

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N° :

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Par : - Zerrouki Omama

- Zebda soundesse

Intitulé

**Enquête sur les facteurs influençant le
microbiote intestinale du nouveau-né**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. Chérif. K	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. Boubekeur. H	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. Benazi. N	Institut Pasteur M'sila	Co-rapporteur
Dr. Dehimi. K	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2024 /2025

Dédicace 1

بحمد الله وتوفيقه، أضع بين أيديكم هذا العمل المتواضع، ثمرة تعبٍ وسهرٍ، وجهدٍ ما كان له أن يكتمل لولا

عناية الله التي أحاطت بي في كل خطوة.

إلى أمي الحبيبة،

إلى قلبها الذي لم يكفّ عن الدعاء لي في السرّ والعلن،

إلى سجدها التي كانت تسبق خطواتي، وكلماتها التي كانت بلسم تعبي...

يا من كانت دعواتك سبباً في ثباتي، ورضاك زادي في الطريق،

لك أهدي هذا الإنجاز.

إلى أبي العزيز،

سندي الأول وظهر الأيام، من دعمني بكلماته واحتواني بصمته وفعله،

إلى من منحني الأمان والثقة، وعلمني أن الإرادة تصنع المستحيل،

هذا العمل ثمرة تعبك وصبرك أيضاً.

إلى إخوتي الذين كانوا النور في كل لحظة تعبتُ فيها،

بضحكتهم، بكلماتهم، وحتى بصمتهم... وجودكم خفف عني الكثير.

وإلى أصدقائي، خاصة من تابعوني على الفيسبوك،

كل من قرأ كلماتي التي كنت أكتبها وقت التعب،

كل من علّق، شجع، دعى لي، وصدق في تمنياته لي بالتوفيق،

كنتم وقود الحماس في طريقي، ولولاكم وبعد توفيق من الله لما كان لهذا الإنجاز هذا الطعم الجميل.

لكم جميعاً، من القلب، أهدي هذه المذكرة... بكل فخر وامتنان . "زُوقني أمانة"

Ddédicace 2

بحمد الله، وبنعمته التي لا تُعدّ ولا تُحصى، أقدم هذا العمل المتواضع، حصيلة أيامٍ من الاجتهاد، وليالي من التعب والأمل، وقد كان لرحمة الله وكرمه اليد الأولى في أن أصل إلى هذه اللحظة.

إلى أمي الحبيبة،

...رفيقة الروح، وملاذي في كل ضعف

إليك يا من زرعتِ القوة في قلبي بكلمة، والطمأنينة في طريقي بدعوة،

...يا من كان رضاك نبراس طريقي، وشوقك سرّ اندفاعي

أهديك هذا العمل بامتنان لا تفيه الحروف

إلى أبي الغالي،

يا من كنتَ الجدار الذي أسندتُ عليه أحلامي،

بك تعلمت أن الصمت أحياناً أبلغ من الكلام، وأن الدعم قد يكون في نظرة،

...كل ما وصلت إليه كان بفضل ظلك الذي لم يغيب

لكّ مني هذا الإنجاز، عربون حبّ واعتراف

إلى من شاركوني الدرب،

إخوتي، انفال و اروى ومريم ... الذين كانوا الرفقة في التعب، والسند في لحظات الانكسار،

إلى أصدقائي، وخاصة سليمة ..الذين بثّت كلماتهم فيّ الحماس كلما خفت،

...لكل من آمن بي حين شككت، وضحك معي حين تعبت

لكم جميعاً، أهدي هذه المذكورة، بحبٍ لا يُقال، بل يُشعر "زبدة سندس"

Remerciement

Nous remercions tout d'abord Dieu, le Tout-Puissant, pour son aide et son soutien qui nous ont permis de mener à bien ce travail commun.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadrante, Dr. Boubekour Hafssa et Dr. Benazi Nabil, pour son soutien constant, ses conseils précieux, et sa patience tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Son expertise et ses orientations ont grandement contribué à la réussite de notre recherche.

Nous remercions également l'ensemble des enseignants du département de Microbiologie et Biochimie pour les connaissances et le soutien qu'ils nous ont apportés durant notre parcours universitaire.

