

**UNIVERSITE DE LIMOGES**  
**ECOLE DOCTORALE THÉMATIQUE Pédiatrie**

**Faculté de Médecine**

Thèse n° [ ]

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
**Docteur en Médecine de l'Université de Limoges**

Discipline: **Pédiatrie**

**Présentée et soutenue par**

**Marianne PEYRE, née le 10 Juin 1982**  
**Le 17 Juin 2011**

**CINETIQUE D'ACQUISITION DES INTEGRONS DE  
MULTIRESISTANCE DES NOUVEAU-NES DE  
MATERNITE ET NEONATOLOGIE**

Thèse dirigée par Monsieur le Docteur **Antoine Bedu**

Présentée devant le jury composé de:

Professeur **Anne LIENHARDT-ROUSSIE**  
Docteur **Antoine BEDU**  
Professeur **Vincent GUIGONIS**  
Professeur **Marie-Cécile PLOY**  
Professeur **Fabien GARNIER**

*Présidente*  
*Directeur de thèse*  
*Examineur*  
*Examineur*  
*Examineur*

2 rue du Dr Marcland  
87025 Limoges cedex  
Tél. 05 55 43 58 00  
Fax 05 55 43 58 01  
www.unilim.fr



**DOYEN DE LA FACULTE:**

Monsieur le Professeur VALLEIX Denis

**ASSESEURS:**

Monsieur le Professeur LASKAR Marc  
Monsieur le Professeur MOREAU Jean-Jacques  
Monsieur le Professeur PREUX Pierre-Marie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:**

\* C.S = Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE, VIROLOGIE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S)	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BEAULIEU Pierre	ANESTHESIOLOGIE et REANIMATION CHIRURGICALE
BEDANE Christophe	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe (C.S)	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre (C.S)	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S.)	DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HEMATOLOGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S)	RADIOETHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S)	PSYCHIATRIE ADULTES
COGNE Michel (C.S)	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre	UROLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry (C.S)	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (Sur 31/08/2011)	PEDIATRIE
DENIS François (Sur 31/08/2011)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESPOIT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel (C.S)	MEDECINE ET SANTE DU TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe (C.S)	UROLOGIE
DUMONT Daniel (Sur 31/08/2012)	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FEISS Pierre (Sur 31.08.2013)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
FEUILLARD Jean (C.S)	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAINANT Alain (C.S)	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S) (Retraite au 04.10.10)	REANIMATION MEDICALE
GUIGONIS Vincent	PÉDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne (CS)	PEDIATRIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MAUBON Antoine	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MELLONI Boris (C.S)	PNEUMOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
MONTEIL Jacques (C.S)	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE

<b>MOULIÉS</b> Dominique (C.S) ( <b>Sur. 31.08.2013</b> )	CHIRURGIE INFANTILE
<b>MOUNAYER</b> Charbel	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
<b>NATHAN-DENIZOT</b> Nathalie (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
<b>PARAF</b> François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
<b>PLOY</b> Marie-Cécile (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>PREUX</b> Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
<b>ROBERT</b> Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
<b>SALLE</b> Jean-Yves (C.S)	MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
<b>SAUTEREAU</b> Denis (C.S)	GASTRO-ENTEROLOGIE, HEPATOLOGIE
<b>SAUVAGE</b> Jean-Pierre ( <b>Sur 31/08/2011</b> )	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
<b>STURTZ</b> Franck (C.S)	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>TEISSIER-CLEMENT</b> Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
<b>TREVES</b> Richard	RHUMATOLOGIE
<b>TUBIANA-MATHIEU</b> Nicole (C.S)	CANCEROLOGIE
<b>VALLAT</b> Jean-Michel (C.S)	NEUROLOGIE
<b>VALLEIX</b> Denis (C.S)	ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
<b>VANDROUX</b> Jean-Claude ( <b>Sur 31/08/2011</b> )	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
<b>VERGENEGRE</b> Alain (C.S)	EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE et PREVENTION
<b>VIDAL</b> Elisabeth (C.S)	MEDECINE INTERNE
<b>VIGNON</b> Philippe	REANIMATION MEDICALE
<b>VIROT</b> Patrice (C.S)	CARDIOLOGIE
<b>WEINBRECK</b> Pierre (C.S)	MALADIES INFECTIEUSES
<b>YARDIN</b> Catherine (C.S)	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE

#### **MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS**

<b>AJZENBERG</b> Daniel	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
<b>ANTONINI</b> Marie-Thérèse (C.S)	PHYSIOLOGIE
<b>BOURTHOUMIEU</b> Sylvie	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
<b>BOUTEILLE</b> Bernard	PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE
<b>CHABLE</b> Hélène	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>DURAND-FONTANIER</b> Sylvaine	ANATOMIE – CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>ESCLAIRE</b> Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>FUNALOT</b> Benoît	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>HANTZ</b> Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>LAROCHE</b> Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
<b>LE GUYADER</b> Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
<b>MARIN</b> Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
<b>MOUNIER</b> Marcelle	BACTERIOLOGIE – VIROLOGIE – HYGIENE HOSPITALIERE
<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
<b>QUELVEN-BERTIN</b> Isabelle	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
<b>TERRO</b> Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>VERGNE-SALLE</b> Pascale	THERAPEUTIQUE
<b>VINCENT</b> François	PHYSIOLOGIE

#### **PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE**

<b>CAIRE</b> François	NEUROCHIRURGIE
-----------------------	----------------

#### **P.R.A.G.**

<b>GAUTIER</b> Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

#### **PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS**

<b>BUCHON</b> Daniel	MÉDECINE GÉNÉRALE
<b>BUISSON</b> Jean-Gabriel	MEDECINE GENERALE

#### **MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS**

<b>DUMOITIER</b> Nathalie	MEDECINE GENERALE
<b>MENARD</b> Dominique	MEDECINE GENERALE
<b>PREVOST</b> Martine	MEDECINE GENERALE

*A ma soeur,*

*Pour sa force morale*

*Sa vivacité*

*Et son amour*

A Madame le Professeur Anne Lienhardt-Roussié,  
merci d'avoir accepté de présider de mon jury de Thèse. Votre formation de Pédiatrie à Limoges m'aura permis d'atteindre mes objectifs.

A Monsieur le Professeur Vincent Guignonis,  
merci d'avoir accepté de faire parti de mon jury de Thèse. Merci pour votre investissement si précieux dans notre formation. Enfin, merci pour votre humanité. Votre exercice de la médecine restera toujours pour moi un modèle à suivre.

A Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy,  
merci d'avoir permis à ce travail de se réaliser et d'avoir su par votre esprit de synthèse m'aiguiller quand il le fallait.

A Monsieur le Professeur Fabien Garnier,  
merci de m'avoir formée aux techniques de bactériologie et d'avoir soutenu ce projet auprès de vos équipes.

A Monsieur le Docteur Antoine Bedu,  
Merci pour votre patience et votre confiance en moi pour ce travail. Votre esprit, votre humour et votre exigence dans le travail resteront comme références dans ma pratique.

*A ma famille.*

*A ma mère et mon père,  
sans qui je n'aurais jamais pu arriver jusque là. Votre amour et  
vos sacrifices m'ont portée à des hauteurs inespérées.*

*A mamie Lili et papi Roland,  
pour votre confiance et votre soutien inconditionnel et surtout, à  
la touche artistique que vous avez mis en moi... qui restera la  
seule hélas...*

*A tatie cock', tonton Bruno, Vivi et Camille,  
pour votre pêche d'enfer et nos petits week-end famille.*

*A tatie Mireille, Jérôme et Julien,  
vous avez su être présents malgré l'éloignement.*

*A papi Henri et mamé Anna, vous manquerez toujours.*

*J'espère seulement qu'après ces années passées à m'éloigner, je  
pourrais enfin être plus proche et plus présente à vos côtés.*

*Aux copains d'avant,*

*A Alexandre et Karine, pour cette amitié qui dure depuis... le berceau*

*A Aurélie, pour nos scéances "Bad-boy" au lieu de réviser le Brevet*

*A Mickaël, aujourd'hui devenu plus Vaisonnais que moi*

*Aux copains de fac., Sandra, Charlotte, Valérie, Benoît...*

*Et enfin à Caroline, Aurélien, Samuel, Olivier et tous les autres, pour notre amitié qui dure depuis Montpel' et nos week-end fin du monde.*

Aux Limougeauds,

*A Cécile Laroche, maître yoda, mon maître spirituel, merci pour ces petits moments "infu" privilégiés*

*A Jane Languepin pour sa confiance, et son amitié*

*A Philippe Brosset pour sa formation, sa confiance, et l'opportunité de carrière qu'il m'a offerte*

*A ma petite Marie, merci pour ton amitié, ton soutien en toute circonstance, merci pour ta gentillesse et pour tous ces "coups" bus en terrasse...*

*A Marie-Lo et JB, merci pour votre amitié sans faille, merci pour votre esprit sain, merci pour toutes les tartes à la rhubarbes, framboises du jardins, soirées guitare et autres statistiques de thèse... Tu m'as sauvée... Encore mille fois merci*

*A Florence et Anthony, merci d'être un si beau modèle*

*A Pap', Achille, Youcef, Jean-Phi, Lydia et le petit Vincenzo, Vincent, Chloé et le petit Louis, ma petite famille Limougeaude*

*A Marion, Aurélien et JB, pour nos soirées canapé*

*A mes co-internes de Luxe, Fanny, Julie, Alex, Alex, Charlotte, Laure, Anne-So, Cécile, Amélie et Elsa*

*A mes externes préférés, Bene, Quentin, FL et Seb*

*A toutes les infirmières, auxiliaires et autre brancardier avec qui on a passé des moments d'exception dans les services de Pédiatrie.*

*Aux Toulousains,*

*Merci à Julie et Lionel pour votre amitié depuis la Réunion, et à Julie, pour tous nos moments partagés là-bas*

*Aux copines de l'internat, à Mathilde pour notre rencontre prometteuse*

*A mes nouvelles co-internes Aline et Emilie, qui me servent de guide à l'hôpital et me supportent dans cette dernière ligne droite*

*A mes nouveaux chefs pour leur patience et leur confiance.*

*Enfin, un grand merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail:*

*Les sage-femmes de salle de naissance et maternité pour leur aide précieuse dans les prélèvements*

*Un merci particulier à Cyrille pour son implication et Yves Aubard pour avoir soutenu la réalisation de ce projet*

*Toute l'équipe de néonatalogie et réanimation pour leur aide précieuse,*

*Un remerciement tout particulier à Danièle Bertin et Sandrine la secrétaire pour leur dévouement consciencieux*

*Merci à Nicolas Rodier et Claire Bahans pour l'organisation, la gestion et la mise en place du protocole*

*Un grand merci à Olivier Barraud et Delphine Chainier sans qui ce travail n'aurait pas été possible*

*Anne, qui a apporté une aide précieuse à la technique des prélèvements*

*Enfin, merci aux externes des 0-4 ans de l'été dernier (Vaël, Vincent, Benoît et Lilian) pour leur précieuse aide...*

## **PLAN**

<b>I- INTRODUCTION</b> .....	15
<b>II- GENERALITES</b> .....	18
A- ETUDE DE LA COLONISATION BACTERIENNE INTESTINALE DU NN .....	18
1- MÉTHODES D'ÉTUDE DE LA FLORE MICROBIENNE INTESTINALE BASÉES SUR LA CULTURE .....	18
2- MÉTHODES D'ÉTUDE MOLÉCULAIRES BASÉES SUR L'ARN RIBOSOMIQUE.....	19
<b>B- ETABLISSEMENT DE LA FLORE DIGESTIVE CHEZ LE NN</b> .....	21
1- SÉQUENCE DE COLONISATION BACTÉRIENNE DIGESTIVE DU NN À TERME, PAR VOIE BASSE, ALLAITÉ AU SEIN .....	21
2- FACTEURS LOCAUX D'INFLUENCE DE LA COLONISATION BACTÉRIENNE DIGESTIVE .....	22
3- IMPORTANCE DE LA COLONISATION BACTÉRIENNE INITIALE SUR LA SANTÉ DE L'HÔTE.....	23
3-1. <u>Induction du système immunitaire muqueux</u> .....	23
3-2. <u>Acquisition de la tolérance aux antigènes alimentaires</u> .....	24
3-3. <u>Défense antibactérienne</u> .....	25
3-3- <u>Métabolisme des résidus alimentaires</u> .....	26
3-4 <u>Maturation intestinale post-natale</u> .....	27
3-5- <u>Cas particulier de l'entérocolite ulcéro-nécrosante (ECUN) du NN</u> .....	27
<b>C- FACTEURS INFLUENCANT LA CINÉTIQUE D' IMPLANTATION DE LA FLORE BACTERIENNE CHEZ LE NN</b> .....	28
1- LE MODE D'ACCOUCHEMENT.....	28
2- LE TYPE D' ALLAITEMENT.....	29
3- PREVENTION DES INFECTIONS A STREPTOCOQUE DU GROUPE B (SB).....	30
3-1. <u>Prophylaxie maternelle des infections à SB</u> .....	30
3-2. <u>Antibiothérapie néonatale dans le cadre des suspicions d'IMF</u> .....	30
4- LA PRÉMATURITE.....	31
5- L'ENVIRONNEMENT.....	33
<b>D- LES INTEGRONS</b> .....	34
1- HISTOIRE.....	34
2- DÉFINITION.....	34
3- STRUCTURE DES INTÉGRONS.....	35

4- LES CASSETTES.....	36
5- LES DIFFERENTS TYPES D'INTEGRONS.....	37
6- LES INTEGRONS COMME SUPPORT DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES.....	38
<b>III- L'ETUDE.....</b>	<b>39</b>
<b>A- HYPOTHESE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>39</b>
1- HYPOTHESE.....	39
2- OBJECTIFS.....	39
2-1. <u>L'objectif principal</u> .....	39
2-2. <u>Les objectifs secondaires</u> .....	40
<b>B- MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>40</b>
1- CADRE SCIENTIFIQUE DE L'ETUDE.....	40
2- TYPE D'ETUDE.....	40
3- CONSENTEMENT.....	40
4- SCHEMA DE L'ETUDE.....	41
4-1. <u>Protocoles de recueil</u> .....	41
4-2. <u>Techniques de recueil</u> .....	42
4-3. <u>Conservation et acheminement des prélèvements</u> .....	43
4-4. <u>Conservation des prélèvements dans l'unité de Bactériologie</u> .....	43
5- POPULATION.....	44
5-1. <u>Nombre de sujets de l'étude</u> .....	44
5-2. <u>Critères d'éligibilité</u> .....	44
6- RECUEIL DES DONNÉES CLINIQUES.....	45
7- TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES.....	45
7-1. <u>Techniques de microbiologie conventionnelle</u> .....	45
7-2. <u>Techniques moléculaires</u> .....	47
8- RECHERCHE DES INTEGRONS.....	47
9- OUTILS STATISTIQUES.....	48
<b>IV- RESULTATS.....</b>	<b>50</b>
<b>A- DESCRIPTION DE LA POPULATION.....</b>	<b>50</b>
1- DESCRIPTION DE LA POPULATION PEDIATRIQUE.....	50
1-1. <u>Population de maternité</u> .....	50
1-2. <u>Population de néonatalogie</u> .....	51
2- DONNEES MATERNELLES ET OBSTETRIQUES.....	53

<b>B- CINETIQUE D' ACQUISITION DES INTEGRONS.....</b>	<b>55</b>
1- NOMBRE D'ENFANTS PORTEURS EN INTEGRONS.....	55
2- REPARTITION DES PRELEVEMENTS POSITIFS SELON LEURS TYPES.....	55
3- CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS PORTEURS D'INTEGRONS.....	57
4- CINETIQUE QUALITATIVE D'ACQUISITION DES INTEGRONS.....	61
4-1. <u>NN de Maternité</u> .....	61
4-2. <u>NN de Néonatalogie</u> .....	62
1- CINETIQUE QUANTITATIVE D'ACQUISITION DES INTEGRONS DANS LA POPULATION DE NEONATOLOGIE.....	63
<b>C- ANALYSE EN FONCTION DES CRITÈRES DE JUGEMENT SECONDAIRES.....</b>	<b>64</b>
1- ANALYSE UNIVARIEE DES FACTEURS SUPPOSÉS A RISQUE D'AUGMENTER LE PORTAGE EN INTEGRONS DE LA POPULATION DE MATERNITE.....	64
2- ANALYSE MULTIVARIÉE DANS LA POPULATION DE MATERNITE.....	66
3- ANALYSE UNIVARIEE DES FACTEURS SUPPOSÉS A RISQUE D'AUGMENTER LE PORTAGE EN INTEGRONS DE LA POPULATION DE NEONATOLOGIE.....	68
4- ANALYSE MULTIVARIEE DES FACTEURS SIGNIFICATIFS ( $p < 0,2$ ) DE LA POPULATION DE NEONATOLOGIE.....	69
<b>D- RESULTATS DES CULTURES BACTÉRIOLOGIQUES.....</b>	<b>70</b>
1- PRINCIPALES ESPECES ISOLEES.....	70
2- NOMBRE DE BGN PAR TYPE DE PRELEVEMENT.....	72
2-1. <u>Répartition des cultures positives selon les prélèvements</u> .....	72
2-2. <u>Cinétique d'acquisition des BGN en néonatalogie</u> .....	73
3- NOMBRE MOYEN DE BGN PAR ENFANT.....	74
4- LIEN BGN/INTEGRONS.....	75
4-1. <u>Association par germe entre la colonisation en BGN, portage en intégron et BMR en maternité et néonatalogie</u> .....	75
4-2. <u>Lien entre acquisition des BGN et portage en intégrons</u> .....	77
<b>E- ACQUISITION DES BMR.....</b>	<b>77</b>
1- ACQUISITION DE BMR EN NEONATOLOGIE ET MATERNITE.....	77
2- ACQUISITION DES BMR EN MATERNITE.....	79
3- ACQUISITION DES BMR EN NEONATOLOGIE.....	80
3-1. <u>Analyse univariée</u> .....	80

3-2. <u>Analyse multivariée</u> .....	81
4- BGN, BMR ET INTEGRONS.....	81
4-1. <u>Lien entre acquisition des BGN et portage en BMR</u> .....	81
4-2. <u>Lien entre colonisation digestive à <i>E. coli</i> intégron+ et acquisition de multirésistances.</u> .....	82
4-3. <u>Lien entre portage en intégrons et BMR</u> .....	82
V- <b><u>DISCUSSION</u></b> .....	84
VI- <b><u>CONCLUSION</u></b> .....	95
VII- <b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	96
VIII- <b><u>RESUME ET MOTS CLES</u></b> .....	100
IX- <b><u>ABSTRACT AND KEY WORDS</u></b> .....	101
X- <b><u>INDEX DES TABLEAUX</u></b> .....	102
XI- <b><u>INDEX DES FIGURES</u></b> .....	105
XII- <b><u>LISTE DES ANNEXES</u></b> .....	106
XIII- <b><u>GLOSSAIRE</u></b> .....	107
XIV- <b><u>SERMENT D'HIPPOCRATE</u></b> .....	108

## I- INTRODUCTION

Le tube digestif du nouveau-né (NN) est stérile à la naissance. Dès les premières heures de vie, il se colonise par les bactéries de son environnement, essentiellement les bactéries des flores maternelles d'origine fécale et vaginale [1]. L'écosystème bactérien du NN a fait l'objet de nombreuses études descriptives notamment dans le but de comprendre les rouages des interactions "hôte-bactéries". Ces interactions, survenant très tôt dans la colonisation bactérienne du tube digestif, permettent de comprendre les fonctions essentielles de la flore intestinale sur l'hôte, l'immunité, les tolérances alimentaires et la physiopathologie de maladies digestives comme les maladies inflammatoires chroniques intestinales. Depuis une dizaine d'années, les études montrent un retard global de l'implantation de la flore, y compris chez les NN à terme et nourris au sein, principalement sur les entérobactéries, *Bacteroides* et les bifidobactéries, germes non pathogènes voire bénéfiques sur la trophicité intestinale[1]. Ces modifications concernent l'ensemble des NN dans les pays industrialisés. Elles sont vraisemblablement dues aux conditions d'asepsie entourant les accouchements, à l'antibioprophylaxie *per partum*, réduisant la transmission de la flore de la mère au NN, favorisant ainsi l'acquisition de souches de l'environnement. Le prématuré, dont le tube digestif est non fonctionnel et immature est particulièrement exposé à ces modifications.

La plupart des analyses de la microflore intestinale sont basées sur des techniques de culture microbiologique classiques. Cependant, chez l'homme, la microflore intestinale renferme environ  $10^{14}$  bactéries appartenant à plus de 400 espèces différentes. Quarante-neuf pour-cent de ces cellules sont représentées par des bactéries anaérobies strictes dont l'étude en culture traditionnelle est un travail conséquent et difficile. Enfin, 50% des espèces ne sont pas cultivables par ces techniques de culture [1]. De nouvelles techniques, basées sur la biologie moléculaire, ont permis d'obtenir une meilleure représentation de la flore digestive microbienne. Ces techniques sont basées sur l'extraction directe d'ADN à partir du prélèvement et l'amplification d'ADN codant l'ARN 16S recombinant avec des amorces universelles. Certaines études concernent le NN et le prématuré, permettant de connaître avec plus de précision les séquences de l'établissement du microbiote.

En 1989, Hatch Stokes et Ruth Hall ont décrit un nouvel élément baptisé « intégron »

qui constitue un système original de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Aujourd'hui, les intégrons sont considérés comme des acteurs majeurs de la dissémination des résistances aux antibiotiques dans le monde bactérien, majoritairement chez les bacilles gram négatif (BGN). Aucune étude jusqu'à présent ne s'était attachée à rechercher de tels marqueurs de portage bactérien de la multi-résistance chez les NN.

Nous avons mené une étude prospective sur le CHU de Limoges portant sur 236 NN de maternité et néonatalogie (respectivement 188 et 48 NN) afin de déterminer l'existence ou non d'un portage néonatal en intégrons, aux prémices de la formation du microbiote intestinal, puis d'en décrire une cinétique d'acquisition.

## II- GENERALITES

### A- ETUDE DE LA COLONISATION BACTERIENNE INTESTINALE DU NN

Le tube digestif héberge des microorganismes dont la quantité, voisine de  $10^{11}$  UFC/g de selle est cent fois plus importante que le nombre de cellules du corps humain[1]. Les connaissances de la flore microbienne intestinale ont évolué au fur et à mesure que l'on en comprenait l'intérêt. Jusqu'à ces dix dernières années, les connaissances étaient limitées aux seuls microorganismes présents dans la flore fécale et cultivable. Hors il est clairement établi aujourd'hui que la flore résidente et principale digestive est une flore anaérobie stricte située au fond des cryptes des villosités intestinales et non retrouvée dans les matières fécales. Les techniques actuelles de biologie moléculaire ont largement contribué à une description plus fine du contenu colique et des interactions bactéries-hôtes au sein du tube digestif [2].

#### 1- Méthodes d'étude de la flore microbienne intestinale basées sur la culture

La description pionnière d'un micro-organisme de la flore intestinale fût faite par Escherich en 1885, sur le germe *Bacterium Coli*. Les travaux successifs de Pasteur, Hungate, Freter[3] et Holdeman ont ensuite permis l'isolement d'espèces anaérobies chez l'animal (rumen) puis chez l'homme. Grâce à des études ayant porté sur un grand nombre d'échantillons de selles, il a été possible de décrire la composition globale de la flore fécale humaine cultivable. Les genres principaux répertoriés sont: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Quatre cent espèces seraient susceptibles de coloniser le tube digestif humain mais chaque individu aurait une flore dominante composée de 25 à 40 espèces seulement.

