children. *Front Pediatr* 2014;**2**:76335. doi:10.3389/FPED.2014.00006/BIBTEX

255 Kai-Larsen Y, Bergsson G, Gudmundsson GH, *et al.* Antimicrobial Components of the Neonatal Gut Affected Upon Colonization. *Pediatr Res 2007 615* 2007;**61**:530–6. doi:10.1203/pdr.0b013e318045be83

256 Orivuori L, Mustonen K, de Goffau MC, *et al.* High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6. *Clin Exp Allergy* 2015;**45**:928–39. doi:10.1111/CEA.12522

257 Donowitz JR, Cook H, Alam M, *et al.* Role of maternal health and infant inflammation in nutritional and neurodevelopmental outcomes of two-year-old Bangladeshi children. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;**12**. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0006363

258 Tadin Hadjina I, Zivkovic PM, Matetic A, *et al.* Impaired neurocognitive and psychomotor performance in patients with inflammatory bowel disease. *Sci Reports 2019 91* 2019;**9**:1–13. doi:10.1038/s41598-019-50192-2

259 Aung MT, Ferguson KK, Cantonwine DE, *et al.* Preterm birth in relation to the bisphenol A replacement, bisphenol S, and other phenols and parabens. *Environ Res* 2019;**169**:131. doi:10.1016/J.ENVRES.2018.10.037

260 Campbell-Yeo ML, Allen AC, Joseph KS, *et al.* Effect of domperidone on the composition of preterm human breast milk. *Pediatrics* 2010;**125**. doi:10.1542/PEDS.2008-3441

261 Gounaris A, Costalos C, Varchalama E, *et al.* Gastric emptying of preterm neonates receiving domperidone. *Neonatology* 2010;**97**:56–60. doi:10.1159/000231517

262 Ito T, Sekizuka T, Kishi N, *et al.* Conventional culture methods with commercially available media unveil the presence of novel culturable bacteria. *Gut Microbes* 2019;**10**:77. doi:10.1080/19490976.2018.1491265

263 Soeorg H, Metsvaht HK, Keränen EE, *et al.* Genetic Relatedness of Staphylococcus haemolyticus in Gut and Skin of Preterm Neonates and Breast Milk of Their Mothers. *Pediatr Infect Dis J* 2019;**38**:308–13. doi:10.1097/INF.0000000000002056

264 Fiche technique Staphylococcus haemolyticus.

265 Yang S, Xie X, Ma J, *et al.* Selective Isolation of Bifidobacterium From Human Faeces Using Pangenomics, Metagenomics, and Enzymology. *Front Microbiol* 2021;**12**. doi:10.3389/FMICB.2021.649698/FULL

266 Mokhtari A, Blancato VS, Repizo GD, *et al.* Enterococcus faecalis utilizes maltose by connecting two incompatible metabolic routes via a novel maltose 6′-phosphate phosphatase (MapP). *Mol Microbiol* 2013;**88**:234–53. doi:10.1111/MMI.12183

267 Van Leeuwen PT, Brul S, Zhang J, *et al.* Synthetic microbial communities (SynComs) of the human gut: Design, assembly, and applications. *FEMS Microbiol Rev* 2023;**47**:1–14. doi:10.1093/femsre/fuad012

268 LaPlante KL, Rybak MJ, Leuthner KD, *et al.* Impact of Enterococcus faecalis on the Bactericidal Activities of Arbekacin, Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Mixed-Pathogen Pharmacodynamic Model. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;**50**:1298. doi:10.1128/AAC.50.4.1298-1303.2006

269 Mulyadi Y, Gani RA, Abdullah M, *et al.* The Effect of Domperidone on Intestinal Motility and Bacterial Overgrowth in Patients with Liver Cirrhosis. *Indones J Gastroenterol*;**130**.

270 Ribeiro AR, Gonçalves VMF, Maia AS, *et al.* Microbial degradation of pharmaceuticals followed by a simple HPLC-DAD method. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ*

Eng 2012;**47**:2151–8. doi:10.1080/10934529.2012.696422

271 Catron TR, Keely SP, Brinkman NE, *et al.* Host Developmental Toxicity of BPA and BPA Alternatives Is Inversely Related to Microbiota Disruption in Zebrafish. *Toxicol Sci* 2019;**167**:468–83. doi:10.1093/TOXSCI/KFY261

272 Feng D, Zhang H, Jiang X, *et al.* Bisphenol A exposure induces gut microbiota dysbiosis and consequent activation of gut-liver axis leading to hepatic steatosis in CD-1 mice. *Environ Pollut* 2020;**265**:114880. doi:10.1016/J.ENVPOL.2020.114880

273 Durazzi F, Sala C, Castellani G, *et al.* Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Sci Reports 2021 111* 2021;**11**:1–10. doi:10.1038/s41598-021-82726-y