Enfin, nous n'oublions pas de remercier le personnel administratif pour leur collaboration et leur facilitation de toutes les démarches qui ont aidé à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Résumé	i
Liste des abréviations	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux	v
Introduction	1
Chapitre I. Le microbiote intestinal	2
I.1. Définition et composition du microbiote intestinal	2
I.1.1. Définition du microbiote	2
I.1.2. Principales espèces microbiennes	3
I.1.3. Répartition du microbiote dans l'intestin	4
I.2. Historique et évolution des connaissances	5
I.3. Physiologie du microbiote chez l'homme	7
I.3.1. Fonctions métaboliques	7
I.3.2. Production de vitamines et digestion	9
I.4. Déséquilibres microbiens et implications physiopathologiques	10
I.4.1. Concept de dysbiose à travers le microbiote intestinal	10
I.4.2. Pathologies associées	11
Chapitre II. Le microbiome chez le nouveau-né	12
II.1. Généralité	12
II.2. Modalités d'acquisition initiale du microbiome (in utero, accouchement)	13
II.3. Rôle de l'allaitement maternel	14
II.4. Influence du mode d'accouchement :	16
II.5. Facteurs microbiens et environnementaux influençant la colonisation néonatale	19
II.6. Importance précoce du microbiome pour la santé	20
II.7. Perturbations précoces et conséquences possibles	22
II.7.1. Traitement antibiotique périnatal et microbiote intestinal néonatal	22

II.7.2. Âge gestationnel	27
II.8. Lien possible avec les maladies ultérieures	28
II.8.1. Asthme et respiration sifflante atopique	28
II.8.2. Entérocolite nécrosante.....	29
Chapitre III. Les techniques d'analyse du microbiote – des méthodes classiques aux approches moléculaires avancées.....	30
III.1. Les méthodes classiques.....	30
III.1.1. Culture bactérienne	30
III.1.2. Coloration de Gram.....	30
III.1.3. Tests biochimiques.....	31
III.2. Les méthodes immunologiques	32
III.2.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	32
III.2.2. Immunofluorescence	33
III.2.3. Cytométrie en flux.....	34
III.3. Les méthodes moléculaires avancées	35
III.3.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)	35
III.3.2. Séquençage du gène 16S rRNA	35
III.4. Les avantages de chaque technique.....	36
III.4.1. Méthodes classiques.....	36
III.4.2. Méthodes immunologiques	36
III.4.3. Méthodes moléculaire	37
Chapitre IV. Étude du microbiome à travers une enquête	38
IV.1. Objectif de l'enquête	38
IV.2. Méthodologie de l'enquête.....	38
IV.2.1. Type d'enquête.....	38
IV.2.2. Population cible.....	38
IV.2.3. Mode de collecte des données.....	39

IV.3. Analyse et interprétation des résultats	39
IV.3.1. Répartition des participantes selon l'âge	39
IV.3.2. Répartition des participantes selon le lieu de résidence.....	40
IV.3.3. Répartition des participantes selon la présence des maladies chroniques	42
IV.3.4. Répartition des types de maladies chroniques dans les participantes	43
IV.3.5. Répartition des types d'accouchement.....	44
IV.3.6. Répartition des types la Durée de la grossesse	46
IV.3.7. Utilisation des antibiotiques pendant la grossesse	48
IV.3.8. Répartition des mères selon le trimestre d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse.....	49
IV.3.9. Répartition des accouchements selon le lieu.....	50
IV.3.10. Répartition des mères selon la durée de l'allaitement maternel.....	52
IV.3.11. Répartition des mères selon la raison de l'introduction du lait infantile	53
IV.3.12. Répartition des nourrissons selon la présence d'allergies chez les bébé	54
IV.3.13. Répartition des types d'allergies observées chez les bébé.....	56
Conclusion.....	58
Références bibliographiques	60

ملخص

يُعد الميكروبيوم المعوي لحدِيثي الولادة عنصرًا رئيسيًا في تطور الجهاز المناعي، والتمثيل الغذائي، وحتى النمو العصبي للطفل. وتتأثر تركيبته منذ لحظة الولادة بعوامل عديدة في المرحلة المحيطة بها، مثل طريقة الولادة، والتعرض للمضادات الحيوية، ونوع التغذية، وكذا البيئة المباشرة للرضيع.