Les espèces sont considérées comme dominantes si leur concentration atteint  $10^8$  à  $10^{11}$  UFC/g de selle. Cette description limitant bien évidemment les bactéries étudiées aux bactéries cultivables, c'est à dire dont la niche écologique est reproductible *in vitro*. Toutes les bactéries nécessitant des conditions de culture inconnues ou difficiles à élaborer, ou dont le développement nécessite la présence d'autres souches bactériennes, ne peuvent pas être mises en évidence par des

techniques de culture classique alors qu'elles peuvent faire partie *in vivo* de la flore dominante.

Les micro-organismes moins représentés ( $10^6$  à  $10^8$  UFC/g) représentent la flore sous-dominante. Celle-ci comprend les aéro-anaérobies facultatifs comme *Escherichia coli*, plus facilement cultivable et donc beaucoup plus étudiée et décrite.

Enfin, on isole facilement une fraction mineure (inférieure à  $10^6$  UFC/g) parfois aérobie, qui se trouve à la surface des selles et ne fait que transiter dans le tube digestif.

La culture a donc permis la description princeps de la flore microbienne digestive. Cependant, les contraintes techniques liées à la culture *in vitro* conduisent à toujours sous-estimer les populations bactériennes. Une large part de la fraction anaérobie restant incultivable dans les conditions actuelles de laboratoire.

## 2- Méthodes d'étude moléculaires basées sur l'ARN ribosomique

Les méthodes d'étude basées sur l'analyse moléculaire de l'ADN codant l'ARN 16S ribosomique (ARNr 16S) ont conduit au bouleversement des connaissances sur l'écosystème intestinal humain.

Leur essor a été lié à quatre caractéristiques du matériel génétique ribosomal:

- l'ARNr est présent dans toutes les cellules bactériennes;
- l'ADN codant l'ARNr 16S n'est pas sujet à des transferts latéraux de matériel génétique;
- la juxtaposition de régions très conservées et de régions variables a permis la constitution rapide d'une base de données (plus de 60 000 séquences à ce jour).
- la structure primaire moléculaire est informative du groupe phylogénétique jusqu'à l'espèce.

Ces analyses moléculaires, réalisées sur souche isolée ou sur extraction d'ADN directement sur selle, ont permis d'inventorier les espèces dominantes du microbiote humain [2]:

- La flore fécale dominante est ainsi constituée de trois lignées phylogénétiques majeures: le groupe *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, le groupe *Clostridium coccoides* et le groupe *Clostridium leptum*;
- Le nombre moyen d'espèces dominantes dans la flore fécale d'un adulte sain peut être évalué à cent en moyenne, celles du sujet âgé et des patients atteints de maladie de Crohn semblent être plus variées;
- Chaque flore fécale présente une diversité d'espèces qui lui est propre;
- Les flores intestinales de différents individus n'ont en commun que très peu d'espèces

Cependant cette technique présente des limites:

- 80% des espèces moléculaires observées n'ont pas de représentant dans les collections de souches actuelles, pouvant correspondre à des micro-organismes non encore cultivés;
- elle présente des biais liés aux techniques d'extraction et de lyse de l'ADN qui selon les espèces, peut être plus fragile et ainsi ne pas apparaître dans les banques de données de séquences.
- La technique est longue et peu sensible sur prélèvement, donc peu utilisable en routine.

Culture et analyse moléculaire sont donc complémentaires et indissociables pour l'étude du microbiote humain [3, 4].

Ces mêmes techniques, appliquées aux enfants, ont fait l'objet de multiples études visant à établir une description de l'écosystème digestif de l'enfant et réaliser une analyse dynamique de la colonisation bactérienne du NN.

## B- ETABLISSEMENT DE LA FLORE DIGESTIVE CHEZ LE NN

Le tractus digestif du NN est stérile *in utero* [1]. La colonisation bactérienne débute dès la rupture des membranes foetales, essentiellement à partir des flores maternelles fécale et vaginale, mais aussi cutanée et de l'environnement proche [1]. Ainsi, dans son étude, Brook démontrait que le contenu gastrique du NN représentait la flore cervico-vaginale de la mère dès les cinq à dix premières minutes de vie de l'enfant [5].

### 1- Séquence de colonisation bactérienne digestive du NN à terme, par voie basse, allaité au sein

La séquence d'acquisition des différents types bactériens, au niveau intestinal, chez le NN, à terme, né par voie basse et allaité au sein a fait l'objet de nombreuses études depuis une étude princeps en 1900 par Tissier.

L'établissement de la flore est un phénomène complexe qui va mettre en jeu de nombreuses réactions physico-chimiques entre les cellules de l'hôte et les agents extérieurs qui vont le coloniser. Toutes les bactéries présentes dans son environnement ne vont pas pouvoir s'implanter:

A la naissance, le potentiel d'oxydo-réduction du tube digestif est élevé (de 0 à 200 mV contre 300 chez les adultes) [6] et ne permet pas la colonisation par les anaérobies stricts. Seuls les organismes aérobies-anaérobies facultatifs; entérobactéries (essentiellement représentées par *Escherichia Coli (E. coli)*), entérocoques et staphylocoques peuvent survivre initialement dans ce milieu riche en oxygène. Leur prolifération est rapide et elles atteignent en quelques heures un niveau de  $10^9$  à  $10^{10}$  UFC/g de contenu colique. Consommant l'oxygène, elles permettent aux germes anaérobies stricts (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) ainsi qu'aux *Lactobacilles*, micro-aérophiles, de s'implanter [7].

Ainsi, reprenant l'ensemble des études portant sur le microbiote du NN, Orrhage K. [6] a pu décrire les séquences de colonisation dont la variation est très rapide dès les premiers jours de vie. Au premier jour, les populations bactériennes sont dominées par les bactéries aérobies de type entérobactéries et entérocoques, chacune présente dans 100% des prélèvements et les staphylocoques, présents dans 83% des cas. Au

premier jour de vie, les germes anaérobies stricts tels *Bacteroides*, les bifidobactéries et les lactobacilles sont indétectables. Le *Clostridium* est déjà présent dans 17% des prélèvements. Dès le deuxième jour de vie, 50% des nouveaux-nés seront colonisés par des germes anaérobies stricts. Au troisième jour, 100% des enfants sont colonisés par les bifidobactéries dont la quantité prédomine ( $10^{8,6}$  UFC/g en moyenne) et qui resteront prévalentes durant les premiers mois de vie [6]. Les aérobies restent présents mais leur proportion diminue, laissant une place majoritaire dès le sixième jour de vie aux anaérobies stricts.

## 2- Facteurs locaux d'influence de la colonisation bactérienne digestive

Les facteurs bactériens permettant l'implantation d'une souche donnée sont peu connus et toutes les bactéries d'origine maternelle ne s'implantent pas chez l'enfant [1].

La glycosylation des couches cellulaires intestinales contrôle différentes fonctions clés de l'intestin comme les fonctions de transport, défense, tolérance alimentaire. Il est communément admis que la flore intestinale modifie cette glycosylation mais il n'en existe pas de preuve. Une étude sur deux souris "germ-free" et "conventionnal mice" a permis de montrer qu'il existait une fonction de glycosylation de base chez les souris stériles. Elle démontrait par ailleurs que la flore intestinale modifiait les types de glycosylation de manière qualitative et quantitative en modifiant la répartition des glycanes.

Une étude réalisée sur l'implantation d'*E. coli* retrouvait des caractéristiques enzymatiques spécifiques (fimbriae, hémolysines) aux souches résidentes par rapport aux souches transitoires [8].

Une autre étude analysait les transformations à l'échelle moléculaire de la colonisation de souris "germ-free" par une bactérie commensale de l'adulte *Bacteroides thetaiotaomicron*. Elle montrait que cette bactérie commensale modifiait l'expression de gènes impliqués dans d'importantes fonctions de l'intestin comme l'absorption des nutriments, la fonction de barrière muqueuse, le métabolisme des médicaments, l'angiogenèse et la maturation intestinale post-natale [9].

Enfin, une étude sur l'influence des groupes sanguins sur la colonisation bactérienne du NN soulignait l'étroite relation qu'il existe au niveau moléculaire entre les bactéries et les entérocytes [10]. Certains anaérobies stricts présents dans les selles produisent des glycosidases spécifiques des antigènes extracellulaires qui dégradent la structure glycosidique de l'antigène du système ABH. Les bactéries dégradent et utilisent les résidus carbohydrates des mucines intestinales. Chez les individus présentant les antigènes du groupe B, les bactéries capables de lyser ce substrat étaient cent fois plus fréquentes que dans les selles des individus ne possédant pas ces antigènes. Ainsi, le type de substrat à dégrader influence le développement de familles bactériennes selon les enzymes qu'elles possèdent.

C'est donc par des interactions complexes "Hôte-Bactérie" et "Bactérie-Bactérie" que se met en place la flore bactérienne commensale du NN.

### 3- Importance de la colonisation bactérienne initiale sur la santé de l'hôte

L'impact sur la santé de l'enfant des variations d'implantation de la flore intestinale est encore peu connu. Certains genres bactériens, dont le genre *Bifidobacterium*, dominant chez l'enfant né à terme et allaité, sont considérés comme bénéfiques [1]. Par ailleurs, la flore digestive est reconnue depuis longtemps comme participant aux effets de barrière responsables de la résistance à la colonisation de bactéries à potentiel pathogène ainsi qu'à la maturation du système immunitaire intestinal [2].

#### 3-1. Induction du système immunitaire muqueux

La promotion d'une réponse locale optimale de l'immunité du chorion sous-muqueux conditionne la qualité de la réponse immunitaire adaptative ultérieure. Elle initie des mécanismes de défense mais aussi l'acquisition et la mémorisation de la tolérance alimentaire permettant d'assurer à la fois la protection de l'hôte vis à vis d'une colonisation bactérienne (effet barrière), mais aussi l'absence de réaction immunitaire vis à vis des nutriments [11].

Les bactéries jouent un rôle important dans le développement du GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) par l'intermédiaire de l'information transmise aux

entérocytes et aux cellules M des plaques de Peyer. Ce système GALT activé permet d'induire au niveau du chorion sous-muqueux une cascade de réactions aboutissant à ces deux effets a priori opposés [12] de protection et de tolérance.

### 3-2. Acquisition de la tolérance aux antigènes alimentaires

Elle se produit par trois mécanismes de modulation de la stimulation du système immunitaire au niveau du tissu épithélial et sous-muqueux du tractus digestif.

Au niveau épithélial, les entérocytes, directement en contact avec les antigènes alimentaires, jouent le rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA) non spécifiques. L'interaction entre la CPA et les lymphocytes cytotoxiques (LT CD8+) intra-épithéliaux induit une première réaction d'apoptose au niveau des cellules immunocompétentes du chorion sous-muqueux, en particulier en présence d'une charge antigénique importante. Cette relation entre l'entérocyte et le LT CD8+ existe dès le plus jeune âge [12].

Le second mécanisme fait intervenir l'immunité spécifique. L'immunité innée du tube digestif est acquise pendant la vie foetale au niveau des plaques de Peyer, les cellules M jouant le rôle de CPA pour les Lymphocytes T naïfs CD4+ du chorion sous-muqueux, responsables de l'immunité adaptative [13]. La réactivation de ces lymphocytes va être étroitement liée à la stimulation antigénique par les CPA, par l'intermédiaire d'un récepteur MHC 2 (Major Histo-compatibility Complex type 2). Deux réactions opposées sont alors possibles. En présence d'un Co-Récepteur CD28 se produit une activation lymphocytaire, en absence de ce Co-récepteur se produit une réaction d'anergie-apoptose, permettant une nouvelle fois la tolérance alimentaire.

Enfin, l'existence de cellules lymphocytaires régulatrices (Tr1, TH3, CD25), par la sécrétion de cytokines IL-10 et TGF-bêta contrôle très tôt dans la mise en route de la réponse inflammatoire spécifique l'excès des lymphocytes CD4+ TH1 et TH2. Ce mécanisme semble crucial pour éviter tout emballement de la réponse inflammatoire et permettre la tolérance alimentaire.

### 3-3. Défense antibactérienne

Le rôle le plus important joué par l'épithélium intestinal est sa participation au lien entre l'immunité innée du chorion (acquise *in utero* au niveau des plaques de Peyer) et la réponse immune adaptative ultérieure.

Le matériel bactérien est reconnu par la cellule épithéliale mais aussi par l'ensemble des cellules immunocompétentes du chorion sous-muqueux grâce à l'expression à leur surface d'une famille de récepteur les Toll-like Receptor (TLR). Ces récepteurs reconnaissent la nature bactérienne de l'antigène et entraînent la cascade pro-inflammatoire par sécrétion du facteur nucléaire NF-KappaB.

Les TLR existent dès la naissance à la surface des entérocytes et paraissent très important dans l'initiation d'une symbiose durable entre ces dernières et les bactéries.

Cette interaction paraît être favorisée par des facteurs présents dans le colostrum et le lait maternel comme le CD14, présent à la surface des macrophages, capable de reconnaître les lipopolysaccharides bactériens et dont le rôle serait de moduler la réponse de l'entérocyte à la stimulation par le TLR exprimé à la surface de la flore endo-luminale [14]. Une baisse de la concentration du colostrum en ce constituant serait associée à une augmentation du risque d'atopie [15].

#### 3-3-1. Stimulation de l'immunité cellulaire

Le système immunitaire du chorion sous-muqueux reçoit en priorité une impulsion pro-inflammatoire de type Th1 (immunité cellulaire) guidée par la sécrétion des cytokines IL-2 et IL-12. Cette stimulation inhibe la réaction Th2. Ainsi, le matériel bactérien intervient dans le contrôle d'un éventuel excès de réaction Th2 vis-à-vis des antigènes alimentaires.

#### 3-3-2. Induction de l'immunité humorale

La réaction Th2 concomitante induite au niveau du LT-CD4+ va stimuler la transformation de Lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines

par l'intermédiaire de cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-10). Ce sont tout particulièrement les IgA sécrétoires qui vont être dirigées contre la flore intestinale et permettre un contrôle antibactérien. Elles sont également dirigées, dans une moindre mesure, contre les antigènes alimentaires.

La colonisation bactérienne néonatale permet au système de l'hôte de passer d'un mode physiologique plus humoral à la naissance à un mode plus cellulaire. Il existe cependant durant les deux premières années de vie une immaturité des plasmocytes responsable d'un déficit sécrétoire en IgA au profit des IgM, expliquant l'insuffisance de réponse vis-à-vis des antigènes bactériens et alimentaires.

En résumé, la stimulation antigénique d'origine bactérienne induit des réactions à la fois de tolérance alimentaire (Th1) et de défense bactérienne (Th2) au niveau du chorion sous-muqueux.

La constitution progressive d'une flore commensale appropriée paraît être un élément capital de l'initiation des fonctions immunitaires du chorion sous-muqueux. Le lien fondamental existant entre immunité innée et immunité cellulaire adaptative montre que la constitution d'une flore équilibrée dès le plus jeune âge paraît cruciale pour éviter les désordres du système soit dans le sens de l'autoimmunité soit dans le sens de l'allergie [12].

#### 3-4. Métabolisme des résidus alimentaires

L'activité métabolique de la flore intestinale joue également un rôle capital par la transformation des antigènes alimentaires [12]. Elle contribue à rendre les aliments plus tolérables par la muqueuse. L'intensité de cette activité métabolique est variable en fonction du type et du nombre de bactéries et de leur localisation. Elle est nettement moins diversifiée chez le jeune enfant, se limitant notamment à la production d'acide lactique et acétique chez les nourrissons exclusivement alimentés au sein.

L'allaitement maternel exclusif et prolongé privilégie la colonisation intestinale par des germes fermentants (lactobacilles et bifidobactéries) plus enclins à favoriser un début d'interaction optimale entre bactéries et muqueuse intestinale [16].

### 3-5. Maturation intestinale post-natale

Il a été démontré *in vivo*, en comparant des souris stériles et des souris inoculées par une espèce bactérienne spécifique, l'existence d'échanges transcriptionnels au niveau des entérocytes. Il s'agissait d'ARN messagers (ARNm) codant pour des protéines ayant un rôle dans l'absorption des graisses, la dégradation médicamenteuse, la motilité intestinale [9] et la défense antibactérienne.

De même que l'Adénosine déaminase (ADA) et les Polyamines sont des protéines jouant un rôle dans la maturation digestive néonatale, la colonisation bactérienne initiale augmenterait les taux de ADA et Ornithine Decarboxylase anti-enzyme, un régulateur de la synthèse des Polyamines, faisant suggérer que les bactéries commensales induisent la maturation du tractus intestinal [9].

L'influence des bactéries sur l'expression génique de l'entérocyte induit l'établissement de véritables niches écologiques spécifiques de chaque bactérie [9].

### 3-6. Cas particulier de l'entérococolite ulcéro-nécrosante (ECUN) du NN

L'altération de l'effet barrière peut être à l'origine de l'augmentation de pathologies à point de départ digestif. Surtout chez le grand prématuré, dont la colonisation par une flore commensale est extrêmement retardée et le portage en *Clostridium* favorisé [17]. L'établissement du microbiote joue un rôle essentiel sur la survenue d'ECUN: les bifidobactéries, bactéries commensales et bénéfiques jouent un rôle protecteur vis à vis de la survenue d'ECUN. Le *Clostridium*, germe pathogène est directement lié à la survenue d'ECUN [18].

Des études récentes posent la question de l'intérêt des probiotiques dans la prévention des ECUN, par apport exogène de bifidobactéries protectrices et maturantes du tube digestif [19-21].

## C- FACTEURS INFLUENCANT LA CINÉTIQUE D'IMPLANTATION DE LA FLORE BACTÉRIENNE CHEZ LE NN

### 1- LE MODE D'ACCOUCHEMENT

Le mode d'accouchement a un impact significatif sur l'établissement de la flore intestinale. La colonisation des enfants nés par voie basse est directement dépendante des flores vaginale et périnéale maternelles alors que les nourrissons nés par césarienne seront principalement colonisés par les germes de l'environnement hospitalier [6, 22].

La colonisation bactérienne des enfants nés par césarienne commence également par des bactéries du genre aéro-anaérobie strict. Cependant, elle va s'établir à partir des bactéries environnementales (personnel soignant, air) plutôt que à partir des bactéries fécales et vaginales maternelles. Elle induit essentiellement un retard à la colonisation des anaérobies stricts (*Bifidobacterium*, *Bacteroides* et lactobacilles) [6, 22]. Alors que les germes pathogènes environnementaux du genre *Clostridium* coloniseront plus rapidement le NN [1].

Neut et al. retrouvaient aussi un retard à la colonisation par les anaérobies du genre *Bacteroides fragilis* à 14 jours, après une naissance par césarienne plutôt que par voie basse et les bifidobactéries étaient retrouvées uniquement en très faibles quantités [23].

La colonisation bactérienne intestinale des NN issus d'une césarienne était légèrement accélérée par l'allaitement maternel.

La colonisation par les lactobacilles à 10 jours de vie était encore liée à la naissance par voie basse des enfants nés à terme [24].

Le suivi sur plusieurs mois d'enfants nés par césarienne retrouvait un retard à la colonisation de *Bifidobacterium* à un mois de vie et du genre *Bacteroides* à six mois de vie [25]. La colonisation, même tardive, par ces deux germes, semblerait due à une colonisation salivaire des adultes ou environnementale et possible en l'absence d'éradication par une antibiothérapie, notamment du genre *Bacteroides*, très fragile [22].

## 2- LE TYPE D'ALLAITEMENT

Le lait maternel est un facteur primordial de la maturation du tube digestif. L'unité fonctionnelle du tube digestif est constituée par l'épithélium organisé sous forme de villosités-cryptes. Le tractus du NN, immature, ne présente pas de répartition organisée des cellules épithéliales. Le lait maternel stimule la répartition fonctionnelle cellulaire entre les villosités et les cryptes de manière optimale pour l'absorption intestinale et la défense microbienne [26].

La flore qui s'implante chez le NN allaité est moins variée que celle du NN nourri au lait artificiel [1]. La différence la plus notable est la colonisation par *Bifidobacterium* largement majoritaire du NN allaité.

La majorité des études reprises par K. Orrhage en 1999 [6] a montré que les enfants nourris au lait artificiel ont un nombre plus élevé d'enterocoques et de *Clostridium* dans leurs selles que les enfants nourris au sein. Les enterobactéries étaient elles aussi augmentées dans certaines études. Les taux de staphylocoques étaient plus élevés chez les enfants nourris au sein. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes pour *Bacteroides*, *Lactobacillus* et les bifidobactéries contrairement à ce qui était habituellement décrit [27].

De nombreux travaux ont recherché les composants du lait maternel responsables d'une colonisation prédominante par les bifidobactéries. Les différents laits qui en résultaient (formules aux protéines de lait de vache réduites en protéines [28], hydrolysats de caseine, enrichis en lacto-ferrine, enrichis en fer) ne permettaient pas d'obtenir une flore identique à une flore d'allaitement maternel. Certaines formules expérimentales étaient associées à une croissance plus lente du nourrisson, par rapport aux formules standards et aux enfants allaités au sein [28].

C'est seulement en 2004 que les oligosaccharides ont été décrits comme facteur probifidogène du lait maternel [29]. Leur structure riche en liaison glycosidique n'est pas hydrolysable par les enzymes digestives humaines, ils ne sont donc pas assimilés au niveau de l'intestin grêle.

### 3- PREVENTION DES INFECTIONS A STREPTOCOQUE DU GROUPE B (SB)

#### 3-1. Prophylaxie maternelle des infections à SB

Le sepsis néonatal au SB est responsable de 4,5% des décès néonataux chez les enfants infectés [30]. La colonisation maternelle au SB est un facteur de risque majeur d'infection néonatale précoce: septicémies et méningites néonatales [31]. Dix à trente pour-cent des femmes sont colonisées par le SB au niveau vaginal ou rectal [32, 33]. C'est pourquoi une antibioprofylaxie maternelle par Amoxicilline est recommandée [34]. L'impact de cette antibioprofylaxie sur l'établissement du microbiote chez le NN a été étudiée par F. Jauréguy en 2004 [32]. Elle ne retrouvait que peu de différences entre la population d'enfants non traitée et les enfants ayant bénéficié d'une antibioprofylaxie. Il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes pour l'acquisition des entérobactéries, des entérocoques, des staphylocoques, des bactéries des genre *Bacteroides* ou *Bifidobacterium* ni des germes résistants à l'amoxicilline. La seule différence significative était notée pour le genre *Clostridium*, l'antibioprofylaxie réduisant la colonisation de ces bactéries (p= 0,04). Deux papiers décrivent les conséquences de l'antibioprofylaxie maternelle de l'IMF au SB sur l'écologie bactérienne et sur le sepsis précoce néonatal [32, 35]. Les deux s'accordent sur des conséquences uniquement chez les pré-termes et les petits poids de naissance de cette pratique, avec une augmentation de la fréquence des sepsis à d'autres germes que les SB: *E. coli* en particulier ou à des germes résistants.

#### 3-2. Antibiothérapie néonatale dans le cadre des suspicions d'IMF.

Dans les unités de soins intensifs néonataux (USIN), le taux d'infections et de sepsis est élevé et peut survenir de manière brutale, sans signe spécifique, avec un taux de mortalité élevé. Ainsi, les antibiotiques sont mis en large proportion et souvent de manière empirique chez ces enfants.