274 Nguyen QP, Karagas MR, Madan JC, *et al.* Associations between the gut microbiome and metabolome in early life. *BMC Microbiol* 2021;**21**. doi:10.1186/S12866-021-02282-3

275 Bekhti N, Castelli F, Paris A, *et al.* The Human Meconium Metabolome and Its Evolution during the First Days of Life. *Metabolites* 2022;**12**. doi:10.3390/METABO12050414/S1

276 Skrivankova V, Zwahlen M, Adams M, *et al.* Spatial epidemiology of gestational age and birth weight in Switzerland: census-based linkage study. *BMJ Open* 2019;**9**:e027834. doi:10.1136/BMJOPEN-2018-027834

277 Ramos Mejía T, Larcade R. Gestational age, mode of delivery, and relation to the day and time of birth in two private health care facilities. *Arch Argent Pediatr* 2021;**119**. doi:10.5546/aap.2021.eng.18

278 Sánchez C, Fente C, Regal P, *et al.* Human Milk Oligosaccharides (HMOs) and Infant Microbiota: A Scoping Review. *Foods* 2021;**10**. doi:10.3390/FOODS10061429

279 Yang L, Mu X, Nie Y, *et al.* Improving the production of NAD+ via multi-strategy metabolic engineering in Escherichia coli. *Metab Eng* 2021;**64**:122–33. doi:10.1016/J.YMBEN.2021.01.012

280 Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Duelo A, *et al.* Intestinal Dysbiosis in Patients with Histamine Intolerance. *Nutrients* 2022;**14**. doi:10.3390/NU14091774/S1

281 Barcik W, Wawrzyniak M, Akdis CA, *et al.* Immune regulation by histamine and histamine-secreting bacteria. *Curr Opin Immunol* 2017;**48**:108–13. doi:10.1016/J.COI.2017.08.011

282 Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, *et al.* Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci* 2017;**11**:490. doi:10.3389/FNINS.2017.00490

283 Praveenraj SS, Sonali S, Anand N, *et al.* The Role of a Gut Microbial-Derived Metabolite, Trimethylamine N-Oxide (TMAO), in Neurological Disorders. *Mol Neurobiol 2022 5911* 2022;**59**:6684–700. doi:10.1007/S12035-022-02990-5

284 Faïs T, Cougnoux A, Dalmasso G, *et al.* Antibiotic activity of Escherichia coli against multiresistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;**60**:6986–8. doi:10.1128/AAC.00130-16/SUPPL_FILE/ZAC011165699SO1.PDF

285 Shaterian N, Abdi F, Ghavidel N, *et al.* Role of cesarean section in the development of neonatal gut microbiota: A systematic review. *Open Med* 2021;**16**:624–39.

doi:10.1515/MED-2021-0270/ASSET/GRAPHIC/J_MED-2021-0270_FIG_002.JPG

286 Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, *et al*. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Heal Dis* 2015;**26**. doi:10.3402/MEHD.V26.26050

287 Schipper L, Dijk G van, Beek EM van der. Milk lipid composition and structure; The relevance for infant brain development. *OCL* 2020;**27**:5. doi:10.1051/OCL/2020001

288 Daliry A, Pereira ENG da S. Role of Maternal Microbiota and Nutrition in Early-Life Neurodevelopmental Disorders. *Nutrients* 2021;**13**. doi:10.3390/NU13103533

289 Bhattarai Y, Williams BB, Battaglioli EJ, *et al*. Gut Microbiota-Produced Tryptamine Activates an Epithelial G-Protein-Coupled Receptor to Increase Colonic Secretion. *Cell Host Microbe* 2018;**23**:775-785.e5. doi:10.1016/J.CHOM.2018.05.004

290 Du H, Liu B, Wang X, *et al*. Exploring the microbial origins of p-cresol and its co-occurrence pattern in the Chinese liquor-making process. *Int J Food Microbiol* 2017;**260**:27–35. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.08.016

291 Gryp T, Vanholder R, Vaneechoutte M, *et al*. p-Cresyl Sulfate. *Toxins 2017, Vol 9, Page 52* 2017;**9**:52. doi:10.3390/TOXINS9020052

292 Tevzadze G, Barbakadze T, Kvergelidze E, *et al*. Gut neurotoxin p-cresol induces brain-derived neurotrophic factor secretion and increases the expression of neurofilament subunits in PC-12 cells. *AIMS Neurosci* 2022;**9**:12. doi:10.3934/NEUROSCIENCE.2022002

293 Barroso A, Mahler JV, Fonseca-Castro PH, *et al*. The aryl hydrocarbon receptor and the gut–brain axis. *Cell Mol Immunol 2020 182* 2021;**18**:259–68. doi:10.1038/s41423-020-00585-5

294 Scott SA, Fu J, Chang P V. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;**117**:19376–87. doi:10.1073/PNAS.2000047117/-/DCSUPPLEMENTAL