تهدف هذه الدراسة الوصفية إلى استكشاف العلاقة بين بعض العوامل المرتبطة بالأم والوليد وتطور الميكروبيوم المعوي لدى المولود الجديد. ومن خلال استبيان منظم استهدف عينة من 60 أمًا، جُمعت معطيات سريرية وتغذوية وتوليدية، مكنت من تحديد عناصر ترابط بين هذه المتغيرات وبعض الاضطرابات الصحية التي ظهرت لدى الأطفال، خصوصًا الأعراض التحسسية.

أظهرت النتائج التأثير الملحوظ لاستعمال المضادات الحيوية أثناء الحمل، ومدة الرضاعة الطبيعية، ومكان الولادة، على تشكّل الميكروبيوم المعوي. وتبرز هذه المعطيات أهمية تعزيز استراتيجيات الوقاية والتنظيف الصحي للأمهات من أجل المحافظة على هذا التوازن الميكروبي الحيوي منذ الأيام الأولى للحياة.

ختامًا، تؤكد هذه الدراسة على ضرورة متابعة مبكرة للميكروبيوم عند حديثي الولادة، وتكثيف الوعي بالممارسات الصحية السليمة في الفترة المحيطة بالولادة، من أجل تعزيز صحة الطفل على المدى القريب والبعيد.

الكلمات المفتاحية: الميكروبيوم، حديثو الولادة، الولادة، الرضاعة، المضادات الحيوية، اضطراب التوازن الميكروبي (dysbiose)، صحة الطفل.

Abstract

The neonatal gut microbiome is now recognized as a crucial player in the development of the infant's immune, metabolic, and neurological systems. Its composition is influenced from birth by various perinatal factors, including mode of delivery, antibiotic exposure, feeding practices, and the surrounding environment.

This descriptive study aimed to investigate the associations between maternal and neonatal factors and the early development of the gut microbiome. Data were collected through a structured questionnaire completed by 60 mothers, covering clinical, obstetrical, and nutritional aspects. The analysis identified correlations between these variables and certain health outcomes in newborns, particularly allergic manifestations.

Findings revealed the significant impact of antibiotic use during pregnancy, breastfeeding duration, and place of delivery on the establishment of a healthy gut microbiome. These results emphasize the importance of maternal education and preventive strategies to support microbiome balance during the critical neonatal period.

In conclusion, the study highlights the relevance of early microbiological monitoring and increased awareness of perinatal health practices to promote optimal infant health outcomes in both the short and long term.

Keywords: microbiome, newborn, delivery, breastfeeding, antibiotics, dysbiosis, infant health.

Résumé

Le microbiome intestinal du nouveau-né est aujourd'hui reconnu comme un acteur clé dans le développement immunitaire, métabolique et neurologique de l'enfant. Dès la naissance, sa composition est influencée par divers facteurs périnataux tels que le mode d'accouchement, l'exposition aux antibiotiques, le type d'alimentation, ainsi que l'environnement immédiat du nourrisson.

Ce travail s'inscrit dans une approche descriptive visant à explorer l'association entre certains facteurs maternels et néonataux et le développement du microbiote intestinal chez le nouveau-né. À travers un questionnaire structuré adressé à un échantillon de 60 mères, nous avons recueilli des données cliniques, obstétricales et nutritionnelles, permettant d'identifier des éléments de corrélation entre ces variables et certains troubles de santé observés chez les nourrissons, notamment les manifestations allergiques.

Les résultats obtenus montrent l'impact notable de l'utilisation des antibiotiques pendant la grossesse, de la durée de l'allaitement, et du lieu d'accouchement sur la mise en place du microbiote intestinal. Ces observations soulignent l'importance de stratégies de prévention et d'éducation maternelle pour préserver cet équilibre microbien essentiel dès les premiers jours de vie.

En conclusion, cette étude met en évidence l'intérêt d'un suivi microbiologique néonatal précoce et d'une sensibilisation accrue aux bonnes pratiques périnatales, en vue d'optimiser la santé infantile à court et à long terme.

Mots-clés : microbiome, nouveau-né, accouchement, allaitement, antibiotiques, dysbiose, santé infantile.