Une étude avait comparé les modifications de l'écologie bactérienne des NN entre deux protocoles d'antibiothérapie dans le cadre des suspicions d'IMF chez les NN d'USIN [36]. L'un comprenait de l'amoxicilline et de la gentamycine, dans l'autre

l'amoxicilline était remplacée par le céfuroxime. Les prélèvements étaient réalisés pour chaque enfant à J1-2 puis une à deux fois par semaine par écouvillonnage nasal, recueil du liquide gastrique et prélèvement de selles. L'étude retrouvait que 90% des enfants d'USIN avaient reçu des antibiotiques. Les germes les plus souvent isolés étaient *Klebsiella Pneumoniae* et *E. coli* dans les deux groupes avec une prévalence significativement ( $p < 0,05$ ) inversée entre les deux groupes. La proportion de BMR résistants à l'amoxicilline et au céfuroxime était significativement augmentée dans le groupe Amoxicilline. Les coprocultures étaient significativement plus variées dans le groupe Céfuroxime. Enfin, le nombre d'infections sévères à BGN était significativement plus élevé dans le groupe Amoxicilline (91% des infections néonatales) par rapport au groupe Céfuroxime (63% des infections néonatales).

Des résultats tout à fait similaires avaient été retrouvés par Bonnemaïson en 2003 [37] qui comparait trois groupes de NN en néonatalogie: un groupe (Bi) Amoxicilline+Aminoside, un groupe (Tri) Amoxicilline+Céphalosporine de troisième génération (C3G)+Aminoside et un groupe n'ayant jamais reçu d'antibiotiques. Les selles étaient prélevées durant les 10 premiers jours de vie (<12h, J3, J7, J10). Cette étude retrouvait une augmentation de *Klebsiella Oxytoca* et de *E. coli* BMR dans le groupe Bi. De même, la biodiversité de la flore était réduite dans le deuxième groupe.

L'utilisation d'antibiotiques oraux durant le premier mois de vie chez le NN réduit la colonisation en bifidobactéries et *Bacteroides fragilis* [38], bactéries décrites comme essentielles dans l'établissement du microbiote chez le NN.

#### 4- LA PRÉMATURITE

La prématurité est associée dans les pays occidentaux à des mesures strictes d'asepsie dès la naissance (césarienne, séparation de la mère, soins intensifs aseptisés) qui vont être à l'origine de modifications dans l'installation du microbiote intestinal et qui pourront avoir des conséquences importantes et directes sur la santé de l'enfant. Par ailleurs, le tube digestif du prématuré est immature et les interactions "hôte-bactéries" précédemment décrites comme bénéfiques pour le NN à terme et eutrophe pourront s'avérer délétaires pour lui. L'intérêt de l'étude du microbiote

dans cette population est dominé par la survenue d'ECUN, potentiellement létale chez des enfants aux réserves déjà diminuées.

La flore microbienne des prématurés de moins de 33 SA est pauvre, peu diversifiée et retardée [4, 6]. Les études décrivent un taux élevé d'entérobactéries et streptocoques (flore aérobie), alors que la colonisation par les anaérobies (bifidobactéries et *Bacteroides*) est retardée de J11 à J19 en moyenne pour une colonisation maximale vers J4 chez les NN eutrophes à terme. Une première étiologie proposée était le retard à l'alimentation entérale chez les très petits poids de naissance. D'autres mettaient en cause le mode d'accouchement avec une colonisation digestive bactérienne identique entre les prématurés et les NN à terme nés par voie basse alors qu'une différence significative était notée chez les NN nés par césarienne [22, 23, 39]. Une revue de la littérature de 2006 [17] reprenait les six principales études sur l'établissement du microbiote chez les prématurés [24, 40-44]. L'acquisition digestive des bactéries "bénéfiques" (bifidobactéries, lactobacilles) était mineure; Aucune étude ne retrouvait de lactobacilles à la naissance. Un nombre important de bactéries potentiellement entéro-pathogènes (entérobactéries (*E. coli*), *Bacteroides*, entérocoques et streptocoques) était retrouvé. La colonisation par les bactéries pathogènes était augmentée dans tous les papiers (*Klebsiella* et les staphylocoques). Pour le *Clostridium*, le genre était retrouvé dans 4 études sur 6. Deux le retrouvaient en grande quantité dès les premières 48 heures de vie [42, 43], deux décrivaient une acquisition croissante dans le temps de l'étude [41, 44].

L'allaitement maternel favorisait la diversité de la flore bactérienne dans une étude [40]. Les antibiotiques, très fréquemment administrés dans cette population retardaient et diminuaient la colonisation en bactéries bénéfiques comme les lactobacilles.

Enfin, par des techniques de biologie moléculaire (PCR et électrophorèse en gel de gradient dénaturant), Schwiertz et al. décrivaient une plus grande similitude entre les bactéries de la flore des prématurés et les bactéries communautaires de l'hôpital par rapport à la population des enfants à terme et allaités au sein [45].

Une étude française récente portait sur 29 enfants de 27-29 SA et retrouvait des résultats similaires [46]. Ils décrivaient une sur-représentation significative des staphylocoques dans les selles des prématurés, une réduction du taux de

bifidobactéries bénéfiques et une diversité de la microflore inversement corrélée à la durée de l'antibiothérapie ( $p= 0,0184$ ) et de la nutrition parentérale ( $p=0,0130$ ). Le résultat le plus relevant était l'amélioration globale de l'état clinique et de la prise de poids avec la diversification de la flore digestive.

Il a été montré que le NN prématuré est moins apte à contrôler la réponse pro-inflammatoire qui se produit au niveau du chorion sous-muqueux. Une sécrétion en excès d'interleukines pro-inflammatoires (IL-8, IL1-bêta) sous la dépendance d'entérocytes immatures pourrait expliquer l'augmentation du risque d'ECUN dans cette population [47], favorisé par l'invasion de germes pathogènes *Clostridium butyricum* entre autres [18, 46].

## 5- L'ENVIRONNEMENT

L'environnement joue un rôle important dans la colonisation intestinale néonatale [1]. Certaines études ont mis en évidence la différence de colonisation digestive bactérienne à l'âge adulte, avec notamment un portage digestif supérieur en bifidobactéries dans la population adulte éthiopienne par rapport aux adultes suédois [48]. Bennet s'était attaché à retrouver l'origine de cette diversité par la colonisation néonatale. Il apparaissait que les modifications de la flore intestinale à Adis Ababa étaient moins importantes que à Stockholm sous pression antibiotique du fait d'une colonisation plus importante en bifidobactéries. Il semblait que le climat chaud, humide et surpeuplé de l'hôpital éthiopien favorisait la prolifération, le transfert et l'ingestion orale de multiples bactéries, protégeant les NN de la contamination digestive en BMR.

Des différences similaires ont été décrites entre les enfants de soins intensifs néonataux (USIN) et de maternité. Si l'enfant est transféré en USIN, la *Klebsiella* (germe pathogène) devient le BGN dominant à la place de *E. coli*. (germe physiologique et non pathogène). Cette colonisation prédominante de *Klebsiella* est retrouvée quelque soit le mode de délivrance mais prédomine chez les NN nés par césarienne [22].

Ces différences sont vraisemblablement liées aux conditions plus strictes d'hygiène entourant les accouchements dans les pays industrialisés, réduisant l'exposition de l'enfant aux flores fécale et vaginale de sa mère [1].

## **D- LES INTEGRONS**

### **1- HISTOIRE**

Les intégrons ont été caractérisés en 1989 par deux chercheurs australiens: Ruth Hall et Hatch Stokes [49] en se basant sur des homologies dans l'organisation de différents transposons connus pour conférer des résistances aux antibiotiques (ex: Tn21). A ce jour, des centaines d'intégrons ont été caractérisés.

Les intégrons ont surtout été décrits chez les BGN mais ont aussi été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif (BGP) (corynébactéries, entérocoques). Les intégrons jouent donc un rôle important dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques au sein du monde bactérien. La découverte récente de « superintégrons » hébergeant une centaine de cassettes codant des fonctions différentes de la résistance aux antibiotiques suggère en fait un rôle plus large des intégrons qui seraient impliqués dans l'évolution des génomes bactériens et dans l'adaptation des espèces.

### **2- DÉFINITION**

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes de résistance sous forme de cassettes [50]. Les cassettes peuvent être intégrées dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique, catalysé par une intégrase. Les intégrons ne sont pas mobiles, mais sont portés par des éléments génétiques mobiles tels les plasmides et les transposons.

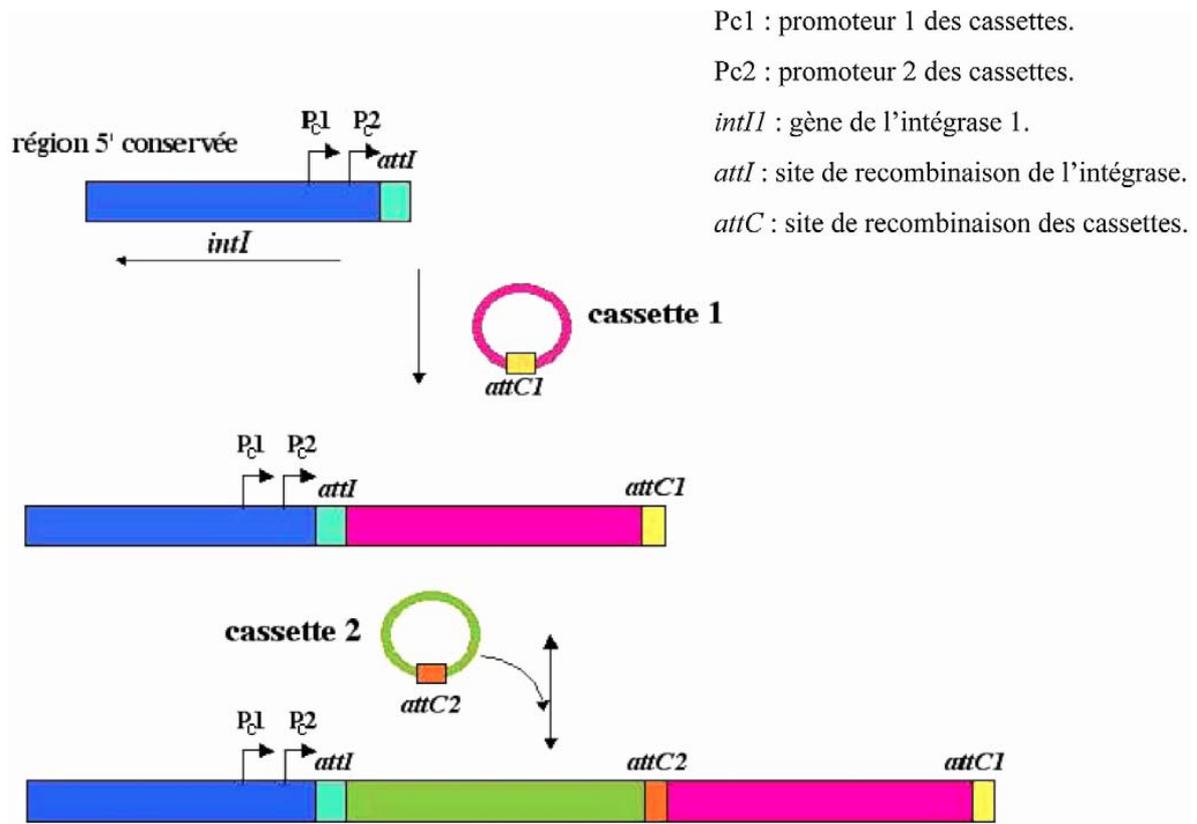
Les intégrons sont des éléments génétiques qui contiennent les déterminants d'un système de recombinaison site-spécifique grâce auxquels ils peuvent capter des gènes sous forme de cassettes [49]. Les cassettes sont des unités mobiles qui peuvent être facilement intégrées dans un intégron par un mécanisme de recombinaison spécifique de site. L'enzyme fonctionnelle permettant l'acquisition de nouvelles

cassettes est une Intégrase. Ce système permet de très nombreuses combinaisons de cassettes et constitue donc un atout pour les bactéries dans l'acquisition et la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques [50].

### 3- STRUCTURE DES INTÉGRONS

L'unité fonctionnelle d'un intégron est constituée d'un gène *intI* codant une protéine nommée intégrase, d'un site de recombinaison spécifique *attI* et d'un promoteur Pc, qui permet l'expression des gènes contenus dans les cassettes.

Le site de recombinaison spécifique *attI* est situé entre le début du gène *intI* et la première cassette. Les intégrons ont été classés en différentes classes selon la séquence génique de leur intégrase. Cinq classes sont particulièrement liées à des cassettes contenant des gènes codant pour des résistances aux antibiotiques. Les trois premières classes *Int1*, *Int2* et *Int3* sont les plus fréquemment décrites dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques avec une prédominance nette des types 1 et 2 chez l'homme ou l'animal.



**Figure 1:** Mécanisme d'intégration de cassettes au sein de l'intégron. (D'après M-C Ploy [50])

#### 4- LES CASSETTES

Les cassettes de gènes sont des éléments mobiles non-réplicatifs qui existent sous une forme libre circulaire et sous forme linéaire intégrée au sein d'un intégron.

L'intégration des cassettes de gènes au sein d'un intégron fournit également un promoteur *Pc* qui permet l'expression de toutes les cassettes du réseau. Le niveau d'expression du gène d'une cassette est alors fonction du nombre et de la nature des cassettes qui la précèdent. L'expression d'une cassette sera donc dépendante de sa place dans l'intégron.

Une fois intégrées, les cassettes font partie intégrante de l'intégron. Chaque intégron peut insérer plusieurs cassettes. Les cassettes intégrées se conduisent ensuite comme de petites unités mobiles indépendantes; elles peuvent migrer au sein de l'intégron. L'arrangement des cassettes dans la région insérée peut être altérée par l'excision ou le réassortiment de cassettes individuelles.

#### 5- LES DIFFERENTS TYPES D'INTEGRONS

Les intégrons sont regroupés en plusieurs classes en fonction de la séquence protéique de leur intégrase. Au sein d'une classe, un intégron se caractérise par le nombre, la nature et l'ordre des cassettes qu'il contient. Ces deux derniers paramètres ne connaissent à ce jour pas de limitation.

Liées à des séquences d'insertion, des transposons ou des plasmides, cinq classes d'intégrons sont connues pour jouer un rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques [51]. Les gènes *intI1*, *intI2*, et *intI3*, codant les intégrases des intégrons de classes 1, 2 et 3, sont bien définis et montrent 40 à 58% d'identité:

- Les intégrons de classe 1 sont les plus répandus parmi les intégrons de résistance. Ils sont surtout décrits chez les entérobactéries (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Yersinia...*) et autres BGN, rarement chez les BGP comme les corynébactéries et les entérocoques, et les mycobactéries.
- Les intégrons de classe 2 codent une intégrase non fonctionnelle car interrompue par un codon non-sens précoce (codon 179). Ils sont

généralement localisés sur des transposons type Tn7. Ils transportent des gènes codant pour des résistances au triméthoprim, à la streptomycine, la spectinomycine et la streptothricine.

- Les intégrons de classe 3 sont très peu répandus en clinique.
- Les deux autres classes (4 et 5) peu répandues, seraient impliquées dans la résistance aux triméthoprim chez des espèces de *Vibrio*.

Enfin il existe des super-intégrons, différents des intégrons par leur taille (plus de 20 cassettes), l'orientation des gènes (pas toujours dans le même sens), l'homogénéité des séquences répétées (*attC* très stables), la nature des cassettes, leur localisation uniquement chromosomique. Ces supers-intégrons n'ont pas de rôle clairement défini à l'heure actuelle. Leurs cassettes ne codent pas pour des gènes de résistance aux antibiotiques, certaines auraient un rôle sur les fonctions métaboliques ou les facteurs de virulence.

## 6- LES INTEGRONS COMME SUPPORT DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Les cassettes codent le plus souvent pour des gènes de résistance aux antibiotiques. Plus de 130 gènes de résistance aux antibiotiques ont été décrits dans les cassettes, codant les résistances à quasiment toutes les familles d'antibiotiques (<http://integrall.bio.ua.pt/>).

Plusieurs cassettes peuvent exister en tandem sur un même intégron et conférer ainsi une résistance en bloc à différentes familles d'antibiotiques. Jusqu'à huit cassettes de résistance ont été décrites sur le même intégron. Certains intégrons, par contre sont vides de cassettes.

**Tableau 1:** nombre de gènes de résistance aux antibiotiques par famille d'antibiotique, portés par des cassettes.

<b>Famille antibiotique</b>	<b>Nombre de gènes de résistances existants au sein des cassettes (%)</b>
β- lactamines	49 (44)
Aminosides	29 (26)
Triméthoprime	16 (14)
Chloramphénicol	8 (7)
Ammoniums quaternaires	3
Rifampicine	1
Erythromycine	2
Streptothricine	2
Fosfomycine	1
Lincosamides	1

Les intégrons jouent un rôle important dans la dissémination bactérienne des résistances aux antibiotiques chez les BGN. Cependant, les études montrent peu d'influence de la pression de sélection aux antibiotiques sur le portage en intégrons: 60% de portage chez l'adulte sain et chez les malades de réanimation soumis à des fortes pressions antibiotiques. Par ailleurs, les gènes de résistance à la streptomycine et à la spectinomycine sont fréquents alors que leur utilisation est rare chez l'homme. Leur structure est stable en type et ordre des cassettes de différentes bactéries de même espèce d'origine différente et soumises à des pressions de sélection antibiotiques différentes.

Les intégrons et les supers-intégrons, seraient en fait des éléments génétiques anciens, non indispensables à la survie des bactéries mais impliqués dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. La présence de supers-intégrons hébergeant de très nombreux gènes codant différentes fonctions pourraient permettre aux bactéries porteuses d'avoir une capacité d'adaptation rapide et d'acquérir ainsi un avantage sélectif [50].

### **III- L'ETUDE**

#### **A- HYPOTHESE ET OBJECTIFS**

##### **1- HYPOTHESE**

Une étude antérieure au laboratoire avenir Inserm de Limoges a montré que les intégrons sont retrouvés dans 60% des extraits de fécès étudiés dans une population saine et non exposée. Ils sont également présents dans l'environnement (effluents, végétaux, animaux d'élevage...). Certains intégrons, en particulier de classe 1 et 2 sont impliqués dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ce modèle original de transmission de résistance antibiotique a notamment été décrit chez certains BGN prédominant dans la primo-colonisation de l'intestin des NN.

La constitution de la microflore intestinale néonatale débute par une colonisation essentiellement à partir des flores vaginales et digestives maternelles, (bifidobactéries, entérobactéries (principalement *E. Coli*), lactobacilles). Nous avons fait l'hypothèse pour notre étude de la possible acquisition à la naissance, lors de la constitution de la microflore intestinale, d'intégrons de multi-résistance de type 1 et 2, les plus fréquemment retrouvés dans les extraits.

Par ailleurs, les études successives en culture et biologie moléculaire, portant sur la colonisation bactérienne du NN, ont clairement montré l'influence de certains facteurs anamnestiques et environnementaux sur la constitution de cette microflore. Il apparaît ainsi que le mode d'accouchement, l'antibiothérapie maternelle, le type d'allaitement ainsi que l'âge gestationnel sont autant de facteurs modifiant l'acquisition des principales souches bactériennes de la colonisation initiale du NN. Nous avons donc décidé d'étudier ces facteurs comme potentiellement à risque d'acquérir des intégrons.

## 2- OBJECTIFS

### 2-1. L'objectif principal

L'objectif principal de notre étude était de décrire une cinétique d'apparition des intégrons chez les NN de plus de 32 semaines d'aménorrhée (SA) d'âge gestationnel. Deux populations distinctes étaient étudiées, une population à terme et séjournant en maternité et une population de néonatalogie.

### 2-2. Les objectifs secondaires

Nous nous sommes alors intéressés aux facteurs influençant l'installation de la microflore intestinale dans les premiers jours suivant la naissance:

- l'antibiothérapie maternelle
- le mode d'accouchement
- le mode d'allaitement
- l'âge gestationnel
- l'environnement

D'autres facteurs, liés au risque d'infection materno-foetale ont été étudiés:

- la rupture prolongée de la poche des eaux de plus de 12 heures (RPDE>12h)
- le portage maternel du SB
- la fièvre maternelle supérieure à 38°C à l'accouchement
- le liquide amniotique teinté ou méconial

## **B- MATERIEL ET METHODES**

### **1- CADRE SCIENTIFIQUE DE L'ETUDE**

L'équipe INSERM de l'université de Limoges travaille depuis de nombreuses années sur les intégrons. Une étude prospective sur la prévalence du portage digestif en intégrons chez l'homme a mis en évidence une prévalence de 60% dans les fécès d'hommes sains et non hospitalisés comme dans les selles d'adultes hospitalisés en réanimation et soumis à une importante pression de sélection antibiotique.

C'est la dynamique d'acquisition des intégrons par l'homme et les différences de cette dynamique en fonction des conditions diverses dont la pression de sélection antibiotique qui ne sont pas connues.

Le meilleur modèle pour initier cette recherche est le NN, siège de l'établissement princeps de la microflore digestive. Ainsi nous décrivons dans cette étude le portage et la cinétique d'apparition des intégrons dans les selles des NN de plus de 32 SA en maternité et en néonatalogie.

### **2- TYPE D'ETUDE**

Il s'agissait d'une étude prospective avec recueil de données. L'étude se basait sur des soins de pratique courante en néonatalogie: écouvillonnage anal à l'entrée et cultures des méconium et selles, avec un schéma de prélèvement adapté pour l'étude.

### **3- CONSENTEMENT**

Le protocole de l'étude a été présenté le 16 septembre 2010 au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Limoges devant les membres du Comité d'Ethique.

Celui-ci a émis un avis favorable pour notre étude (annexe 1).

Une feuille explicative, nominative et de consentement parental était remise à chaque parent par le pédiatre du service dans les premiers jours d'hospitalisation.

En cas de consentement perdu, un courrier explicatif a été renvoyé aux parents avec une nouvelle feuille d'information à dater et signer. Les parents pouvaient renvoyer le consentement à l'aide d'une enveloppe pré-affranchie et notée à l'adresse du CHU.

Une maman a refusé la participation de son enfant à l'étude.

#### 4- SCHEMA DE L'ETUDE

##### 4-1. Protocoles de recueil

L'étude s'est déroulée sur une période de 6 semaines (18 Octobre 2010 au 26 Novembre 2010) à la maternité du CHU de Limoges et de 21 semaines (11 Octobre 2010 au 21 Février 2011) en néonatalogie.

Pour les enfants destinés au service de Maternité, les prélèvements suivaient un schéma précis:

- En salle de naissance: recueil du premier méconium s'il était émis ou réalisation d'un écouvillonnage anal en l'absence de celui-ci.
- Recueil du premier méconium dès son émission s'il n'a pas été recueilli en salle de naissance
- Recueil de la selle de sortie dans les 24 heures qui précèdent le départ de l'enfant.

Pour s'assurer d'une bonne mise en route du protocole, des affiches réalisées en collaboration avec le Centre d'Investigation Clinique (CIC) de Limoges étaient placées devant chaque table d'accueil du NN en salle de naissance.

De même, des affiches de rappel étaient placées dans toutes les chambres au-dessus de la table à langer du NN.

Enfin, une affiche de rappel reprenant le schéma global de l'étude était placée dans le bureau des Sages-femmes et des Puéricultrices.

Les écouvillons stériles, les pots à coproculture étaient fournis pour l'étude par l'Unité de Recherche Clinique de l'Hôpital Mère Enfant (HME) de Limoges.

Les bords de bactériologie étaient pré-étiquetés avec une étiquette créée pour l'étude, portant le sigle CASIMIR (Cinétique d'Acquisition à la Maternité des Intégrons de Résistance).

Chaque prélèvement réalisé devait être noté sur une feuille de "suivi de recueil". Cette feuille était remplie pour chaque NN dès son premier prélèvement en salle de naissance et le suivait lors du transfert dans le service d'hospitalisation.

En parallèle, les inclusions pouvaient être saisies informatiquement sur le dossier du patient au moyen du logiciel File-Maker. Une fenêtre de saisie CASIMIR avait été créée permettant à chaque nouveau prélèvement en salle de naissance d'inclure l'enfant.

Le déroulement était identique en néonatalogie avec un prélèvement hebdomadaire de selle jusqu'à la sortie de l'enfant.

#### 4-2. Techniques de recueil

##### 4-2-1. L'écouvillonnage anal

Il s'agit d'un prélèvement réalisé en pratique courante dans le service de néonatalogie. Chaque entrant bénéficie d'un écouvillonnage buccal, anal et des oreilles. Pour les besoins de notre étude, ce prélèvement a été étendu aux NN de maternité.

Le prélèvement était réalisé à l'aide d'un écouvillon (deltalab, Espagne, ref. 300250), dans la première heure de vie sur la table d'accueil du NN en salle de naissance ou en couveuse pour la population de néonatalogie.

Dans la mesure du possible, tous les prélèvements étaient réalisés avant la prise de température rectale.

#### 4-2-2. Le recueil de selles

Il s'agit d'un prélèvement non invasif, réalisé en pratique courante dans la démarche diagnostique des suspicions d'IMF primitives ou secondaires.

Le prélèvement était réalisé sur table ou dans la couche et acheminé au laboratoire dans un pot à coprologie de 160 ml avec spatule irradiée à 10 KGy (société Griffond, distribution Grener, France, ref. PC160SRSP).

#### 4-3. Conservation et acheminement des prélèvements

L'HME de Limoges est un bâtiment séparé du bâtiment central abritant les laboratoires de bactériologie.

La journée (8h-20h) du lundi au vendredi, les prélèvements de routine sont acheminés par coursiers aux laboratoires, au fur et à mesure de leur recueil. Les prélèvements suivaient alors le circuit normal.

La nuit, il avait été convenu avec les équipes de Bactériologie et de Recherche Clinique que le prélèvement pouvait être conservé en frigidaire à +4°C avant d'être acheminé le lendemain matin par le circuit normal.

Des boîtes au nom de l'étude ainsi qu'une fiche explicative étaient donc placées dans les réfrigérateurs de la Salle de Naissance, de la Maternité et du service de Néonatalogie.

#### 4-4. Conservation des prélèvements dans l'unité de Bactériologie

A leur réception en Bactériologie, les prélèvements étaient séparés en deux. Une partie étaitensemencée et l'autre partie conservée à -80°C pour l'analyse sur extrait d'ADN direct.

## 5- POPULATION

Deux populations bien distinctes ont été incluses:

- une population de NN à terme, sans IMF, séjournant dans un des services de maternité.
- Une population de NN prématurés ou ayant présenté des critères nécessitant un hospitalisation et des soins en néonatalogie et dont la durée de séjour, prolongée, a permis des prélèvements sur plusieurs semaines.

### 5-1. Nombre de sujets de l'étude

S'agissant de la première étude sur le sujet, nous ne disposions pas de données scientifiques nous permettant d'établir le nombre de sujets nécessaire.

Sur les 2500 enfants naissant chaque année à l'HME, il a été décidé d'en inclure 200 de maternité et 50 de néonatalogie.

### 5-2. Critères d'éligibilité

Les critères d'inclusion étaient:

- NN de plus de 32 SA à la naissance
- né à l'HME de Limoges

Les critères de non-inclusion étaient:

- NN de moins de 32 SA à la naissance
- hospitalisé en néonatalogie mais né dans un autre hôpital que l'HME de Limoges
- présentant une malformation congénitale devant bénéficier de gestes chirurgicaux ou mesures de soins particulières.

Les critères de sortie d'étude étaient:

- le refus parental de signer le consentement
- l'absence de prélèvement du premier méconium ou de la selle de sortie pour la population de maternité
- l'absence de prélèvement du premier méconium ou d'une selle suivante au moins avant la sortie pour la population de néonatalogie.

Les enfants à terme séjournant initialement avec leur maman à la maternité puis ayant bénéficié au décours d'une hospitalisation en néonatalogie ont été randomisés en néonatalogie. En effet, l'environnement de l'enfant était alors différent, pouvant entraîner des différences sur la colonisation bactérienne et sur l'acquisition en intégrons.

## 6- RECUEIL DES DONNÉES CLINIQUES

Les données maternelles et obstétriques étaient collectées à partir du dossier électronique des patientes (logiciel File-Maker) à la maternité. Les données manquantes, notamment sur la prise d'antibiotique pendant la grossesse étaient recueillies par interrogatoire direct des mamans. Les mamans non rencontrées étaient contactées par téléphone.

Les données concernant les enfants séjournant en maternité étaient également disponible sur le dossier électronique de la patiente. Pour les enfants hospitalisés en Néonatalogie, les données ont été collectées à partir des dossiers médicaux et de la pancarte de suivi.

## 7- TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

### 7-1. Techniques de microbiologie conventionnelle

#### 7-1-1. Ensemencement

Les prélèvements étaient directement ensemencés sur un milieu gélosé Drigalski prêt à l'emploi (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et incubé 48 heures en aérobiose.

La gélose Drigalski avait été sélectionnée par les Bactériologues pour ses propriétés sélectives sur la croissance des entérobactéries et autres BGN et inhibitrices sur la croissance des BGP.

### 7-1-2. Identification bactérienne

L'identification bactérienne des souches isolées était ensuite réalisée à l'aide de galeries d'identification ID-GN Vitek2<sup>R</sup> ou ID32GN<sup>R</sup> (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

### 7-1-3. Antibiogrammes

Les antibiogrammes étaient réalisés pour chaque souche microbienne isolée. Les antibiogrammes étaient obtenus par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

### 7-1-4 Conservation de souches

Les souches bactériennes ont ensuite été conservées à -80°C à l'aide de Cryobilles (AES laboratoires).

### 7-1-5. Extraction d'ADN des souches isolées

Les ADN des BGN ont été extraits par « boiling ». Le principe de cette extraction est basé sur la lyse cellulaire par chauffage, libérant ainsi l'ADN dans le surnageant.

Un inoculum dense dans 1mL d'eau distillée stérile a été réalisé à partir de la culture bactérienne sur gélose. Les tubes ont été ensuite incubés à 100°C pendant 20 minutes, puis centrifugés 10 minutes à 10000 tr/min à +4°C. La centrifugation permet de culoter les divers débris cellulaires.

L'ADN est présent dans le surnageant ; une aliquote de chaque ADN a été conservée à -20°C.

L'ADN dit « boiling » n'est pas un ADN de très bonne qualité. Toutefois, le matériel génétique de départ étant important, il est suffisant pour rechercher sur une souche bactérienne un ou plusieurs gènes d'intérêt.

## 7-2. Techniques moléculaires

Les ADN, à partir des méconiums et selles ont été extraits grâce au QIAamp STOOL DNA MiniKit Qiagen<sup>R</sup>. Les selles congelées à -80°C étaient sorties quelques minutes avant la technique. Seuls 200 mg étaient prélevés et pesés. La première lyse de l'extrait était réalisée à l'aide de Buffer ASL et d'une incubation de 5 minutes à 70-80°C au bain-marie. Puis à l'aide d'une pillule inhibex, présente dans le Kit, on soustrayait au mélange les possibles inhibiteurs de PCR présents. On récupérait le surnageant après centrifugation.

La lyse bactérienne était alors réalisée par 15<sub>u</sub>L de protéinase K ajoutée à 200<sub>u</sub>L de surnageant et à 200<sub>u</sub>L de tampon AL. La réaction était catalysée par une incubation au bain-marie de 10 minutes à 70-80°C. On obtenait un mélange homogène contenant l'ADN et les débris cellulaires bactériens. Deux cent microlitres d'éthanol absolu permettaient de précipiter l'ADN. On déposait alors l'ensemble du mélange sur des colonnes de silice. La silice absorbait l'ADN qui restait précipité grâce à l'éthanol, alors que les rinçages successifs par les solutions buffer AW1 et buffer AW2 changeaient le pH du milieu et permettaient de séparer les déchets protéiques. Chaque rinçage était accéléré par une centrifugation rapide « pulse » qui faisait traverser la membrane de silice au mélange. Au bout de deux lavages, on obtenait de l'ADN quasiment pur dans la membrane de silice.

Enfin l'ADN était élué et collecté dans 2 tubes eppendorf de 1,5mL annotés au numéro initial du prélèvement. Un tube de 60<sub>u</sub>L était conservé à -20°C pour l'étude.

Un tube de 40<sub>u</sub>L était conservé à -80°C pour constituer la banque de prélèvement de l'unité de recherche INSERM du laboratoire de Bactériologie.

## 8- RECHERCHE DES INTEGRONS

La mise en évidence de la présence ou l'absence d'intégrons dans l'ADN des souches et des prélèvements a été réalisée par une technique de Polymérisation en Chaîne (PCR) multiplex en temps réel élaborée par le laboratoire de bactériologie de Limoges [52].

La préparation de notre réactif de PCR se faisait dans une salle "propre" du laboratoire de recherche de Bactériologie. Dans un tube eppendorf de 1,5mL, on

mélangeait 105<sub>u</sub>L d'eau, 140<sub>u</sub>L de MgCl<sub>2</sub>, 28<sub>u</sub>L de chaque amorce et 14<sub>u</sub>L de chaque sonde. Les sondes utilisées étaient des sondes Taqman<sup>R</sup> composées de 2 parties; une fluorescente, le Reporteur et une absorbante, le Quincheur. La polymérase et son tampon n'étaient rajoutés qu'à la fin de la préparation du mélange. La solution finale était répartie en 32 puits de 15<sub>u</sub>L par "rétro-pipetage".

On ajoutait ensuite en salle "sale" l'ADN obtenu par extraction. On prélevait 5<sub>u</sub>L de chaque extrait que l'on instillait dans un des puits contenant le mélange. Une série de PCR comprenait donc 32 extractions d'ADN et deux témoins, un positif (contenant 3 plasmides ayant chacun inséré un type d'intégrase: *int1*, *int2*, *int3*), un négatif (constitué d'eau stérile).

La plaque était ensuite centrifugée et placée dans l'appareil à PCR quantitative Miapro<sup>®</sup>. Les sondes et les intégrons étaient révélés par leur fluorescence (Cy3; *int1*, Rox; *int2*, Fam; *int3*). Le programme de PCR employé était le "normal 2 step" comprenant trois phases pour un cycle de PCR avec deux températures différentes seulement. La dénaturation se faisait à une température de 95°C pendant 30sec puis l'hybridation et l'élongation se faisaient à une température de 60°C. On avait au total 40 cycles de PCR de une minute et trente secondes.

Les résultats pouvaient être lus simultanément sur le logiciel ou secondairement en fin de réaction.

## 9- OUTILS STATISTIQUES

Une analyse descriptive de la population a été réalisée. Les variables quantitatives ont été décrites par la moyenne +/- l'écart-type. Les variables qualitatives ont été décrites par le nombre et le pourcentage.

La durée de séjour des NN étant variable, nous avons étudié les facteurs de risque de portage d'intégrons par construction de modèles de régression de Cox. Une analyse univariée a d'abord été réalisée. Les variables caractérisées en analyse univariée par un  $p < 0,2$  ont été ensuite incluses dans un modèle intermédiaire. Le modèle final a ensuite été sélectionné par procédure pas à pas basée sur le maximum de vraisemblance. Pour les variables significatives, des courbes de survie de Kaplan Meier ont été construites et comparées par le test du LogRank. Le seuil de significativité retenu était  $p < 0,05$ .

Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Medcalc<sup>R</sup> version 11.4.4.0 (<http://www.medcalc.org>, medcalc software bvba).

Les courbes de cinétique ont été réalisées dans le logiciel R version 2.10.1 (R foundation for statistical computing, <http://www.r-project.org>) avec le package grapheR.

## IV- RESULTATS

### A- DESCRIPTION DE LA POPULATION

#### 1- DESCRIPTION DE LA POPULATION PEDIATRIQUE

L'étude s'est déroulée à l'HME de Limoges sur deux populations distinctes. Durant notre période d'inclusion 252 NN correspondant aux critères d'inclusion ont été prélevés au moins une fois en maternité et 74 en néonatalogie.

##### 1-1. Population de maternité

###### 1-1-1. Nombre d'enfants inclus

Un enfant n'a pas été inclus par refus parental de signer le consentement.

Cinq enfants nés à terme et séjournant initialement en Maternité auprès de leur mère ont été secondairement hospitalisés en Néonatalogie pour suspicion d'Infection Materno-Foetale (IMF) et étudiés avec la population de neonatalogie.

Quarante-quatre NN ont été exclus par absence de prélèvement du premier méconium.

Vingt-deux NN ont été exclus par absence de recueil de la selle de sortie

Cinq prélèvements ont été perdus.

Au total, 188 enfants ont été inclus en maternité.

###### 1-1-2. Données anthropométriques

Tous les enfants avaient plus de 36 SA d'âge gestationnel. L'âge gestationnel moyen de la population de Maternité était de 39 SA +2 jours (36 - 42+2).

Deux-tiers des enfants étaient eutrophes. Le poids de naissance moyen des NN de maternité était de 3253g (+/- 449g).

La durée moyenne de séjour des NN à la Maternité était de 4,3 jours (+/-1,47 jours). La durée maximale de 18 jours était liée à une cause maternelle dans les suites de couche.

Les données anthropométriques de la population de maternité sont regroupées dans le tableau 2.

**Tableau 2:** données anthropométriques de la population de maternité.

	médiane	moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Geste (nombre)	2	2,21	1	8	1,74
Pare (nombre)	2	1,74	1	6	1,30
Age gestationnel (j)	277	277,20	253	294	9,53
Poids de naissance (g)	3260	3252,65	2330	4640	449,24
Durée de séjour (j)	4	4,34	1	18	1,47

## 1-2. Population de néonatalogie

### 1-2-1. Nombre d'inclus

Cent vingt-quatre NN de plus de 32 SA ont été hospitalisés en néonatalogie durant notre étude.

Soixante treize NN de plus de 32 SA ont été prélevés au moins une fois en écouvillon, méconium ou selle.

Un enfant a nécessité un début de prise en charge en unité de réanimation néonatale d'une durée inférieure à 24 heures et a été inclus dans notre étude.

Vingt-deux enfants de plus de 32 SA ont été hospitalisés en réanimation néonatale puis transférés en Néonatalogie après 48 heures de soins. Ils n'ont pas été inclus dans notre étude.

Cinq enfants nés à terme, ont secondairement été hospitalisés en néonatalogie pour suspicion d'IMF et antibiothérapie.

Au total, 48 NN sont restés inclus dans l'étude.

### 1-2-2. Données anthropométriques

L'âge gestationnel moyen de la population de néonatalogie était de 34 SA+ 1jour (31+5 - 40+3).

Les NN étaient majoritairement eutrophes pour leur terme 90% avaient un poids supérieur au dixième percentile sur les courbes Audipog de référence.

Le poids de naissance moyen était de 2114g (+/- 561g).

La durée moyenne de séjour en néonatalogie pour notre population incluse et durant la période de l'étude était de 15 jours (+/- 7, 53 jours).

**Tableau 3:** Données anthropométriques de la population de néonatalogie.

	médiane	moyenne	minimum	maximum	Ecart-type
Geste	2	3	1	8	2,25
Pare	2	2,5	1	7	1,66
AG (SA+jours)	-	34+1	31+5	40+3	-
Poids de naissance	2075	2114,15	1030	3870	561,22
Durée de séjour	14,5	15,48	4	37	7,53

## 2- DONNEES MATERNELLES ET OBSTETRIQUES

Le tableau 4 regroupe et compare l'ensemble des données maternelles, obstétricales et néonatales recueillies pour nos deux populations.

**Tableau 4:** données maternelles et obstétricales des deux groupes de population. Les valeurs sont données en valeur absolue et ajustées au total de la population concernée. Les valeurs marquées par une astérisque (\*) sont données en rapport au nombre de maman. Il n'y avait pas de couple de jumeaux dans la population de maternité. Il y avait 6 couples de jumeaux dans la population de néonatalogie.

	<u>maternité</u> (n=188)	<u>néonatalogie</u> (n=48)	p
<u>Age maternel</u> (ans)			
Moyenne, écart-type (min-max)	30,5 , 5,25 (19-45)	30,35 , 5,37 (19-41)	-
<u>Gestité</u> moy, écart-type (min-max)	2,21 , 1,74 (1-8)	3 , 1,25 (1-8)	-
<u>Parité</u> moy, écart-type (min-max)	1,73 , 1,30 (1-6)	2,5 , 1,66 (1-7)	-
<u>Antibiothérapie pendant la grossesse:</u>			
- en ville	36/188 (19%)*	3/42 (7,1%)*	<b>0,0995</b>
- à l'hôpital	9/188 (4,7%)*	10/42 (23%)*	<b>0,0002</b>
- au total	47/188 (25%)*	13/42 (30,9%)*	0,5486
Prélèvement vaginal positif pour le SB	21/188 (11,1%)*	6/42 (14%)*	0,7627
Durée de RPDE moy (min-max)	6 heures ( 0-180)	47 heures (0-600)	
RPDE>12 h	26/188 (13,8%)	16/48 (38%)	<b>0,0033</b>
<u>Mode d'accouchement:</u>			
- AVB	126/188 (66%)	22/48 (45,8%)	<b>0,0110</b>
- VBi	19/188 (10%)	4/48(8,3%)	0,9227
- Césarienne	44/188( 23,2%)	22/48 (45,8%)	<b>0,0036</b>
Fièvre à l'accouchement	8/188 (4,2%)	1/48 (2%)	-
Antibiothérapie à l'accouchement	38/188 (20%)	8/48 (16%)	0,7268
Liquide amniotique teinté ou méconial	19/188 (10%)	1/48 (2%)	0,1318
<u>Type d'allaitement:</u>			
- Maternel ou mixte	136/188 (72,3%)	27/48 (56,3%)	<b>0,0480</b>
- Artificiel exclusif	52/188 (27,6%)	21/48 (43,7%)	<b>0,0480</b>
<u>Antibiothérapie néonatale</u>			
- Dés J0	-	14/48 (29%)	
- De plus de 48 heures	-	8/14 (57%)	

L'antibiothérapie maternelle pendant la grossesse était différente dans nos deux populations avec une consommation antibiotique majoritairement non hospitalière pour les mamans de la population de maternité et plutôt hospitalière en néonatalogie. Il n'y avait cependant pas de différence entre nos deux populations sur la consommation totale d'antibiotiques pendant la grossesse.

Le nombre de RPDE>12h est significativement plus élevé en néonatalogie.

Le mode d'accouchement est également retrouvé différent entre nos 2 populations avec un nombre d'accouchements par voie basse largement privilégié en maternité alors que la césarienne est plus fréquente en néonatalogie. Par contre, en néonatalogie, la proportion entre accouchement par voie basse et césarienne est équilibrée.

Dans nos deux populations, l'allaitement maternel (au moins une mise au sein en salle de naissance pour les NN de maternité) est privilégié. En proportion cependant, les NN de maternité bénéficient plus souvent d'un allaitement maternel que les NN de néonatalogie.

Les autres facteurs étudiés n'étaient pas significativement différents dans nos 2 populations. L'âge des mamans est identique entre les 2 groupes.

## B- CINETIQUE D'ACQUISITION DES INTEGRONS

Les résultats des PCR à la recherche d'intégrons dans les extractions d'ADN ont été rendus par type de prélèvement et par type de souche bactérienne isolée. La prévalence de ce portage étant faible, du point de vue analytique et statistique il était difficile d'analyser chaque résultat de manière isolée. Ainsi, les enfants ayant présenté un portage digestif en intégrons, de classe 1 ou 2, que ce soit sur extrait direct ou sur culture, ont globalement été considérés comme porteurs.

### 1- NOMBRE D'ENFANTS PORTEURS EN INTEGRONS

Vingt-deux enfants sur 188 (12%) en maternité et 11 sur 48 (23%) en néonatalogie vont présenter des bactéries porteuses d'intégrons (classe 1 et/ou 2). (tableau 5)

**Tableau 5:** répartition des intégrons de type 1 (*int1*) et 2 (*int2*) dans nos deux populations de maternité et néonatalogie.

	<u>Maternité</u> (188 NN)	<u>Néonatalogie</u> (48 NN)
<u>Extraits et souches</u>		
- <i>int1+ int2</i>	22 (12%)	11 (23%)
- <i>int1</i> seul	19	9
- <i>int2</i> seul	4	3
<u>Extraits seuls</u>	9	3
<u>Souches seules</u>	1	1

### 2- REPARTITION DES PRELEVEMENTS POSITIFS SELON LEURS TYPES

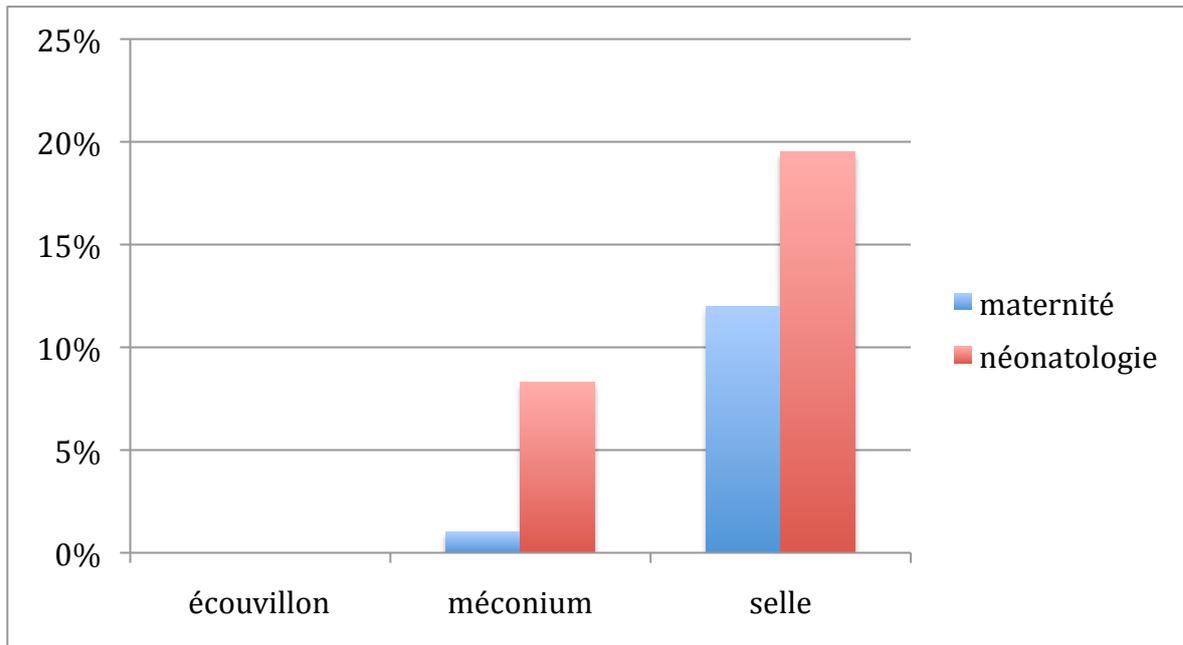
Les résultats ont été ici considérés selon le nombre total de prélèvements positifs et non pas selon le nombre d'enfant. En effet, chaque enfant pouvait présenter plusieurs prélèvements positifs (écouvillon, méconium, selle).

**Tableau 6:** Acquisition en nombre absolu et pourcentage (%) de prélèvements positifs des Intégrons selon le type de prélèvement.