Liste des abréviations

- _ **NGS** : Séquençage de nouvelle génération
- _ **MGU** : Métagénomique à Grande échelle et Ultra-rapide
- _ **E. coli**: Escherichia coli
- _ **IFN**: Interféron
- _ **HPLC**: High-Performance Liquid Chromatograph
- _ **DOHaD** : Origines développementales de la santé et de la maladie
- _ **HMOs**: Human Milk Oligosaccharides
- _ **HDM**: Human Donor Milk
- _ **MOM** : Mother's Own Milk
- _ **CS** : Césarienne (naissance par césarienne)
- _ **AVB** : Accouchement par voie basse
- _ **DV** : Accouchement par voie basse
- _ **SGB** : Streptococcus du groupe B
- _ **PAI** : Prématurité Associée à l'Inflammation
- _ **APM** : Alimentation Parentérale Minimale
- _ **sVCAM-1** : soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- _ **sCD14**: soluble Cluster of Differentiation 14
- _ **sCD19**: soluble Cluster of Differentiation 19
- _ **sCD27**: soluble Cluster of Differentiation 27
- _ **IL-1RII** : Interleukine-1 Récepteur de type II
- _ **sVEGF-R1**: soluble Vascular Endothelial Growth Factor Récepteur 1
- _ **HSP70**: Heat Shock Protein 70
- _ **ITS1**: Internal Transcribed Spacer 1

Liste des figures

Figure I.2.1.Histoire de l'étude du microbiote.....	7
Figure II.1.1.Développement du microbiome au cours de la première année de vie. Les taxons et la diversité) fonctionnelle sont significativement influencés par le mode de naissance, la méthode d'alimentation, les types d'aliments de sevrage.	13
Figure II.3.1.Origine du microbiote du lait maternel. Le microbiote maternel ainsi que le microbiote exogène jouent un rôle important dans l'origine du microbiote du lait maternel, lequel influence ensuite le microbiote intestinal et la santé du nourrisson.	15
Figure II.3.2.Les composants du lait maternel peuvent façonner le développement du microbiome des nourrissons.	16
Figure II.6.1. Vue d'ensemble des facteurs environnementaux influençant le développement du microbiote néonatal et du système immunitaire muqueux.....	22
Figure II.7.1.Effets de l'antibiothérapie sur le microbiote intestinal du nouveau-né en fonction de l'âge post-menstruel (PMA). Dans la boîte bleue (conditions d'eubiose), les couleurs du graphique indiquent l'expression des espèces bactériennes concernées chez les enfants nés à terme et les prématurés en fonction de l'âge post-menstruel.	24
Figure III.2.1.Direct immunofluorescence.....	34
Figure IV.3.1.Diagramme en barre de la répartition par age.	40
Figure IV.3.2.Diagramme circulaire de la répartition des participantes selon la présence des maladies chroniques.	42
Figure IV.3.3.Diagramme en barre répartition des types de maladies chroniques dans les participantes.	43
Figure IV.3.4.Diagramme circulaire répartition des Type d'accouchement.....	45
Figure IV.3.5.Graphique à barres Répartition des types de la durée de la grossesse.....	46
Figure IV.3.6.Diagramme circulaire répartition des mères selon l'utilisation des antibiotiques au cours de la grossesse.	48
Figure IV.3.7.Graphique à barre répartition en pourcentage des trimestres d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse.....	49
Figure IV.3.8.Diagramme circulaire répartition en pourcentage du lieu d'accouchement.....	51
Figure IV.3.9.Répartition en barres des mères selon la raison de l'introduction du lait infantile.	53

Figure IV.3.10. Diagramme circulaire répartition des nourrissons selon la présence d'allergies chez les bébé.....55

Figure IV.3.11. Diagramme en barres répartition des types d'allergies observées chez les bébé. 56