	MATERNITE (718 prélèvements)	NEONATOLOGIE (370 prélèvements)
ECOUVILLON	(136 prélèvements)	(42 prélèvements)
- int1+int2	5 non interprétables	3 non interprétables
- int1 seul	-	-
- int2 seul	-	-
MECONIUM	(190 prélèvements)	(48 prélèvements)
- int1+int2	2 (1)	4 (8,3)
- int1 seul	2	3
- int2 seul	0	1
SELLE	(225 prélèvements)	(138 prélèvements)
- int1+int2	28 (12)	27 (19,5)
- int1 seul	26	18
- int2 seul	2	9

Aucun écouvillon n'a été retrouvé positif.

L'acquisition des intégrons en service de maternité et en service de néonatalogie peut être résumée en un graphique reprenant les deux populations ainsi que les types de prélèvements positifs (figure 2). Si l'on considère le nombre de prélèvements positifs dans le temps, le graphique nous montre une augmentation du portage en intégrons entre les 3 types de prélèvements. Que ce soit la population de maternité (bleu) ou de néonatalogie (rouge), le nombre d'enfant porteur d'intégrons augmente avec le délais associé à chaque type de prélèvement.



**Figure 2:** répartition des extractions d'ADN positives en int1 et int2 cumulés, selon le type de prélèvement; écouvillon, méconium, selle. L'axe des abscisses concerne les deux populations étudiées. L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'intégrons positifs par rapport aux négatifs de chaque type de prélèvement.

### 3- CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS PORTEURS D'INTEGRONS

Les caractéristiques des patients porteurs d'intégrons ont été répertoriées en deux tableaux dans les pages suivantes.

Le tableau 7 reprend les NN de maternité porteurs d'intégrons.

Le tableau 8 concerne les NN de néonatalogie porteurs d'intégrons.

**Tableau 7:** caractéristiques cliniques des enfants porteurs d'intégrons de type 1 ou 2 dans la population de maternité. (tableau sur 2 pages)

CLE	DONNEES CLINIQUES MATEERNELLES, OBSTETRICALES, NEONATALES											TYPE D'INTEGRON	
	gestité	parité	Portage SR	AB	RPDE > 12h	Fièvre à l'accouchement	Couleur LA	AB à l'accouchement	Mode d'accouchement	Age gestationnel (SA+J)	Poids de naissance (kg)		Mode d'allaitement
26	4	4	+	-	-	+	clair	amoxicilline	VB	40+2	3535	sein	Int1
42	2	2	-	-	+	-	clair	amoxicilline	césarienne	36+6	2750	sein	Int1
50	3	2	-	-	-	-	clair	-	césarienne	38+5	3010	sein	Int1
69	1	1	-	-	-	-	clair	-	VB	40+5	3330	sein	Int1
81	2	1	-	-	-	-	clair	-	VBi	39+1	3990	sein	Int1
93	5	4	+	-	-	-	clair	-	VB	37+4	2800	sein	Int2
97	1	1	-	-	-	-	clair	-	VBi	39+1	3980	sein	Int1
102	6	4	+	-	-	-	méconial	amoxicilline	Césarienne	40+6	3760	LA	Int1
118	1	1	-	-	+	+	clair	amoxicilline	césarienne	41+6	4010	sein	Int1
131	5	2	-	-	-	-	clair	-	VB	36+3	2880	sein	Int1
142	3	3	-	-	-	-	clair	-	VB	40+6	3375	sein	Int1
150	3	2	-	-	-	-	clair	amoxicilline	VB	40+6	3280	LA	Int1
155	1	1	-	-	-	-	clair	-	VBi	38+5	3310	mixte	Int1
158	3	2	-	-	-	-	clair	-	VB	40+4	4140	sein	Int1

DONNEES CLINIQUES MATEERNELLES, OBSTETRICALES, NEONATALES

<u>CLE</u>	<u>Gestité</u>	<u>parité</u>	<u>Portage SB</u>	<u>AB</u> <u>perpartum</u>	<u>RPDE &gt; 12h</u>	<u>Fièvre</u> <u>se à</u> <u>l'accouché</u>	<u>Couleur LA</u>	<u>AB à</u> <u>l'accouché</u>	<u>Mode</u> <u>d'accouché</u>	<u>Age</u> <u>gestationnel (SA+1)</u>	<u>Poids de</u> <u>naissance (kg)</u>	<u>Mode</u> <u>d'allaitement</u>	<u>TYPE D'</u>
													<u>INTEGRON</u>
160	3	2	+	-	-	-	teinté	amoxicilline	VB	39+3	3340	sein	Int1+int2
172	1	1	-	C3G 10 jrs	-	-	clair	-	VB	40+4	3030	sein	Int1
179	2	2	+	-	-	-	clair	amoxicilline	VB	39+6	3140	sein	Int2
181	2	2	+	-	-	-	clair	rovamycine	VB	41+6	3760	sein	Int2
200	2	1	-	-	-	-	clair	-	VBi	37+5	2240	LA	Int1
203	3	3	-	-	-	-	clair	-	VB	38+6	3690	LA	Int1
208	5	1	+	-	-	-	clair	amoxicilline	césarienne	39+5	2660	sein	Int1
239	2	1	-	-	-	-	clair	-	VB	40+5	3250	sein	Int1
247	3	2	-	?	-	-	clair	-	VB	40+5	3690	LA	Int1

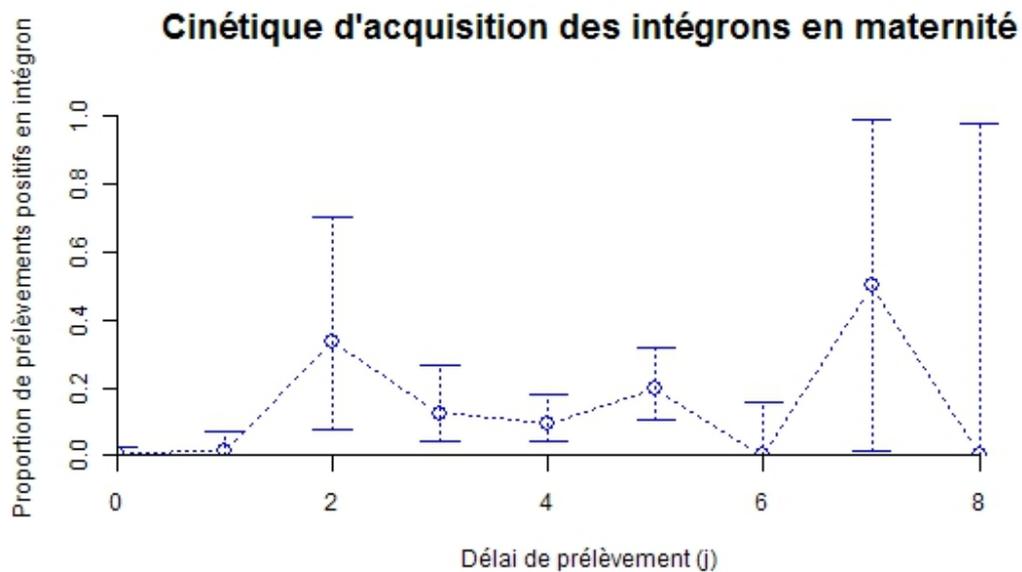
**Tableau 8:** caractéristiques cliniques des enfants porteurs d'intégrons de type 1 et 2 en néonatalogie.

<u>CLE</u>	<u>DONNEES CLINIQUES MATEERNELLES, OBSTETRICALES, NEONATALES</u>											<u>TYPE D'INTEGRON</u>	
	<u>Gestité</u>	<u>parité</u>	<u>Portage SB</u>	<u>AE perpartum</u>	<u>RPDE &gt; 12h</u>	<u>Fièvre à l'accouchement</u>	<u>Couleur LA</u>	<u>AB à l'accouchement</u>	<u>Mode d'accouchement</u>	<u>Age gestationnel (SA+J)</u>	<u>Poids de naissance (kg)</u>		<u>Mode d'allaitement</u>
<b>1</b>	1	1	-	-	+	-	clair	amoxicilline	VB	31+5	2490	sein	Int1
<b>6</b>	4	4	+	-	+	-	clair	-	césarienne	33+3	1730	sein	Int1
<b>8</b>	3	2	-	-	-	-	clair	-	VB	33+5	2160	sein	Int1
<b>9</b>	3	2	-	-	-	-	clair	-	VB	33+5	2320	sein	Int1
<b>14</b>	2	1	+	-	+	-	clair	-	césarienne	34+5	2220	sein	Int1
<b>15</b>	3	2	-	-	+	-	clair	amoxicilline	VB	32+4	1565	sein	Int1
<b>51</b>	1	2	-	-	-	-	teinté	-	VB	34+6	2680	sein	Int1+Int2
<b>52</b>	1	2	-	-	-	-	clair	-	VB	34+6	2480	LA	Int1+Int2
<b>59</b>	1	1	-	-	+	-	clair	amoxicilline	VB	34+3	2550	sein	Int1+Int2
<b>69</b>	1	2	-	-	-	-	clair	-	VBi	37+2	1760	sein	Int1
<b>71</b>	7	7	-	-	-	-	clair	-	césarienne	35+0	1730	sein	Int1

## 4- CINÉTIQUE QUALITATIVE D'ACQUISITION DES INTÉGRONS

### 4-1. NN de Maternité

La figure 3 rapporte les prévalences de portage en intégrons des NN de maternité en fonction du délais du prélèvement par rapport à la naissance.



**Figure 3:** Cinétique d'acquisition des intégrons de multirésistance de type 1 et 2 dans la population de maternité. En abscisse, le temps en jours. En ordonnée, proportion d'enfants positifs par jour suivant la naissance.

La courbe cinétique de prévalence des intégrons pour notre population de maternité montre une absence de portage d'intégrons au premier jour de vie.

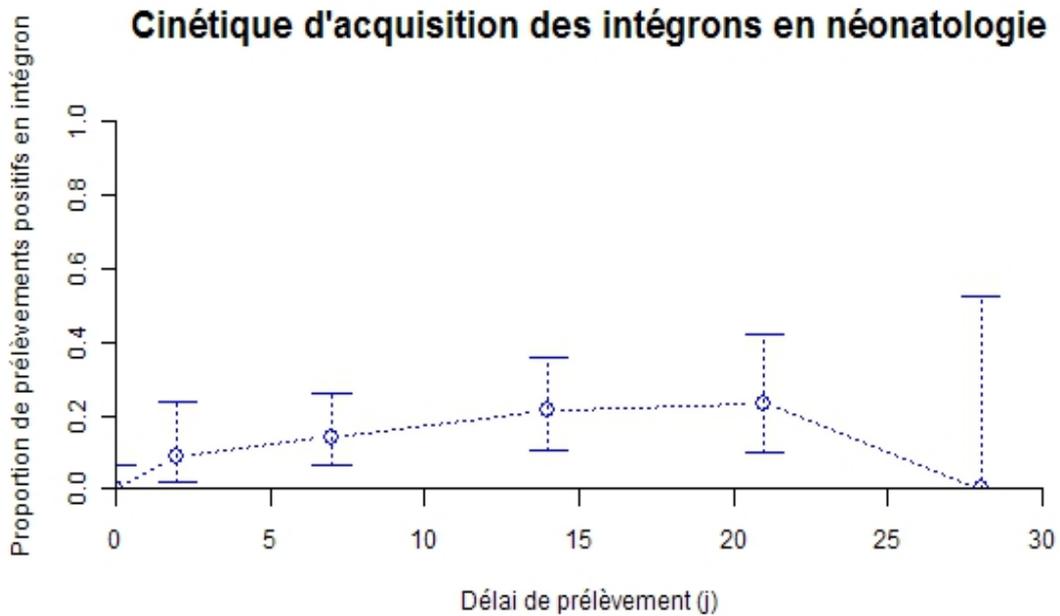
Cette prévalence augmente dans le temps. Elle augmente rapidement entre J0 et J2 puis on note un nombre croissant d'enfants porteurs entre le deuxième et le cinquième jour d'hospitalisation.

La prévalence régresse ensuite pour les prélèvements réalisés du sixième au huitième jour d'hospitalisation, concernant 19 enfants encore présents à J6 de vie et tous non porteurs d'intégrons, 2 enfants présents à J7 et 1 sur 2 étaient porteurs d'intégrons, 1 seul enfant présent à J8 et non porteur d'intégrons.

Une seule enfant a été hospitalisée 18 jours et n'a pas présenté d'intégrons, elle n'est pas représentée sur le graphique.

#### 4-2. NN de Néonatalogie

La figure 4 représente la même prévalence des intégrons en fonction du temps dans la population de néonatalogie.



**Figure 4:** Cinétique d'acquisition des Intégrons en néonatalogie. En abscisse, délais des prélèvements par rapport à la naissance. En ordonnée, proportion d'enfants porteurs d'intégrons.

Aucun enfant n'est porteur d'intégrons en néonatalogie à J0.

La prévalence du portage en intégrons augmente régulièrement jusqu'à 3 semaines de vie.

Le dernier point de notre courbe de cinétique (à J28) ne concerne que 6 NN dont aucun ne portait d'intégrons.

## 5- CINÉTIQUE QUANTITATIVE D'ACQUISITION DES INTÉGRONS DANS LA POPULATION DE NEONATOLOGIE

Elle figure sur le tableau ci-dessous (tableau 9).

**Tableau 9:** Cinétique quantitative d'acquisition des intégrons de type 1 et 2 dans la population de néonatalogie sur extraction directe de selle. *intl1*= intégrons de type 1, *intl2*= intégrons de type 2. Le numéro des enfants correspond à leur numéro de randomisation en bactériologie. En bleu: les intégrons de type 1, en saumon les intégrons de type 2. Les deux enfants 51 et 52, en rose, sont porteurs des deux types d'intégrons.

			Cinétique (nombre de copie d'intégrons par gramme de selle) PCR multiplex temps réel			
Enfant	<i>intl1</i>	<i>intl2</i>	Méconium	selle 1	selle 2	selle 3
1	+	-	$1,06.10^9$	$4,03.10^8$	-	-
6	+	-	0	$1,08.10^5$	0	-
8	+	-	0	$2,79.10^6$	$1,76.10^5$	$1,57.10^7$
9	+	-	0	$4,12.10^7$	$4,42.10^7$	$9,45.10^7$
14	+	-	0	0	$2,43.10^6$	*
15	+	-	0	0	0	$2,21.10^7$
51	+	-	$5,07.10^7$	$1,61.10^9$	$3,06.10^8$	-
	-	+	0	0	$9,50.10^5$	-
52	+	-	$3,35.10^7$	$5,20.10^9$	$3,68.10^9$	-
	-	+	$2,21.10^6$	$2,37.10^6$	$1,56.10^6$	-
59	-	+	0	$3,96.10^7$	$2,68.10^5$	-
69	+	-	0	$4,32.10^8$	-	-
71	+	-	0	0	$1,53.10^5$	-

De ce tableau ne ressort pas une cinétique quantitative évidente, la durée d'hospitalisation des enfants étant un facteur limitant au nombre de prélèvements.

Les enfants porteurs d'intégrons de type 1 ou 2 présentent d'emblée des taux élevés et qui restent stables dans le temps.

- Deux enfants (1 et 69) n'ont eu que deux prélèvements avant leur sortie, ne permettant pas de conclusion d'évolution de portage dans le temps.
- Deux enfants (6 et 14) présentent des intégrons sur le prélèvement respectivement de leur première et deuxième selles alors que le prélèvement suivant est resté négatif.

- Les enfants 15 et 71 ne sont porteurs en intégrons que sur leur selle de sortie, ne permettant pas d'en déduire une dynamique d'acquisition.

Cependant les résultats de cinq enfants sont intéressants:

- les enfants 8, 9 et 59 présentent des taux stables ( $10^5$  à  $1.10^7$  copies/g) dans le temps, respectivement sur leurs 3 et 2 prélèvements.
- Les enfants 51 et 52 sont un couple de jumeaux d'une grossesse monochoriale biamniotique. Leur mère n'avait pas consommé d'antibiotique au cours de la grossesse. Ces deux enfants sont nés prématurément à 34 SA et 6 jours. Ils ne sont pas hypotrophes et n'ont pas nécessité de soins invasifs au cours de leur séjour en néonatalogie. Ils ont été nourris au lait artificiel. Le premier élément remarquable chez ces deux enfants est l'acquisition initiale et conjointe en intégrons de type 1 avec une cinétique quantitative similaire sur leurs différents prélèvements. Le second élément est l'acquisition secondaire en intégrons de type 2 chez le NN 51 alors qu'elle était initiale chez son jumeau.

### **C- ANALYSE EN FONCTION DES CRITÈRES DE JUGEMENT SECONDAIRES**

#### **1- ANALYSE UNIVARIEE DES FACTEURS SUPPOSÉS A RISQUE D'AUGMENTER LE PORTAGE EN INTEGRONS DE LA POPULATION DE MATERNITE**

Nous avons représenté dans le tableau 10 l'ensemble des critères de jugement secondaires étudiés et leur corrélation avec le portage digestif des NN de maternité en intégrons.

**Tableau 10:** Evaluation des facteurs supposés à risque de favoriser le portage en intégrons en maternité. RR= risque relatif, calculé par modèle de régression de Cox. p= indice de significativité. SB= streptocoque du groupe B. ATB= antibiothérapie. RPDE= rupture de la poche des eaux. LA= liquide amniotique, meco= méconial. AG= âge gestationnel. PN= poids de naissance. LA= lait artificiel.

Variable	RR	Intervalle de confiance (IC=95%)	p
<b><u>DONNEES MATERNELLES</u></b>			
- Âge (ans)	1,000	0,999-1,001	0,2728
- Geste (n)	1,370	1,087-1,726	<b>0,0079</b>
- portage SB (o/n)	2,896	1,173- 7,150	<b>0,0218</b>
- ATB grossesse			
.ville (o/n)	0,297	0,040- 2,190	0,2359
.hôpital (o/n)	0,523	0,070- 3,893	0,5287
<b><u>DONNEES OBSTETRIQUES</u></b>			
- RPDE>12 h (o/n)	0,508	0,120- 2,163	0,3623
- Fièvre travail (o/n)	1,642	0,198- 13,595	0,6474
- Fièvre acct (o/n)	1,809	0,409- 7,990	0,4367
- Mode acct (VBI vs VB)	4,606	1,397- 15,192	<b>0,01257</b>
- LA (teinté/meco)	0,664	0,196- 2,260	0,5143
<b><u>DONNEES NN</u></b>			
- AG (jours)	1,023	0,981- 1,068	0,2935
- PN (g)	1,000	0,998- 1,000	0,6414
- Hypotrophie (o/n)	0,546	0,213- 1,405	0,2119
- Sein/Lait	0,861	0,338- 2,196	0,7548
- ATB NN (o/n)	0,646	0,305- 1,507	0,7710

Trois critères sont statistiquement associés à une augmentation du risque de portage en intégron:

- Le nombre de grossesses.
- Le portage vaginal du SB
- Le mode d'accouchement par voie basse instrumentalisée.

Les autres n'étaient pas significatifs:

- L'antibiothérapie pendant la grossesse, qu'elle soit délivrée en ville ou lors d'une hospitalisation.
- La durée de rupture de la poche des eaux de plus de douze heures
- La fièvre maternelle, qu'elle soit pendant le travail ou pendant l'accouchement

- La couleur du liquide amniotique à la naissance, qu'elle soit teintée ou méconiale
- L'âge gestationnel en valeur continue
- Le poids de naissance, en valeur continue
- L'hypotrophie n'est pas statistiquement liée à un risque majoré de portage en intégrons.

## 2- ANALYSE MULTIVARIÉE DANS LA POPULATION DE MATERNITE

Le tableau 11 regroupe les critères dont le  $p < 0,2$  en analyse univariée et présente les résultats de l'analyse multivariée. En analyse multivariée l'indice de significativité  $p$  est plus sélectif ( $< 0,05$ ) permettant d'identifier les associations statistiques de manière plus sûre.

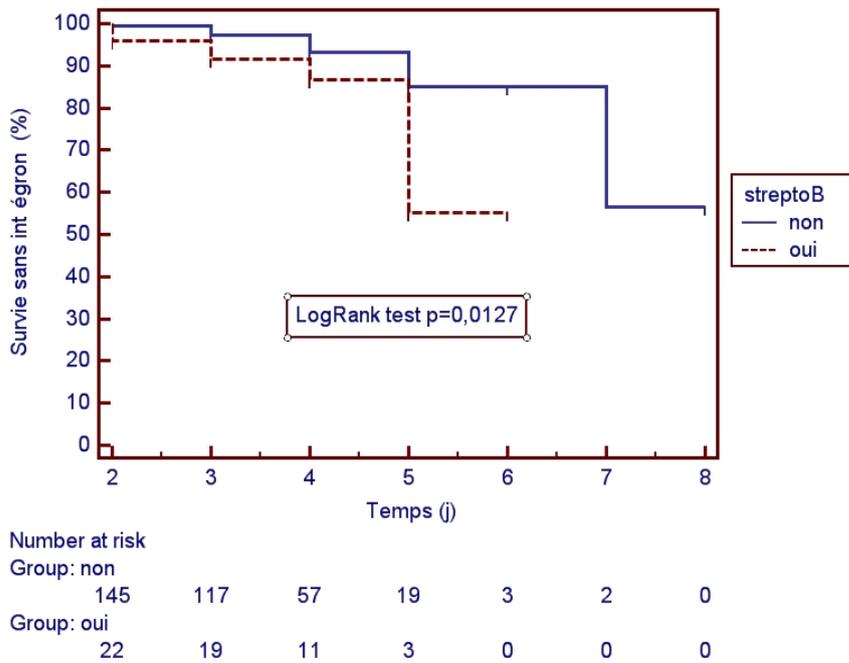
**Tableau 11:** Facteurs de risque significatifs d'acquisition des intégrons de multirésistance dans la population de maternité.

	RR	IC(95%)	p
G	1,340	1,054- 1,754	<b>0,01856</b>
SB	2,776	1,029- 7,486	<b>0,04481</b>
VBI	4,606	1,397- 15,192	<b>0,0126</b>

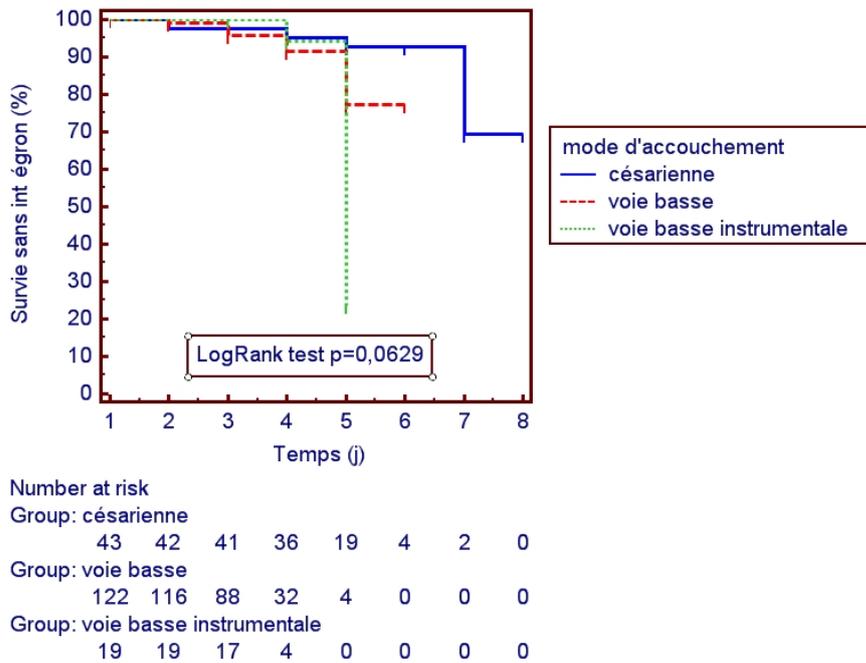
La gestité est statistiquement corrélée au portage en intégrons de multirésistances. A chaque grossesse supplémentaire, le risque pour le NN de porter un intégron augmente de 1,340 (1,054- 1,754) ( $p < 0,05$ ).

Le portage en streptocoque du groupe B chez la maman est statistiquement corrélé à l'acquisition en intégron de multirésistance chez le NN. Le risque de portage en IM chez le NN de mère porteuse du streptocoque du groupe B est 2,776 (1,029- 7,486) ( $p < 0,05$ ) fois plus important que chez la mère non porteuse.

Enfin, la naissance par voie basse instrumentale (VBI) est statistiquement corrélée au risque de portage néonatal en intégron avec une augmentation du risque de 4,606 (1,397- 15,192) ( $p < 0,05$ ) par rapport aux deux autres modes d'accouchement.



**Figure 5:** courbe de régression logistique de Kaplan-Meier. Le portage en SB diminue la survie sans portage en intégron en maternité.



**Figure 6:** La courbe de survie de Kaplan-Meier illustre la diminution de la survie sans portage en intégrons avec le nombre de voies basses instrumentales par rapport aux deux autres modes d'accouchement en maternité.

### 3- ANALYSE UNIVARIEE DES FACTEURS SUPPOSÉS A RISQUE D'AUGMENTER LE PORTAGE EN INTEGRONS DE LA POPULATION DE NEONATOLOGIE

**Tableau 12:** Analyse univariée des facteurs maternels, obstétricaux et néonataux supposés influencer le mode d'acquisition des intégrons de multirésistance.

	RR	IC (95%)	p
<u>DONNÉES MATERNELLES</u>			
- Geste	0,894	0,659- 1,212	0,4723
- Portage SB	1,288	0,275- 6,033	0,7497
- Antibiothérapie:			
. totale	1,303	0,408- 4,166	0,6572
. en ville	0	-	-
. à l'hôpital	1,705	0,495- 5,880	0,4005
<u>DONNEES OBSTETRIQUES</u>			
- mode d'accouchement			
. Césarienne vs VB			
. VBI vs VB	0,616	0,181- 2,101	0,4412
- RPDE>12h	1,902	0,217- 16,960	0,5662
- Fièvre Acct	2,747	0,785- 9,613	0,1156
- Couleur LA	0	-	-
(teinté ou méconial vs clair)	4,166	0,530- 32,770	0,1773
<u>DONNEES NN</u>			
- AG	0,991	0,944- 1,041	0,7167
- PN	1,001	1,000- 1,001	0,2991
- Hypotrophie	0,423	0,092- 1,937	0,2703
- Type d'allaitement			
. maternel	0,539	0,070- 4,209	0,5575
. hydrolysat	0,780	0,158- 3,845	0,5634
. lait pour prématuré	0,710	0,092- 5,456	0,7433

L'analyse indépendante de chaque facteur supposé à risque d'acquisition d'intégrons chez le NN de néonatalogie révèle deux facteurs de risques possibles: la rupture prolongée de la poche des eaux de plus de douze heures et la couleur teintée ou méconiale du liquide amniotique versus clair à la naissance.

Dans cette population la gestité, le portage maternel à SB et le mode d'accouchement par voie basse instrumentalisée ne ressortent pas comme facteurs potentiellement à risque.

#### 4- ANALYSE MULTIVARIEE DES FACTEURS SIGNIFICATIFS ( $p < 0,2$ ) DE LA POPULATION DE NEONATOLOGIE

Le tableau 13 regroupe les critères dont le  $p < 0,2$  en analyse univariée et présente les résultats de l'analyse multivariée.

**Tableau 13:** analyse multivariée des facteurs potentiellement à risque ( $p < 0,2$ ) d'acquisition des intégrons en analyse univariée.

	RR	IC (95%)	p
RPDE >12 heures	1,613	0,457- 5,697	0,4061
Hypotrophie	0,542	0,107- 2,730	0,4594
LA teinté ou méconial vs clair	0,2778	0,323- 23, 898	0,3546

Aucun des trois facteurs étudiés n'est statistiquement significatif comme facteur de risque d'acquisition des intégrons dans la population de néonatalogie.

La rupture prolongée de la poche des eaux et la couleur du liquide amniotique ressortaient comme facteurs potentiellement à risque en analyse univariée. La comparaison de ces facteurs entre eux ne révèle pas de significativité statistique ( $p > 0,05$ ).

L'hypotrophie a été intégrée dans l'analyse multivariée parce qu'elle paraissait un facteur essentiel à étudier. Elle ne ressort pas comme facteur de risque statistiquement significatif que se soit en analyse univariée ou multivariée.

## **D- RESULTATS DES CULTURES BACTÉRIOLOGIQUES**

La culture bactérienne et la recherche de BMR ne faisaient pas partie de nos critères d'étude. Les cultures réalisées en amont des extractions d'ADN sur souches ont cependant apporté des résultats intéressants qui méritaient d'être confrontés secondairement aux données publiées sur le sujet. On rappelle que seuls les BGN sont concernés par nos cultures.

### **1- PRINCIPALES ESPECES ISOLEES**

Le tableau 14 regroupe les principaux BGN retrouvés en culture. En maternité, 725 prélèvements ont été réalisés dont 406 cultures positives (56%). En néonatalogie, 375 prélèvements ont été réalisés dont 266 positives (71%). Au total, 1100 prélèvements ont été mis en culture dont 672 positifs (61%).

**Tableau 14:** les principaux BGN retrouvés en culture sur gélose Drigalski avant extraction d'ADN. Les valeurs sont données en absolu et en pourcentage du nombre de culture positive pour chaque population et pour les 2 populations confondues. Les p ont été obtenus par test de Khi-2. Les pourcentages et tests de significativité n'ont pas été appliqués aux groupes à trop faibles effectifs car les résultats seraient non interprétables.

<b>Bactéries isolées</b>	<b>Maternité</b> (406) nombre (%)	<b>Néonatalogie</b> (266) nombre (%)	p (mater/NN)
<i>Escherichia coli</i>	175 (43)	72 (27)	<b>p&lt;0,0001</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12 (2,9)	10 (3,7)	p=0,7256
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9 (2,2)	15 (5,6)	<b>p=0,0336</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	9 (2,2)	5 (1,9)	p=0,9816
<i>Pantoea spp</i>	7 (1,7)	1 (0,3)	p=0,2254
<i>Serratia marcescens</i>	0	7 (2,6)	<b>p=0,0038</b>
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	1	-
<i>Citrobacter frundii</i>	2	4	-
<i>Citrobacter koseri</i>	3	0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	-
<i>Morganella morganii</i>	1	1	-
<i>Hafnia alvei</i>	1	1	-
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1	0	-
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	-
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1	-

Le nombre de prélèvements positifs en culture par rapport au nombre total de prélèvements dans chaque population est statistiquement supérieur ( $p<0,0001$ ) en néonatalogie par rapport à la population de maternité.

Au total, 17 espèces différentes ont été isolées. On dénombre 15 espèces différentes pour la population de maternité et 12 pour la population de néonatalogie. Il n'existe pas de différence significative entre les deux populations ( $p=0,3963$ ).

Les BGN dominants sont les mêmes dans nos 2 populations.

Dans les cultures positives en BGN, *Escherichia coli* domine en néonatalogie (27%) et en maternité (43%).

Dans la population de maternité, la flore BGN dominante est représentée par *E. coli*, suivie par *Klebsiella pneumoniae* (2,9%) puis *Klebsiella oxytoca* et *Enterobacter cloacae* (2,2%), enfin *Pantoea spp* (1,7%).

Dans la population de néonatalogie, la flore BGN dominante est également représentée par *E. Coli*. Cependant, les autres bactéries les plus fréquemment retrouvées diffèrent en proportion. La seconde espèce la plus représentée dans la population de néonatalogie est *Klebsiella oxytoca* (5,6%), suivie par *Klebsiella pneumoniae* (3,7%), *Serratia marcescens* (2,6%) puis par *Enterobacter cloacae* (1,9%) et *Citrobacter freundii*.

Il existe des différences de colonisation en BGN statistiquement significatives entre les 2 populations pour: *E. coli* ( $p<0,0001$ ), sur-représentée dans la population de maternité, *Klebsiella oxytoca*, retrouvée plus fréquemment dans les cultures de néonatalogie ( $p=0,0336$ ) et *Serratia marcescens*, retrouvée exclusivement dans les prélèvements de néonatalogie ( $p=0,0038$ ).

## 2- NOMBRE DE BGN PAR TYPE DE PRELEVEMENT

### 2-1. Répartition des cultures positives selon les prélèvements

Le tableau 15 répertorie le nombre de BGN selon le type de prélèvement, donc le délais par rapport à la naissance, dans nos 2 populations.

**Tableau 15:** nombre de BGN par type de prélèvement et par population.

	<b>Maternité</b>	<b>Néonatalogie</b>	p
	Nombre (%)	Nombre (%)	
<b>Écouvillon (J0)</b>	3/136 (2,2)	0/42	0,7756
<b>Méconium (J0-J1)</b>	45/188 (23,9)	8/48 (16,6)	0,3770
<b>Selle J7 (+/- 3,5 jours)</b>	183/225 (81,3)	35/54 (64,8)	<b>0,0141</b>
J14 (+/- 3,5 jours)	0/1	41/48 (85,4)	-
J21 (+/- 3,5 jours)	0/1	30/31 (96,7)	-
J28 (+/- 3,5 jours)	-	5/5 (100)	-

A la naissance, 2,2% des écouvillons réalisés en maternité sont positifs en BGN, aucun des NN de néonatalogie ne porte de BGN. La différence n'est pas statistiquement significative entre les 2 populations (p=0,7756).

La colonisation du tube digestif des NN en BGN augmente au cours de la première semaine de vie dans les deux populations.

Par contre, elle paraît plus importante dans la population de maternité que dans celle de néonatalogie. Le nombre de prélèvements positifs est supérieur en maternité (23,9% de cultures positives en BGN) dès J0-J1 (émission du premier méconium), avec une différence non significative entre la maternité et la néonatalogie (p=0,3770). Cette différence s'accroît au cours de la première semaine de vie avec une différence statistiquement significative à 7 jours de vie avec 81,3% de colonisation en maternité contre 64,8% en néonatalogie (p=0,0141).

## 2-2. Cinétique d'acquisition des BGN en néonatalogie

Le tableau 16 reprend l'ensemble des prélèvements positifs en BGN de la population de néonatalogie. Cette population, chez qui certains enfants ont été suivis sur 4 semaines, permet de se faire une idée de la cinétique du portage en BGN des NN de néonatalogie sur le premier mois de vie.

**Tableau 16:** prévalence de la colonisation digestive en BGN sur 4 semaines de suivi de la population de néonatalogie. Positifs= nombre de cultures positives. %= rapport cultures positives/cultures négatives par type de prélèvement. P calculé par test du Khi-2 entre chaque prélèvement puis sur l'ensemble des prélèvements.

	Ecouvillon	Méconium	Selle 1	Selle 2	Selle 3	Selle 4	p
<b>NN:</b> - positifs	0	8	35	41	30	5	
- %	0	16,6	64,8	85,4	96,7	100	<0,0001
- p	<b>0,0164</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0311</b>	0,2106	0,2896		

Il existe une augmentation significative au cours du premier mois de vie du portage en BGN dans notre population ( $p < 0,0001$ ).

Il existe une augmentation rapide du portage en BGN entre les écouvillons et les premiers méconiums ( $p = 0,0164$ ). La colonisation du tube digestif en BGN augmente ensuite de manière significative au cours des 2 premières semaines de vie, passant de 16,6% de portage à 85,4% des prélèvements ( $p < 0,05$  pour les 2 semaines).

L'augmentation se poursuit sur les 2 semaines suivantes, permettant d'atteindre une positivité de 100% des cultures en BGN à 4 semaines de suivi ( $p > 0,05$ ).

### 3- NOMBRE MOYEN DE BGN PAR ENFANT

**Tableau 17:** nombre moyen de BGN par enfant dans chaque population.

Nombre de BGN par enfant	<u>Maternité</u>	<u>Néonatalogie</u>
	(188 enfants)	(48 enfants)
Médiane	2,16	5,54
Minimum	0	0
Maximum	4	7

Les NN de néonatalogie présentent un nombre cumulé de BGN par enfant supérieur aux NN de maternité sur des durées moyennes d'hospitalisations de 4 jours en maternité et 15 jours en néonatalogie.

Soit une colonisation en BGN par enfant rapportée à la durée moyenne d'hospitalisation de 0,5 germe/NN/jour en maternité et de 0,36 germe/NN/jour en

néonatalogie. La colonisation digestive par les BGN est plus importante en maternité que en néonatalogie.

#### 4- LIEN BGN/INTEGRONS

##### 4-1. Association par germe entre la colonisation en BGN, portage en intégron et BMR en maternité et néonatalogie

Le tableau 18 présente l'association entre le type de germe retrouvé, la présence en intégron et le portage en BMR pour chacune de nos 2 populations.

**Tableau 18:** association entre le portage en BGN, intégrons et BMR dans les 2 populations étudiées et indice de significativité de la différence entre les 2 populations calculé par test de Khi-2.

	maternité	néonatalogie	p
<u><i>E. coli</i></u>	175	72	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Int+</i>	24 (13,7)	18 (25)	<b>0,0501</b>
BMR +	4 (2,2)	5 (6,9)	0,1609
<u><i>Klebsiella pneumoniae</i></u>	12	10	0,7256
<i>Int+</i>	1	4	0,2099
BMR+	-	-	-
<u><i>Klebsiella oxytoca</i></u>	9	15	<b>0,0336</b>
<i>Int+</i>	1	2	0,6326
BMR+	-	-	-
<u><i>Enterobacter cloacae</i></u>	9	5	0,9816
<i>Int+</i>	1	1	0,7327
BMR+	-	1	0,7570
<u><i>Pantoea spp</i></u>	7	1	0,2254
<i>Int+</i>	-	1	-
BMR+	-	-	-
<u><i>Citrobacter freundii</i></u>	2	4	-
<i>Int+</i>	1	-	-
BMR+	-	-	-
<u><i>E. aerogenes</i></u>	4	1	-
<i>Int+</i>	1	-	-
BMR+	-	-	-
<u><i>Hafnia alvei</i></u>	1	1	-
<i>Int+</i>	-	-	-
BMR+	-	1	-
<u><i>Morganella morganii</i></u>	1	1	-
<i>Int+</i>	-	1	-
BMR+	1	-	-
<u><i>Proteus mirabilis</i></u>	4	1	-
<i>Int+</i>	1	-	-
BMR+	-	-	-
<u><i>P. aeruginosa</i></u>	2	-	-
<i>Int+</i>	1	-	-
BMR+	0	-	-

Seule *E. coli* présente une différence significative dans son association au portage en intégrons entre les populations de maternité et néonatalogie.

#### 4-2. Lien entre acquisition des BGN et portage en intégrons

**Tableau 19:** corrélation entre la colonisation en BGN et le portage en intégrons.

	Int+	p
<i>E. coli</i>	42/247	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5/22	<b>0,0015</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3/24	0,2666
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0,3712
<i>Pantoea spp.</i>	1	0,9111

Ce tableau regroupe l'ensemble des cultures positives de maternité et néonatalogie pour les 5 germes les plus fréquemment isolés. La colonisation digestive à *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae* est statistiquement liée au portage en intégrons. Les 3 autres BGN les plus fréquemment retrouvés ne sont pas associés à une augmentation significative du risque de portage en intégrons. Les autres germes n'ont pas été testés car ils sont de prévalence faible avec un portage très faible en intégron.

### E- ACQUISITION DES BMR

#### 1- ACQUISITION DE BMR EN NEONATOLOGIE ET MATERNITE

Les BMR recherchées étaient celles ayant un intérêt pour la pratique hospitalière courante: BLSE ( $\beta$ -lactamases à spectre étendu) et céphalosporinases déréprimées.

Peu d'enfants ont acquis des BMR au cours de leur séjour en maternité et en Néonatalogie. Sept enfants ont été colonisés sur 48 en néonatalogie (14,5%). Trois enfants ont été colonisés en maternité sur 189 en maternité (1,5%). Soit une contamination quasiment 10 fois supérieure en néonatalogie que en maternité.

En rapportant au nombre de prélèvements réalisés les écarts diffèrent.

Le pourcentage de BMR par rapport au nombre de cultures positives était donc de 0,6%. Soit un rapport de contamination 5 fois supérieure en néonatalogie par rapport à la maternité. Un test de Khi-2 sur les résultats de BMR entre les deux populations

retrouve une augmentation significative du risque de contamination en BMR en néonatalogie par rapport au service de maternité ( $p < 0,01$ ).

**Tableau 20:** test de Khi-2 appliqué au portage en BMR dans les deux populations.

	BMR +	BMR -	p
maternité	3 (0,5)	504 (99,5)	P<0,01
néonatalogie	7 (3,4)	196 (96,5)	

Aucun écouvillon ni méconium n'a été colonisé. Seules les selles étaient concernées dans nos 2 populations.

Aucune cinétique n'a pu être établie du fait de la faible quantité des prélèvements.

Les germes retrouvés ainsi que leur résistance ont été colligés dans un tableau descriptif. (Tableau 21)

**Tableau 21:** Acquisition des BMR en néonatalogie et maternité. BLSE= Betalactamase à spectre étendu.

	GERME	RÉSISTANCE	INTÉGRON	
<b>NEONATOLOGIE</b>	<i>Hafnia alvei</i>	Céphalosporinase déprimée	-	
	<i>E. coli</i>	BLSE	Int1+	
	<i>E. coli</i>	BLSE	Int1+	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Céphalosporinase déprimée	-	
	<i>E. coli</i>	BLSE	-	
	<i>E. coli</i>	BLSE	-	
	<i>E. coli</i>	BLSE	-	
	<b>MATERNITE</b>	<i>E. coli</i>	Céphalosporinase déprimée	-
		<i>Enterobacter aerogenes</i>	Céphalosporinase déprimée	-
		<i>E. coli</i>	BLSE	-

Les résistances acquises concernaient la famille des bêtalactamines, céphalosporines seules dans 40% des cas (céphalosporinase dérégulée) ou pénicillines et céphalosporines dans 60% des cas (BLSE).

Nous étudions ensuite les facteurs de risque d'acquisition de ces résistances dans nos deux populations.

## 2- ACQUISITION DES BMR EN MATERNITE

Le tableau 22 présente les risques relatifs d'acquisition de BMR selon les données cliniques maternelles, obstétricales et néonatales de la population de néonatalogie.

**Tableau 22:** Facteurs de risque d'acquisition des BMR dans la population de maternité. Par le trop faible nombre de cas colonisés en BMR peu de facteurs ont été analysables par les outils statistiques employés. Les (-) correspondent à un RR à 0 avec un IC (95%) allant de zéro à l'infini.

	RR	IC (95%)	p
<u>Facteurs maternels:</u>			
- gestité	1,114	0,568- 2,270	0,7212
- portage en SB	-	-	0,9647
- antibiothérapie per-partum	-	-	0,9638
<u>Facteurs obstétricaux:</u>			
- RPDE>12h	-	-	0,9640
- mode d'acct			
. cesar vs VB	-	-	0,9565
. VBI vs VB	-	-	0,9834
- AB acct	-	-	0,9516
- Couleur LA (teinté ou méconial vs clair)	3,132	0,326- 30,120	0,3253
<u>Facteurs néonataux:</u>			
- AG	0,969	0,886- 1,061	0,5000
- Mise au sein (en salle de naissance)	1,243	0,129- 11,995	0,8516

Aucun des facteurs étudiés n'est relevant comme facteur de risque de colonisation par les BMR en maternité.

### 3- ACQUISITION DES BMR EN NEONATOLOGIE

#### 3-1. Analyse univariée

Le tableau 23 présente les risques relatifs d'acquisition de BMR selon les données cliniques maternelles, obstétricales et néonatales de la population de néonatalogie.

**Tableau 23:** facteurs de risque d'acquisition des BMR (Bactéries multi-résistantes) dans la population de néonatalogie.

	RR	IC (95%)	p
<u>Facteurs maternels:</u>			
- gestité	1,469	1,035- 2,085	<b>0,0320</b>
- portage en SB	-	-	0,9619
- ATB grossesse	0,615	0,071- 5,309	0,6603
<u>Facteurs obstétricaux:</u>			
- RPDE>12h	0,803	0,151- 4,267	0,7981
- mode d'acct			
. cesar vs VB	0,770	0,128- 4,631	0,7764
. VBI vs VB	4,342	0,390- 48, 371	0,2349
- AB accouchement	0,843	0,095- 7,454	0,8762
- Couleur LA (teinté ou méconial vs clair)	9,431	1,053- 84,267	<b>0,0459</b>
<u>Facteurs néonataux:</u>			
- AG	1,015	0,961- 1,972	0,6125
- PN	1,001	0,999- 1,002	0,3940
- Hypotrophie	0,304	0,036- 2,552	0,2752
- Type de lait:			
. maternel	-	-	0,9473
. hydrolysé	0,484	0,056- 4,244	0,9445
. lait pour prématuré	-	-	0,5181

La gestité paraît être un facteur de risque d'acquisition de BMR. A chaque grossesse supplémentaire, le risque relatif pour l'enfant à naître d'être contaminé par une BMR augmente de 1,5 environ (1,035- 2,085) (p= 0,0320).

Le liquide amniotique teinté ou méconial paraît être un facteur de risque de colonisation digestive par des BMR avec une augmentation de risque relatif de 9,431 (1,053- 84,267) ( $p= 0,0459$ ). Un seul patient avait un liquide teinté à la naissance, et il a été colonisé secondairement par une BMR.

Ne sont pas significatifs entre autres:

- L'antibiothérapie maternelle pendant la grossesse ou à l'accouchement.
- Une RPDE > 12h.
- La prématurité et le petit poids de naissance.
- Le type d'allaitement, notamment l'allaitement maternel.

### 3-2. Analyse multivariée

Aucun facteur de risque n'est significatif en analyse multivariée.

## 4. BGN, BMR ET INTEGRONS

Le tableau 18 regroupe l'ensemble des germes retrouvés en culture et leur association avec le portage en intégrons et en BMR. Aucune bactérie n'a d'association significative avec le portage en BMR lorsque l'on compare nos 2 populations.

Les résultats suivants sont présentés en cumulant le nombre total de bactéries isolées par espèce, qu'elle que soit l'origine du prélèvement.

### 4-1. Lien entre acquisition des BGN et portage en BMR

Le tableau 24 présente les principales bactéries isolées en culture et leur association statistique au portage de multirésistances.

**Tableau 24:** association entre colonisation en BGN et portage en BMR.

	BMR+	p
<i>E.Coli</i>	9	<b>0,0001</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,3693
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-
<i>Pantoea spp.</i>	-	-

Ce tableau regroupe les BGN les plus fréquemment isolés dans notre étude. Parmi ces germes, seulement *E.coli* et *Enterobacter cloacae* sont associés à la présence de BMR (BLSE ou céphalosporinase dérégulée). *E.coli* est fortement liée au portage en BMR ( $p=0,0001$ ). *Enterobacter cloacae* n'est pas associée à l'acquisition des BMR recherchées.

#### 4-2. Lien entre colonisation digestive à *E. coli* intégron+ et acquisition de multirésistances.

Le tableau 25 présente le lien entre les *E. coli* porteuses d'intégrons isolées dans notre étude et l'acquisition de BMR telles que définies auparavant.