Liste des tableaux

Tableau I.1.3.1. Diversité taxonomique des microorganismes représentatifs du microbiote indigène	5
Tableau I.3.1.1.Nutriments microbiens dans le côlon humain.....	8
Tableau IV.3.1.1.Répartition des mères selon la tranche d'age.	39
Tableau IV.3.3.1. Répartition des participantes selon la présence des maladies chroniques.....	42
Tableau IV.3.4.1. Répartition des types de maladies chroniques dans les participantes.	43
Tableau IV.3.5.1. Répartition des types d'accouchement.....	44
Tableau IV.3.6.1.Répartition des types de la durée de la grossesse.....	46
Tableau IV.3.7.1.Répartition des mères selon l'utilisation des antibioques pendant la grossesse.	48
Tableau IV.3.8.1.Répartition des mères selon le trimestre d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse.....	49
Tableau IV.3.9.1.Répartition des accouchement selon le lieu.	50
Tableau IV.3.10.1.Répartition des mères selon la durée de l'allaitement maternel.	52
Tableau IV.3.10.2.Diagramme circulaire répartition des mères selon la durée de l'allaitement maternel.....	52
Tableau IV.3.11.1. Répartition des mères selon la raison de l'introduction du lait infantile.....	53
Tableau IV.3.12.1. Répartition des nourrissons selon la présence d'allergies chez les bébé.	54
Tableau IV.3.13.1. Répartition des types d'allergies observées chez les bébé.....	56

Introduction

Introduction

Au cours des dernières décennies, l'intérêt scientifique pour l'étude des interactions complexes entre l'être humain et les micro-organismes vivant dans son corps n'a cessé de croître, en particulier ceux qui colonisent le tractus digestif et que l'on désigne aujourd'hui sous le terme de microbiome intestinal. Ces micro-organismes ne sont plus perçus comme de simples agents opportunistes, mais comme un véritable « organe invisible » jouant un rôle central dans la digestion, la régulation immunitaire, le développement neurologique, et pouvant être impliqués dans diverses pathologies comme le diabète, l'obésité ou les allergies.

Parmi les axes de recherche récents, le microbiome du nouveau-né suscite un intérêt croissant, car de nombreuses études montrent que sa composition se forme dès les premiers jours, voire les premières heures de vie, et qu'elle est influencée par de multiples facteurs : mode d'accouchement, type d'allaitement, environnement immédiat, utilisation d'antibiotiques, état de santé maternel, etc. Comprendre l'influence de ces facteurs est essentiel pour anticiper certains déséquilibres microbiens précoces aux conséquences potentiellement durables.

Dans ce contexte, notre étude vise à explorer cette thématique à travers une approche de terrain basée sur un questionnaire adressé aux mères de nouveau-nés. Ce questionnaire nous a permis de collecter des données relatives aux habitudes de vie, aux conditions de naissance, à l'alimentation, et à d'autres variables susceptibles d'impacter la composition du microbiome. L'analyse statistique de ces données vise à dégager des tendances et des corrélations à la lumière des connaissances théoriques actuelles. Dès lors, notre problématique se formule comme suit :

Quels sont les facteurs susceptibles d'influencer le développement du microbiome intestinal chez le nouveau-né, tels que révélés par les données d'un questionnaire de terrain ?

Pour y répondre, ce mémoire est structuré en deux grandes parties :

- Une partie théorique, qui présente les concepts clés liés au microbiome, ses fonctions, son évolution chez le nourrisson, ainsi qu'un état des lieux des recherches les plus récentes dans ce domaine.
- Une partie pratique, où nous exposons notre méthodologie, l'outil de collecte (le questionnaire), l'analyse des résultats obtenus.

Nous espérons que cette étude contribuera à enrichir la réflexion autour d'un sujet émergent en microbiologie appliquée, et qu'elle servira de base à de futures recherches plus approfondies, combinant données cliniques et analyses biologiques, au service de la santé néonatale.

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le microbiote intestinal

Chapitre I. Le microbiote intestinal

I.1. Définition et composition du microbiote intestinal

I.1.1. Définition du microbiote

Le microbiote de l'homme, qui compte approximativement 10^{14} bactéries, doit être complété par la présence de virus et de champignons, le tout constituant une masse d'environ un kilogramme. L'analyse et l'étude de ces bactéries intestinales montrent que seulement 20 % d'entre elles sont cultivables en utilisant les méthodes bactériologiques traditionnelles. Les avancées en matière d'analyse et la réduction ont permis de surmonter ces obstacles et de lancer des recherches à large échelle (Qin *et al.*, 2010). La première métaséquence du microbiome intestinal humain a été publiée, résultant de l'analyse des échantillons fécaux de 124 participants européens et de la caractérisation de plus de 3,3 millions de gènes provenant d'environ 1 000 espèces distinctes. On emploie les techniques suivantes : le processus d'amplification PCR des sections variables de l'ADN qui codent pour les ARN ribosomiques 16S, ainsi que le séquençage à grande échelle des ADN extraits d'échantillons fécaux (initiative METAHIT) (The Human Microbiome Project Consortium). On a regroupé les gènes identifiés en 741 unités métagénomiques (MGU), dont 85 % étaient auparavant inconnues. De plus, 257 génomes ont été reconstitués on a également caractérisé 6 640 petites MGU, correspondant à des phages ou des plasmides (Blottière *et al.*, 2013).