**Tableau 25:** Lien entre les *E. coli* porteuses d'intégrons et l'acquisition de multirésistances (BLSE, céphalosporinase dérégulée).

	BMR+	BMR-	p
<i>E. coli</i> int+	2	31	0,6487
<i>E. coli</i> int -	6	208	

Le portage en intégrons par les *E. coli* n'est pas statistiquement associé à une acquisition de multi-résistances (BLSE, céphalosporinase dérégulée).

#### 4-3. Lien entre portage en intégrons et BMR

Le tableau 26 présente le lien entre le portage en intégrons tous BGN confondus avec l'acquisition des multirésistances pré-citées.

**Tableau 26:** Association entre l'acquisition de BMR et le portage en intégrons, tout NN confondu.

	BMR+	BMR-	p
INTEGRON +	3	31	
INTEGRON -	7	195	0,07

Il n'existe pas de lien significatif dans notre étude entre le portage en intégrons et la colonisation des NN en BMR.

## V- DISCUSSION

Les études précédentes menées par l'équipe de bactériologie INSERM du CHU de Limoges avaient mis en évidence un taux de colonisation par des bactéries porteuses d'intégrons de près de 60% chez les patients hospitalisés en réanimation et chez le personnel des cantines du CHU. Dans ces conditions et compte tenu de l'absence de données chez le NN, un nombre d'enfant de 250 en maternité et de 50 en néonatalogie a été défini a priori. A posteriori, après analyse de nos résultats avec un taux de colonisation de 12% (22/188) en maternité et de 23 % (11/48) en néonatalogie il apparaît, qu'au delà de ce premier résultat brut, les effectifs puissent être insuffisants pour étudier les facteurs déterminant cette colonisation.

Cependant les études rapportant l'établissement du microbiote chez le NN portent habituellement sur de faibles effectifs. Campeotto et al [53] comparent 10 NN alimentés au sein à 10 NN nourris artificiellement et 2 groupes de 7 NN traités ou non par ATB. L'étude de Jacquot portant sur l'établissement de la flore chez le prématuré a un effectif de 29 enfants [46]. Dans la revue de K. Orrhage, parmi les 9 études portant sur l'établissement du microbiote les 3 premières semaines de vie, l'effectif maximum est de 30 NN [6].

Aucune donnée n'existait dans la littérature sur l'acquisition des intégrons chez le NN et encore moins sur l'établissement d'une dynamique d'acquisition. Nous comparons ici nos résultats cinétiques d'acquisition des intégrons ainsi que les cultures bactériennes avec les séquences connues d'établissement du microbiote chez le NN.

Aucun portage en intégron n'est retrouvé sur les prélèvements à J0, qu'il s'agisse de la population de maternité ou de néonatalogie. Ceci est en accord avec les données existantes sur l'établissement de la flore intestinale du NN [1]: le tube digestif du NN est stérile *in utero* et se colonise dès les premières heures de vie. C'est dans le cas des RPDE prolongées que le NN peut être colonisé avant l'extraction. Dans notre étude, les NN avec IMF probable par RPDE >12 h ne sont pas non plus colonisés à J0 en intégrons.

Par contre, la recherche des intégrons est basée sur une technique moléculaire présentant un seuil de détection. Ces seuils de détection ont été déterminés pour des prélèvements de type Adulte [52]. Les adultes portent  $1.10^{12}$  bactéries par gramme de selle [1, 2]. Ce niveau de colonisation n'est atteint chez l'enfant que vers l'âge de 2-3 ans. On peut faire l'hypothèse que les BGN porteurs d'intégrons sont moins nombreux chez l'enfant au début de la colonisation digestive que chez l'adulte. Or nous avons utilisé les mêmes seuils de détection quantitatifs au niveau des PCR, pouvant être à l'origine de résultats négatifs au moins dans les premiers jours de colonisation.

C'est au cours de la première semaine de vie que s'établit une flore riche et dominante, construisant des interactions complexes avec son hôte, et qui restera pour chaque individu originale et déterminante [12]. Dans la revue de Orrhage, les bactéries prédominantes dans les premiers jours de vie sont les entérobactéries, les entérocoques et les staphylocoques [6]. Dès J1, 100% des enfants sont colonisés par les 2 premiers, 83% pour le dernier avec des taux largement dominant des entérobactéries et des entérocoques ( $1.10^9$ ) par rapport au staphylocoque ( $1.10^{4,8}$ ). Cette colonisation précoce par les BGN est retrouvée dans notre étude avec des taux de BGN présentant une cinétique positive notamment dans la première semaine de vie (tableau 16): écouvillons-méconium ( $p=0,0164$ ), méconium-J7 ( $p<0,0001$ ), J7-J14 ( $p=0,0311$ ). Le résultat est superposable à la cinétique d'acquisition des intégrons avec une dynamique positive d'acquisition: alors que les écouvillons étaient tous négatifs, 1% des méconium sont positifs en maternité et 8,3% en néonatalogie puis 12% en maternité et 19,5% en néonatalogie pour les selles.

Cependant, les résultats bactériologiques représentés sur les figures 3 et 4 montrent une stagnation voire une régression de l'acquisition d'intégrons vers J6-J7 en maternité et à la fin du premier mois de vie en néonatalogie. A la fin de la première semaine, la flore est déjà bien diversifiée avec une diminution des bactéries aéro-anaérobies au profit des bactéries anaérobies entre autres [2, 6]. Ainsi, les bifidobactéries, lactobacilles et autres *Bacteroides*, indétectables à la naissance, atteignent des taux voisins des bactéries aéro-anaérobies initiales. Cette tendance se retrouve sur nos cultures de BGN dont les portages bactériens augmentent significativement durant les 2 premières semaines puis s'estompent sur les 15 jours

suivants. Un effet progressif de dilution de la copoflore et de diversification pourrait expliquer une dynamique d'acquisition des intégrons négative sur les derniers prélèvements de nos 2 populations. Il est par contre décrit chez les populations de prématurés un retard à la colonisation bactérienne ainsi qu'une pauvreté dans la diversité de la flore digestive [17, 46]. Les taux bactériens de bactéries anaérobies normalement atteints à J4 dans une population de NN à terme, allaités au sein seront atteints à J19 dans une population de prématurés de moins de 33 SA [4, 6]. Dans notre courbe de cinétique de la population de néonatalogie, l'acquisition des intégrons paraît évoluer en parallèle de cette dynamique bactérienne avec une prévalence de portage maximale atteinte dans la troisième semaine de suivi.

Mise à part la cinétique d'acquisition des intégrons, les populations de néonatalogie et maternité se distinguent sur le plan bactérien par plusieurs points.

Le retard à la colonisation en néonatalogie[4] se retrouve au niveau des cultures bactériennes: A J7 de vie, 81,3% des prélèvements sont positifs en culture BGN en maternité contre 64,8% en néonatalogie.

A délais de prélèvement égal, c'est à dire pour le méconium et la selle de J7, la prévalence des intégrons est initialement supérieure en néonatalogie (1% et 8,3%) puis l'effet s'estompe 28/225 (12%) en maternité et 7/54 (12,9%) en néonatalogie. Le NN prématuré naît souvent dans des conditions favorisant la modification de la colonisation bactérienne initiale: rupture prolongée de la poche des eaux, antibioprophylaxies maternelles, extractions par césarienne... [17]. Ces facteurs initiaux divergents entre les 2 populations pourraient expliquer cette différence. L'AG était de 39 SA+2j (36- 42+2) en maternité et 34SA+1 j (31+5- 40+3) en néonatalogie. L'AG n'est pas associé à un risque de portage en intégron dans notre population de néonatalogie.

Enfin, Neut et al. décrivent un rattrapage avant un mois de vie du taux de bifidobactéries et de la diversité de la flore en cas d'allaitement maternel [23]. Dans notre population de néonatalogie, 27/48 (56,3%) des NN avaient bénéficié d'un allaitement maternel. Cet élément entre autres, pourrait expliquer l'équilibre observé à J7 dans le portage en intégrons des 2 populations.

On note également des divergences entre nos 2 populations au niveau des cultures bactériennes avec des *E. coli* plus présentes en maternité 43% vs 27% ( $p < 0,0001$ ) alors que *K. Oxytoca* est plus présente en néonatalogie 2,2% vs 5,6% ( $p = 0,0336$ ) et *Serratia marcescens* n'est retrouvée que en néonatalogie. Ces résultats correspondent à ce qui a été décrit précédemment avec une diminution du taux de lactobacilles chez les prématurés au profit de bactéries pathogènes comme *E. coli* et surtout *Klebsiella* [21, 37]. En parallèle, il est décrit une diminution de la diversité de la flore chez le prématuré, qui semble être retrouvée dans notre étude avec un nombre supérieur de types de germes en maternité (15/17 vs 11/17). Mais cette différence n'était pas significative.

Le lien entre *E.coli* et intégrons avait été rapporté par D. Chainier dans son étude concernant la recherche d'intégrons chez l'homme, l'animal et dans les effluents. Elle retrouvait que sur l'ensemble des *E. coli* isolés, 23,7% portaient des intégrons. Quarante-huit pour-cent des *E. coli* porteuses présentaient un profil de résistance contre 20,3% seulement chez les *E. coli* non porteuses. Notre étude retrouve une association statistique significative entre les intégrons et *E. coli* ( $p < 0,001$ ). Les *E. coli* dominent largement la flore BGN des NN. Les *Klebsiella Pneumoniae* sont la deuxième population bactérienne porteuse d'intégrons la plus représentée dans notre étude. Les intégrons de type 1 sont en effet souvent retrouvés chez ces bactéries [50].

Le modèle "parfait" d'établissement de la flore intestinale du NN est le NN à terme, né à la maison et allaité au sein [38], favorisant un portage massif et prolongé en Bifidobactéries. Tout élément étranger à ce mode de naissance modifie l'établissement du microbiote, favorisant les germes potentiellement pathogènes (*E. coli*, *Klebsiella*, *Clostridium*), au dépend des bifidobactéries bénéfiques correspondant à la colonisation du tube digestif chez le NN[1, 2, 54]

Le mode d'accouchement a été décrit comme influençant la colonisation bactérienne du NN. La césarienne augmente particulièrement la colonisation par les germes de l'environnement (*Klebsiella*) par le personnel soignant et l'environnement (air,

surfaces) au dépens de la colonisation par les flores cervicales et fécales maternelles. Elle va également s'accompagner d'un retard de colonisation des germes anaérobies stricts (bifidobactéries, *Bacteroides*, lactobacilles) [6, 22]. Dans notre étude, 126/188 (66%) NN sont nés par voie basse et 44/188 (23,2%) par césarienne à la maternité, alors que 22/48 (45,8%) NN sont nés par voie basse et 22/48 (45,8%) par césarienne en néonatalogie. Soit une proportion largement augmentée des extractions par césarienne dans la population de néonatalogie. Ce résultat est concordant avec la colonisation importante en *Klebsiella* de la population de néonatalogie dans notre étude.

Le mode d'accouchement par VBi est lié à un risque d'acquisition des intégrons en maternité: RR=4,6 (1,4-15,2) p=0,01257. La VBi était relevante du fait des conditions d'asepsie qui l'entourent et de l'utilisation de matériel étranger. De plus, elle constitue une manoeuvre pouvant inoculer des bactéries de l'environnement, de manière rétrograde, dans le col de l'utérus. Ce résultat ne concerne que la population de maternité, il n'est pas retrouvé en néonatalogie. Ce facteur n'est pas non plus lié à un risque supplémentaire d'acquisition de BMR, qui aurait pu évoquer dans ce cas là une infection d'origine manuportée. Le recours à des instruments pour aider une voie basse a souvent lieu lors d'accouchements difficiles, avec rupture prolongée de la poche des eaux ou fièvre ou altérations du rythme foetal. Ce critère seul du recours aux instruments ne paraît pas signifiant et n'a pas été décrit dans la littérature comme influent sur l'établissement du microbiote.

Le mode d'allaitement est souvent corrélé à des modifications de la microflore intestinale. Dans notre étude, 136/188 (72,3%) des NN de maternité ont eu du lait de leur maman en SDN et 52/188 (27,6%) n'ont reçu que du LA en salle de naissance, 27/48 (56,3%) des NN de néonatalogie ont eu du lait de leur maman dont 2 seulement dès J0 et 21/48 (43,7%) ont eu du lait artificiel seul en néonatalogie. Dans certaines études, l'allaitement artificiel induit une diversification supérieure de la flore par rapport à l'allaitement maternel (entérobactéries, entérocoque, *Clostridium* [53]) mais cette diversité se fait au dépens des bactéries essentielles comme les Bifidobactéries[27-29]. Schwiertz décrivait une diversification de la flore par l'allaitement maternel chez les prématures hospitalisés [45]. Ni en maternité ni en néonatalogie, l'allaitement artificiel ne favorise la colonisation en intégrons.

L'influence de l'environnement du NN dans les premiers jours de vie sur l'établissement du microbiote a été étudié par Bennet qui comparait les germes présents dans les fécès de NN de maternité et d'USIN [39]. Il retrouvait que de manière indépendante au mode d'accouchement, le germe pathogène *Klebsiella* était plus fréquent en USIN par rapport à la maternité où les enfants étaient plutôt colonisés par *E. coli*. Notre résultat des cultures de BGN avec 175 (43%) *E. coli* en maternité pour 72 (27%) *E. coli* en néonatalogie ( $p < 0,0001$ ) et 9 (2,2%) *Klebsiella* en maternité pour 15 (5,6%) en néonatalogie ( $p = 0,0336$ ) est en accord avec cette étude. L'environnement semblait jouer un rôle également sur le portage en intégrons qui est plus élevé en néonatalogie (23% de portage contre 12% en maternité). Par contre, les différences entre maternité et néonatalogie à J0-J1 de vie (méconium), respectivement 1% et 8,3% de portage, s'estompent au cours de la première semaine avec 12% et 12,9%, réduisant la part d'influence du milieu sur les différences observées.

Dans notre étude, la durée moyenne de RPDE était de 6 heures (0-180) en maternité, 47 heures (0-600) en néonatalogie. Soit une RPDE > 12h chez 26/188 (13,8%) mamans en maternité et 16/42 (38%) mamans en néonatalogie. Or, la rupture prolongée de la poche des eaux est un facteur de risque d'IMF par ascension des germes de la coprofloire et de la flore vaginale maternelle dans les membranes foetales. Elle fait l'objet de recommandations par l'ANAES à partir de 2 études, celle de Kenyon pour la Cochrane Library en 2001 et l'étude multicentrique ORACLE II portant sur 4826 femmes avec RPM < 37SA sans signe infectieux patent [55, 56]. L'antibiothérapie maternelle en cas de RPM avant le terme est recommandée car elle diminue la mortalité périnatale, les infections néonatales et prolonge la durée de la grossesse. Dans notre étude, il n'existait pas d'association statistique avec le portage en intégrons ni l'acquisition de BMR.

L'incidence des IMF est comprise entre 1,2 et 3,6 pour mille naissances vivantes. Les 2 principales bactéries sont *Streptococcus agalactiae* et *E. coli* avec des fréquences respectives comprises entre 38 et 58%, et 16 et 23%.

Le portage vaginal du SB est recherché par prélèvements vaginaux réalisés au cours du troisième trimestre de grossesse [30]. La mise en évidence par culture d'un

portage vaginal en SB s'accompagne d'une antibioprofylaxie par amoxicilline 2g en début de travail +1g/6h et à l'accouchement (ou clindamycine et érythromycine en cas d'allergie aux pénicillines) [33]. Cette antibioprofylaxie a permis de réduire l'incidence des infections materno-foetales au SB 2/1000 enfants, sans traitement [33, 57], à 0,47/1000 enfants [57], avec traitement. Le portage maternel du SB dans notre étude est de 21/188 (11,1%) en maternité et 6/48 (14%) en néonatalogie, soit des taux de portages plus faibles que dans les publications.

Il a été décrit en parallèle une augmentation des sepsis néonataux précoces à germes autres que le SB (majoritairement BGN) et des sepsis néonataux à BMR. Cette tendance n'est pas retrouvée dans toutes les études. Elle est particulièrement décrite chez les prématurés et les petits poids de naissance [35]. La majorité des gènes portés par des cassettes d'intégrons confèrent des résistances aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides [50], antibiotiques les plus utilisés pour les infections de la grossesse, dans l'antibioprofylaxie du portage maternel au SB et dans l'antibiothérapie néonatale des IMF.

Dans notre étude, le portage en SB favorise l'acquisition d'intégrons chez le NN de maternité RR=1,370 [(1,09-1,73), p=0,0079] mais pas chez le NN de néonatalogie (peut être du fait de l'effectif réduit de cette population). Ce résultat nous a amené à rechercher un lien avec l'antibiothérapie maternelle. L'antibiothérapie maternelle pendant la grossesse concernait 47/188 (25%) femmes en maternité et 13/42 (30,9%) en néonatalogie. L'antibioprofylaxie de l'IMF per-partum concernait 38/188 (20%) en maternité, 8/42 (16%) en néonatalogie. L'antibiothérapie maternelle, qu'elle soit pendant la grossesse ou à l'accouchement n'influence pas le portage en intégrons. Elle ne peut donc pas expliquer le lien entre portage du SB et acquisition d'intégrons.

Dans notre étude, le portage vaginal en SB n'est pas non plus associé à une augmentation du risque relatif de colonisation en BMR dans la population de maternité (p=0,9647). Il n'est pas non plus associé à une augmentation du risque de portage en BMR dans la population de néonatalogie (p=0,9619). Cependant les intégrons chez les NNs sont un évènement rare et il faudrait une cohorte de taille supérieure pour éliminer ce lien de manière formelle.

Une étude s'était penchée plus spécifiquement sur les modifications de la microflore intestinale néonatale induites par une antibioprofylaxie maternelle par amoxicilline [32]. L'étude concernait 50 enfants de maternité. Dans le premier groupe, les mères avaient reçu des antibiotiques, dans la deuxième moitié, elles n'en avaient pas reçu. On ne remarquait pas de différence significative qualitative ni quantitative dans la colonisation des NN par les entérobactéries, les entérocoques, les staphylocoques, les bactéries du genre *Bacteroides* et *Bifidobacterium*. Par contre elle retrouvait chez les prématures une augmentation des sepsis à *E. coli* ou à des germes multi-résistants. Une autre étude recherchait les effets de l'amoxicilline versus cefuroxime en traitement néonatal, sur la colonisation digestive bactérienne et retrouvait une prévalence augmentée des germes *Klebsiella pneumoniae* et *E.coli* dans le groupe traité par amoxicilline et une augmentation du nombre d'infections sévères (92% vs 63%) [36]. Dans notre population, aucun enfant de maternité n'a reçu d'antibiotiques en période néonatale, 14/48 (29%) NN ont bénéficié d'une antibiothérapie au cours de leur hospitalisation, dont 8/14 (57%) dès J0 et 8/14 (57%) de plus de 48 heures. Aucun enfant n'a présenté d'infection sévère ou à germe multirésistant. Aucun enfant n'a présenté d'ECUN. L'antibiothérapie néonatale n'était pas non plus corrélée à un risque augmenté de portage en intégrons ( $p=0,7710$ ).

La fièvre maternelle supérieure à 38°C à l'accouchement est un autre facteur associé à un risque augmenté d'IMF [34]. Dans notre étude, 8/188 (4,2%) mamans ont été fébriles à l'accouchement dans la population de maternité, et 1/42 (2%) en néonatalogie. Cette fièvre n'avait pas de lien statistique avec un risque augmenté de portage en intégrons.

Le liquide amniotique teinté ou méconial fait parti des critères associés à une suspicion d'IMF [34]. Dans notre population, 19/188 (10%) des liquides étaient colorés en maternité et 1/42 (2%) en néonatalogie. Nous n'avons pas trouvé de lien statistique avec le portage en intégrons.

Le nombre de grossesses de la maman est associé à un risque augmenté de colonisation néonatale en intégrons dans la population de maternité ( $p= 0,01856$ ). Le nombre d'accouchements ne l'est pas (non écrit), ni l'âge maternel ( $p=0,2728$ ).

Aucune donnée dans la littérature n'a été retrouvée concernant la modification de la colonisation digestive du NN selon la gestité de sa mère. Aucune non plus ne concerne la modification de la flore périnéale avec le nombre de grossesses. Ce résultat n'est pas retrouvé dans la population de néonatalogie. Il pourrait être dû à un biais que nous n'avons pas retrouvé.

Dans notre étude, aucun critère de jugement n'est significatif pour l'acquisition de BMR. Même les facteurs décrits dans la littérature comme étant à risque de colonisation par les BMR chez le prématuré [37] n'ont pas été retrouvés.

Les intégrons sont décrits comme des systèmes de transport et d'échange de cassettes renfermant des gènes dont certains codent pour des résistances aux antibiotiques[50]. Le lien entre le portage en intégron et l'acquisition en BMR a été démontré dans l'étude de D. Chainier. Sur 995 *E. coli* isolées au total, 23,7% contenaient des intégrons. Parmi les souches contenant des intégrons, 97% avaient un profil de multirésistance (au moins 2 résistances antibiotiques) contre seulement 20,3% des *E. coli* sans intégron. Cependant, il n'était pas trouvé de différence dans le portage en intégrons entre les adultes sains et les adultes patients de réanimation et soumis à des pressions de sélection antibiotique. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux germes BLSE et céphalosporinase dérégulée. Les bactéries ayant acquis moins de résistances aux pénicillines ou des résistances à d'autres familles antibiotiques n'étaient pas étudiées. On retrouvait une association entre *E.coli* et les intégrons significative [42/247 (17%),  $p < 0,0001$ ]. Parmi les souches de *E. coli* contenant des intégrons, 2/33 (6%) étaient multirésistants contre 6/208 (2,8%) des *E.coli* sans intégrons, avec une différence non significative entre les deux ( $p=0,6487$ ).

Notre étude avait pour objectif principal de rechercher l'existence ou non d'un portage en intégrons chez le NN puis d'en établir une dynamique d'acquisition. Elle n'a pas du tout comporté d'analyse de prélèvements maternels. Or, il est établi que la colonisation initiale du tube digestif du NN se fait au départ, à partir des flores maternelles vaginales et surtout fécales [1, 5, 39]. Une étude avait été réalisée en 1989 et cherchait justement à comparer par l'étude des plasmides, les selles des NN à

J10 et J30 aux flores maternelles cervicales et fécales. Cette étude, portant sur 5 couples mère-bébé, confirmait la colonisation princeps du tube digestif du NN par les *Enterobacteriaceae* (3/5) et les bifidobactéries (2/5) rectales. Par contre les lactobacilles et bifidobactéries vaginales n'étaient pas retrouvées (0/5). Elle montrait ainsi la stabilité des plasmides malgré les différentes étapes de transport et de conservation avant l'analyse des extraits et la filiation exacte des bactéries retrouvées pour chaque couple mère/bébé. Cette étude ouvre la possibilité pour approfondir nos résultats et comparer dans une autre étude les résultats en intégrons de type 1 et 2 des NN à des prélèvements réalisés chez la mère afin d'analyser l'acquisition néonatale des intégrons par couple mère/bébé.

Les bifidobactéries, bactéries commensales et protectrices dans l'établissement de la microflore intestinale du NN n'ont pas été recherchées dans notre étude. De nombreuses études s'attachent à démontrer un rôle protecteur de ces bactéries dans la survenue des ECUN des NN, en particulier prématures mais ces indications restent du domaine de la recherche et n'ont pas concerné les NN de notre étude. La consommation maternelle en probiotiques n'est pas associée à un effet bénéfique sur la flore du NN. Nous n'avons pas recherché une telle consommation chez nos mamans, ce qui pourrait s'avérer être un facteur confondant dans nos résultats. En effet, une étude décrit l'effet inhibiteur de certaines bifidobactéries sur le transfert de résistances aux antibiotiques chez les entérobactéries [20, 21]. Or les entérobactéries sont les principaux germes porteurs d'intégrons et les intégrons sont des transporteurs, entre autre, de gènes de résistances aux  $\beta$ -lactamines. La relation entre consommation de bifidobactéries exogènes et portage en intégrons n'a pas été étudiée chez l'adulte à ce jour, encore moins chez les NN. Seuls les liens avec la survenue d'ECUN et l'acquisition de multirésistance ont été étudiés [20, 46, 58, 59].

Le prématuré est la première victime de l'entérococolite ulcéro-nécrosante (ECUN). Il s'agit d'une nécrose multifocale et extensive du grêle et/ou du côlon, constituée de plages ischémiques et hémorragiques à point de départ muqueux, responsable d'ulcérations voire de perforations digestives et pouvant se compliquer d'une pneumatose (infiltration gazeuse dans la sous-muqueuse et/ou la sous-séreuse et/ou les vaisseaux portes). Il s'agit de la plus fréquente des urgences digestives médico-chirurgicales néonatales. Elle concerne 1 NN sur 3000 naissances vivantes et sa

fréquence est 100 fois supérieure chez le prématuré que chez l'enfant à terme. L'analyse du microbiote du NN à terme et du prématuré a permis de connaître certains facteurs favorisant la survenue d'ECUN. Le germe le plus souvent mis en cause dans les ECUN est le *Clostridium*, un germe présent dans l'environnement et dont la prolifération serait favorisée entre autres par l'antibiothérapie périnatale (maternelle et du NN) accompagnant les naissances prématurées. En outre, les bactéries colonisant ces enfants sont plus fréquemment résistantes aux antibiotiques (entérobactéries multi-résistantes, staphylocoques méticillino-résistants), ceci étant lié à la pression de sélection dans les unités de soins intensifs néonataux (USIN). Aucune ECUN n'est survenue durant notre étude.

Au final, les intégrons sont décrits comme des éléments bactériens anciens, dont l'existence précède celle des antibiotiques et de leur utilisation massive par l'homme [50]. Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de facteur attaché à une augmentation de colonisation par des bactéries porteuses d'intégron. Notamment, ils n'étaient pas influencés par la pression de sélection AB durant les 9 mois de grossesse ni en période périnatale. Cependant, le portage en intégrons des mères pourrait être estimé à 60% chez les mamans, issues de la population générale. Douze pour-cent des NN sont porteurs d'intégrons dans la première semaine de vie et 23% dans le premier mois de vie (double en trois semaines). On peut alors s'interroger sur les facteurs qui vont influencer l'acquisition par 40% de la population, initialement saine d'intégrons au cours de leur vie: Des années et des années de pression AB au cours de la vie? Des échanges et transmissions bactériennes au cours de la vie? Une acquisition rapide dans les 2-3 premières années de vie qui permettent d'aboutir à une flore digestive proche de celle de l'adulte? Les intégrons seraient un énorme réservoir de défense bactérienne qui est hébergé par l'homme dès sa naissance et dont la contamination augmente au cours de la vie.

## **VI- CONCLUSION**

Cette étude a montré qu'il existe un portage néonatal en intégron. Ces intégrons, absents à J0-J1, apparaissent dans la première semaine de vie, simultanément à l'acquisition des BGN. Ensuite, les résultats sont moins francs quand à une réelle dynamique qualitative ni quantitative d'acquisition des intégrons dans le temps. Il semblerait plus que le portage digestif des intégrons bactériens chez les NN puisse répondre à un effet "on-off", loi du tout-ou-rien, car malgré certaines hospitalisations prolongées, les enfants n'ont majoritairement pas acquis d'intégrons après leur première semaine de vie. La prévalence des intégrons à J7 de vie était équilibrée entre nos deux populations.

Seul le portage maternel vaginal du SB présentait un risque significatif RR= 2,776 [IC95% (1,029-7,486) p=0,04481] sans que les autres facteurs de risque d'IMF ne soient associés à un sur-risque de portage néonatal en intégrons.

Les données bactériennes montraient en parallèle une colonisation en BGN de nos deux populations qui correspondait aux données de la littérature. La colonisation par des BMR était retrouvée pour un petit groupe de NN de maternité (0,6%) et de néonatalogie (3%) avec une différence significative au dépend de la néonatalogie. Aucun des facteurs testé n'était significativement à risque. Le lien entre le portage en intégrons et l'acquisition de multirésistances BLSE et céphalosporinase déréprimée n'était pas non plus significatif.

L'ensemble de ces résultats s'accorde avec le fait que les intégrons sont des éléments génétiques anciens et dont l'existence précède la découverte et l'utilisation des antibiotiques. Ce sont des éléments génétiques stables dans le temps, non obligatoires à la survie bactérienne et lui conférant des outils de survie face aux pressions de sélection environnementales. Ainsi, l'antibiothérapie durant la grossesse ou périnatale n'a pas eu d'effet sur l'acquisition ou la prolifération de bactéries porteuses d'intégrons.

Ce travail n'était cependant qu'un travail préliminaire d'une durée limitée et sur un petit échantillon. L'évènement "portage digestif en intégron chez le NN" est un évènement rare qui nécessiterait des cohortes plus importantes pour obtenir des résultats vraiment significatifs.

## VII- RESUME ET MOTS CLES

Introduction: L'établissement du microbiote chez le NN a déjà fait l'objet de multiples études et reste difficile à explorer. Les intégrons sont des éléments génétiques de capture et d'expression de gènes impliqués dans les phénomènes de multirésistance. Nous décrivons l'acquisition des intégrons chez le NN au cours du premier mois de vie.

Matériel et méthode: Tous les NN de plus de 32 SA de maternité et de néonatalogie étaient inclus. Les méconiums étaient prélevés ainsi que la selle de sortie en maternité et une selle hebdomadaire en néonatalogie. Les données cliniques étaient obtenues sur les dossiers médicaux et l'interrogatoire maternel. Les intégrons étaient recherchés par PCR quantitative (Miapro®) sur extractions d'ADN obtenu à partir d'extraits et sur souches.

Résultats: 236 NN ont été inclus, 188 en maternité et 48 en néonatalogie. La prévalence des intégrons était respectivement de 12 et de 23% dans les populations de maternité et néonatalogie. La Gestité et le portage en SB maternels, l'accouchement par voie basse instrumentale étaient des facteurs significatifs de portage en intégrons à la maternité. Aucun facteur de risque n'était significatif en néonatalogie.

Discussion: Les NN sont vierges d'intégrons à la naissance. Ils les acquièrent dès la première semaine de vie, simultanément à la colonisation par les BGN du tractus digestif. Ils ne sont pas influencés par la pression de sélection antibiotique. Leur acquisition augmente peu avec le temps. Des études sur de plus grandes cohortes sont nécessaires pour asseoir ces hypothèses. Le parallèle avec le portage maternel reste à établir.

**MOTS CLES:** microbiote, néonatal, intégrons, multirésistance, antibiotique.

## VIII- ABSTRACT AND KEY WORDS

Objective To determine the integrons dynamics of acquisition and its relationship with gut flora dynamics and early-onset infections factors.

Study design Prospective, monocentric study enrolling 236 patients, 188 healthy full-term infants and 48 from neonatal care unit. Integrons from stools collected at birth and once a week until the check-out were identified by quantitative multiplex real-time PCR.

Results None of the newborns carries integrons at birth. At least, 12% of the maternity hospital newborns and 23% of the neonatal care unit were colonised with integron-containing Gram-negative bacteria with a global increasing prevalence.

Key words: microflora, neonate, stool, integrons, antibiotic resistance.

## IX- BIBLIOGRAPHIE

1. Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Doucet-Populaire F, Kalach N, Dupont C, Butel MJ. [Establishment of the intestinal microflora in neonates]. *Gastroenterol Clin Biol* 2007;31:533-542;
2. J-C. Rambaud J-PB, G. Corthier, B. Flourié. Flore microbienne intestinale, physiologie et pathologie digestives. John Libbey Eurotext, Paris 2004, 247 p.
3. Freter R. Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 1974;27:1409-1416.
4. Rouge C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A *et al.* Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*;16:362-370;
5. Brook I, Barrett CT, Brinkman CR, 3rd, Martin WJ, Finegold SM. Aerobic and anaerobic bacterial flora of the maternal cervix and newborn gastric fluid and conjunctiva: a prospective study. *Pediatrics* 1979;63:451-455.
6. Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88:47-57.
7. Butel MJ, Roland N, Hibert A, Popot F, Favre A, Tessedre AC *et al.* Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis in gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J Med Microbiol* 1998;47:391-399.
8. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE *et al.* *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res* 2003;54:8-14;
9. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291:881-884;
10. Hoskins LC, Boulding ET. Degradation of blood group antigens in human colon ecosystems. II. A gene interaction in man that affects the fecal population density of certain enteric bacteria. *J Clin Invest* 1976;57:74-82;
11. Brandtzaeg P. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1996;778:1-27.
12. Langhendries JP. [Early bacterial colonisation of the intestine: why it matters?]. *Arch Pediatr* 2006;13:1526-1534;
13. Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, MacDonald TT. Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:271-285;
14. Filipp D, Alizadeh-Khiavi K, Richardson C, Palma A, Paredes N, Takeuchi O *et al.* Soluble CD14 enriched in colostrum and milk induces B cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:603-608;
15. Jones CA, Holloway JA, Popplewell EJ, Diaper ND, Holloway JW, Vance GH *et al.* Reduced soluble CD14 levels in amniotic fluid and breast milk are associated with the subsequent development of atopy, eczema, or both. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:858-866;
16. Delneste Y, Donnet-Hughes A, Schiffrin EJ. Functional foods: mechanisms of action on immunocompetent cells. *Nutr Rev* 1998;56:S93-98.
17. Westerbeek EA, van den Berg A, Lafeber HN, Knol J, Fetter WP, van Elburg RM. The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clin Nutr* 2006;25:361-368;

18. Ferraris L, Butel MJ, Aires J. Antimicrobial susceptibility and resistance determinants of *Clostridium butyricum* isolates from preterm infants. *Int J Antimicrob Agents*;36:420-423;
19. Lapillonne A, Campeotto F, Dupont C. [Trophic feeding and maturation of the gastrointestinal tract of the preterm infant]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2004;33:S127-128;
20. Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:38-44;
21. Moubareck C, Lecso M, Pinloche E, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Inhibitory impact of bifidobacteria on the transfer of beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae in the gnotobiotic mouse digestive tract. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:855-860;
22. Bennet R, Nord CE. Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection* 1987;15:332-336.
23. Neut C, Bezirtzoglou E, Romond C, Beerens H, Delcroix M, Noel AM. Bacterial colonization of the large intestine in newborns delivered by cesarean section. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1987;266:330-337.
24. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child* 1990;65:185-188.
25. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:19-25.
26. Sheard NF, Walker WA. The role of breast milk in the development of the gastrointestinal tract. *Nutr Rev* 1988;46:1-8.
27. Kleessen B, Bunke H, Tovar K, Noack J, Sawatzki G. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr* 1995;84:1347-1356.
28. Chierici R, Sawatzki G, Thurl S, Tovar K, Vigi V. Experimental milk formulae with reduced protein content and desialylated milk proteins: influence on the faecal flora and the growth of term newborn infants. *Acta Paediatr* 1997;86:557-563.
29. Coppa GV, Bruni S, Morelli L, Soldi S, Gabrielli O. The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:S80-83;
30. Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 2002;51:1-22.
31. Jaureguy F, Carton M, Teboul J, Butel MJ, Panel P, Ghnassia JC *et al.* [Risk factors and screening strategy for group B streptococcal colonization in pregnant women: results of a prospective study]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2003;32:132-138;
32. Jaureguy F, Carton M, Panel P, Foucaud P, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Effects of intrapartum penicillin prophylaxis on intestinal bacterial colonization in infants. *J Clin Microbiol* 2004;42:5184-5188;
33. Edwards RK, Clark P, Duff P. Intrapartum antibiotic prophylaxis 2: positive predictive value of antenatal group B streptococci cultures and antibiotic susceptibility of clinical isolates. *Obstet Gynecol* 2002;100:540-544;
34. ANAES. Prévention antenatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. recommandations pour la pratique clinique septembre 2001:3 p.

35. Moore MR, Schrag SJ, Schuchat A. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:201-213;
36. Kalenic S, Francetic I, Polak J, Zele-Starcevic L, Bencic Z. Impact of ampicillin and cefuroxime on bacterial colonization and infection in patients on a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 1993;23:35-41.
37. Bonnemaïson E, Lanotte P, Cantagrel S, Thionois S, Quentin R, Chamboux C *et al.* Comparison of fecal flora following administration of two antibiotic protocols for suspected maternofetal infection. *Biol Neonate* 2003;84:304-310;
38. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118:511-521;
39. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis* 1986;5:533-539.
40. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;80:F167-173.
41. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr* 1985;144:186-190.
42. Rotimi VO, Olowe SA, Ahmed I. The development of bacterial flora of premature neonates. *J Hyg (Lond)* 1985;94:309-318.
43. Stark PL, Lee A. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *J Hyg (Lond)* 1982;89:59-67.
44. Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, Bishop RF, Campbell NT, Gillam GL. Development of gut colonisation in pre-term neonates. *J Med Microbiol* 1982;15:519-529.
45. Schwiertz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 2003;54:393-399;
46. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E *et al.* Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr*;158:390-396;
47. Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6043-6048;
48. Bennet R, Eriksson M, Tafari N, Nord CE. Intestinal bacteria of newborn Ethiopian infants in relation to antibiotic treatment and colonisation by potentially pathogenic gram-negative bacteria. *Scand J Infect Dis* 1991;23:63-69.
49. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989;3:1669-1683.
50. Ploy M.-C. GA, Chainier D., Denis F. Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. *immuno-analyse et biologie spécialisée* 20;343-352 2005.

51. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:608-620;
52. Barraud O, Baclet MC, Denis F, Ploy MC. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J Antimicrob Chemother*;65:1642-1645;
53. Campeotto F, Garnier F, Kalach N, Soulaines P, Dupont C, Raymond J. [A routine prospective survey process to detect nosocomial bacterial colonization in a neonatal unit: risk factors for acquisition]. *Arch Pediatr* 2004;11:1314-1318;
54. Groupe d'études en néonatalogie- Ile de France. Y. Aujard EB, C. Boithias, Ph. Jarreau, J. Raymond. *Infections néonatales primitives bactériennes et mycosiques*. Ed par Laboratoires Guigoz Editions 20, 2005, 505p Séminaire guigoz (20; 2005; Deauville).
55. Kenyon S, Boulvain M. Antibiotics for preterm premature rupture of membranes. *Cochrane Database Syst Rev* 2000:CD001058;
56. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W. Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomised trial. ORACLE Collaborative Group. *Lancet* 2001;357:989-994;
57. Velaphi S, Siegel JD, Wendel GD, Jr., Cushion N, Eid WM, Sanchez PJ. Early-onset group B streptococcal infection after a combined maternal and neonatal group B streptococcal chemoprophylaxis strategy. *Pediatrics* 2003;111:541-547.
58. Catala I, Butel MJ, Bensaada M, Popot F, Tessedre AC, Rimbault A *et al*. Oligofructose contributes to the protective role of bifidobacteria in experimental necrotising enterocolitis in quails. *J Med Microbiol* 1999;48:89-94.
59. Rouge C, Piloquet H, Butel MJ, Berger B, Rochat F, Ferraris L *et al*. Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1828-1835;

## **X- INDEX DES TABLEAUX**

**Tableau 1:** nombre de gènes de résistance aux antibiotiques par famille d'antibiotique, portés par des cassettes

**Tableau 2:** données anthropométriques de la population de maternité.

**Tableau 3:** Données anthropométriques de la population de néonatalogie.

**Tableau 4:** données maternelles et obstétricales des deux groupes de population

**Tableau 5:** répartition des intégrons de type 1 (int1) et 2 (int2) dans nos deux populations de maternité et néonatalogie.

**Tableau 6:** Acquisition en nombre absolu et pourcentage (%) de prélèvements positifs des Intégrons selon le type de prélèvement.

**Tableau 7:** caractéristiques cliniques des enfants porteurs d'intégrons de type 1 ou 2 dans la population de maternité. (tableau sur 2 pages)

**Tableau 8:** caractéristiques cliniques des enfants porteurs d'intégrons de type 1 et 2 en néonatalogie.

**Tableau 9:** Cinétique quantitative d'acquisition des intégrons de type 1 et 2 dans la population de néonatalogie sur extraction directe de selle

**Tableau 10:** Evaluation des facteurs supposés à risque de favoriser le portage en intégrons en maternité

**Tableau 11:** Facteurs de risque significatifs d'acquisition des intégrons de multirésistance dans la population de maternité

**Tableau 12:** Analyse univariée des facteurs maternels, obstétricaux et néonataux supposés influencer le mode d'acquisition des intégrons de multirésistance

**Tableau 13:** analyse multivariée des facteurs potentiellement à risque ( $p < 0,2$ ) d'acquisition des intégrons en analyse univariée

**Tableau 14:** les principaux BGN retrouvés en culture sur gélose Drigalski avant extraction d'AND

**Tableau 15:** nombre de BGN par type de prélèvement et par population.

**Tableau 16:** prévalence de la colonisation digestive en BGN sur 4 semaines de suivi de la population de néonatalogie.

**Tableau 17:** nombre moyen de BGN par enfant dans chaque population.

**Tableau 18:** association entre le portage en BGN, intégrons et BMR dans les 2 populations étudiées et indice de significativité de la différence entre les 2 populations calculé par test de Khi-2.

**Tableau 19:** corrélation entre la colonisation en BGN et le portage en intégrons

**Tableau 20:** test de Khi-2 appliqué au portage en BMR dans les deux populations

**Tableau 21:** Acquisition des BMR en néonatalogie et maternité. BLSE= Betalactamase à spectre étendu.

**Tableau 22:** Facteurs de risque d'acquisition des BMR dans la population de maternité

**Tableau 23:** facteurs de risque d'acquisition des BMR (Bactéries multi-résistantes) dans la population de néonatalogie

**Tableau 24:** association entre colonisation en BGN et portage en BMR.

**Tableau 25:** Lien entre les *E. coli* porteuses d'intégrons et l'acquisition de multirésistances (BLSE, céphalosporinase dérégulée).

**Tableau 26:** Association entre l'acquisition de BMR et le portage en intégrons, tout NN confondu

## **XI- INDEX DES FIGURES**

**Figure 1:** Mécanisme d'intégration de cassettes au sein de l'intégron. (D'après M-C Ploy [50])

**Figure 2:** répartition des extractions d'ADN positives en int1 et int2 cumulés, selon le type de prélèvement; écouvillon, méconium, selle

**Figure 3:** Cinétique d'acquisition des intégrons de multirésistance de type 1 et 2 dans la population de maternité

**Figure 4:** Cinétique d'acquisition des Intégrons en néonatalogie

**Figure 5:** courbe de régression logistique de Kaplan-Meier

**Figure 6:** La courbe de survie de Kaplan-Meier illustre la diminution de la survie sans portage en intégrons avec le nombre de voies basses instrumentales par rapport aux deux autres modes d'accouchement en maternité

## XII- ANNEXES

### Annexe 1: avis favorable du comité d'éthique



**CHU LIMOGES**  
**Commission Médicale d'Etablissement**

#### **Comité d'Ethique**

Président : Docteur Gérard TERRIER

---

**Avis 51-2010-09 :**

Demande d'avis du Comité d'Ethique pour une étude :

*«Analyse cinétique du portage digestif d'intégrons de résistance aux antibiotiques chez les nouveau-nés de maternité et néonatalogie»* dont l'investigateur principal est le Docteur A. BEDU, service de Pédiatrie - Néonatalogie, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Limoges en collaboration avec Madame M. PEYRE, Interne de spécialité, service de Pédiatrie, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Limoges.

L'objectif principal de cette recherche est d'étudier de manière exhaustive les selles des nouveau-nés de maternité et de néonatalogie, initialement stériles puis rapidement colonisées au cours des premiers jours de vie afin d'y rechercher l'apparition éventuelle des intégrons comme premiers marqueurs de résistance bactérienne.

Le projet est exposé par Madame M. PEYRE et le Docteur A. BEDU qui, après avoir répondu aux questions, se retirent.

Le Comité d'Ethique délibère et rend l'avis suivant à l'unanimité des membres présents :

**Le Comité d'Ethique réuni le 16 septembre 2010 émet un avis favorable pour l'étude intitulée :**

*«Analyse cinétique du portage digestif d'intégrons de résistance aux antibiotiques chez les nouveau-nés de maternité et néonatalogie»* dont l'investigateur principal est le Docteur A. BEDU, service de Pédiatrie - Néonatalogie, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Limoges en collaboration avec Madame M. PEYRE, Interne de spécialité, service de Pédiatrie, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU de Limoges.

**Avis émis en Comité d'Ethique du 16 septembre 2010.**

---

Secrétariat : **Caroline TAURON**  
05 55 05 86 14 (poste : 58 614)  
(Service d'accompagnement et de soins palliatifs)

Annexe 2: lettre d'un papa pleine d'humour.

David FARINA  
2 rue Beaumarchais  
87100 LIMOGES

Limoges, le 9 décembre 2010

Docteur,

Vous me semblez bien dans le bren d'avoir paumé notre consentement pour les analyses du caca de notre bébé. Mais chacun sa m\*\*\*\* ! Pour ma part, ça me ferait ch\*\*\*\* de remplir de la paperasse inutilement. Vous dites que les prélèvements de selle et les analyses sont déjà faits. Alors, votre demande d'autorisation a posteriori, je m'en torche le c\*\*\*\* !

Faites ce qu'il vous plaira des excréments de mon enfant : des analyses pour votre thèse, de l'alimentation pour coprophage, du compost pour l'agriculture bio, peu m'importe. Mon intention n'est pas de vous em\*\*\*\*. D'ailleurs, au cas où vous auriez également perdu l'échantillon de matière fécale provenant de mon fils, vous trouverez au verso de cette lettre quelques traces toutes fraîches recueillies dans la ch\*\*\*\* de sa couche d'aujourd'hui.

Pardonnez la scatologie de mon courrier, ainsi que l'humour douteux de ma dernière blague (en vérité, rien n'est collé au dos de la page !); mais retenez ceci pour votre future carrière que je vous souhaite longue et réussie : Accordez aux personnes elles-mêmes autant, voire davantage de respect qu'aux données personnelles. Ma petite expérience m'invite à penser que c'est tout le contraire qui se produit à l'hôpital mère enfant de Limoges, et c'est bien dommage.

Très cordialement,  
David FARINA.



P.J quand même : Notice d'information signée

### **XIII- GLOSSAIRE**

AB= antibiotique

ADN= acide désoxyribonucléique

AG (SA)= âge gestationnel en semaines d'aménorrhée

ARN= acide ribonucléique

ARNm= ARN messager

ARNr= ARN ribosomal

BGN= bacille Gram négatif

BGP= bacille Gram positif

BLSE= beta-lactamase à spectre étendu

CPA= cellule présentatrice d'antigène

ECUN= entérocolite ulcéro-nécrosante

*E. coli*= *Escherichia coli*

GALT= gut associated lymphoid tissue

MHC2= système d'immunocompatibilité de type 2

NN= nouveau-né

PCR= réaction de polymérisation en chaine

USIN= unité de soins intensifs néonataux

RPDE= rupture de la poche des eaux.

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.