Le fœtus humain se développe dans un liquide amniotique stérile ; la colonisation initiale de son système digestif dépend du mode d'accouchement : par voie vaginale, le nourrisson est d'abord colonisé par des bactéries qui reflètent principalement la flore vaginale maternelle, tandis que ceux nés par césarienne acquièrent plutôt une flore d'origine cutanée. Cette différence dans le mode d'accouchement est associée à un microbiote intestinal moins diversifié et moins mature chez les bébés nés par césarienne jusqu'à un tiers de moins à l'âge d'un mois, avec notamment une diminution marquée des populations de bifidobactéries, de *Bacteroides fragilis* (El Kaoutari *et al.*, 2014).

Après six mois, les différences ne sont plus significatives. Ces disparités durant les six premiers mois de l'existence peuvent avoir des répercussions sur le système immunitaire et augmenter le risque d'apparition de diverses maladies (infections, allergies, diabète de type I, etc.). La flore bactérienne chez le nouveau-né se développe en fonction de divers facteurs tels que l'environnement (*Escherichia*, streptocoques), l'alimentation lactée (si le lait maternel est donné, on observe une augmentation des bifidobactéries et une réduction des bactéroïdes et coliformes, alors que ces trois espèces sont présentes en concentrations à peu près équivalentes dans les laits

industriels), le niveau d'hygiène de la mère, une éventuelle hospitalisation et les traitements médicaux administrés. Le sevrage représente une phase cruciale dans le développement du microbiote de l'enfant, car il marque l'introduction d'aliments variés (légumes, viandes, féculents) dans son régime alimentaire. À cette période, on considère que le microbiote est stabilisé et en équilibre entre la deuxième et la troisième année. Par la suite, ce dernier évolue chez chaque individu en fonction de divers éléments : patrimoine génétique de l'individu, alimentation, environnement... (Lagier *et al.*, 2012). Ainsi, les conditions de vie ont un impact significatif sur le microbiote ; la densité de ce dernier est par conséquent beaucoup moins importante chez les enfants nord-américains comparativement à celle des enfants africains (Yatsunenکو *et al.*, 2012).

I.1.2. Principales espèces microbiennes

L'écosystème intestinal est dynamique, et sa composition peut fluctuer considérablement au fil du temps (Costello *et al.*, 2013), en fonction des états physiopathologiques et/ou des modifications de l'alimentation. La grande variation de sa composition observée entre les individus rend notre compréhension de l'organisation et des rôles du microbiote particulièrement complexe (Koropatkin *et al.*, 2014).

Cependant, lorsque l'analyse se fait à un niveau taxonomique plus large, tel que le genre ou surtout le phylum (qui se situe entre le règne et la classe dans la classification biologique), la diversité du microbiote intestinal entre les individus semble moins significative. Les diverses études indiquent que parmi les 50 phylums bactériens identifiés, quatre se distinguent par leur prévalence et leur présence commune dans le microbiote intestinal distal : (1) Firmicutes : principalement les genres *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* et *Faecalibacterium* ; (2) Bacteroidetes : surtout *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas* ; (3) Actinobacteria (*Bifidobacteria*) ; et (4) Proteobacteria (*Escherichia*). Bien que ces principaux phylums soient presque omniprésents dans le microbiote, leurs proportions peuvent varier grandement d'un individu à l'autre. Une analyse menée sur un groupe de 242 volontaires américains en bonne santé, dans le contexte du projet de microbiome humain, révèle que la proportion des Firmicutes peut fluctuer de 90 % à moins de 10 % d'une personne à l'autre, tandis que celle des Bacteroidetes tend à varier dans le sens opposé (El Kaoutar *et al.*, 2014). Cela offre une perspective nuancée sur les conclusions de recherches qui semblent établir un lien entre des maladies telles que l'obésité et une diminution du nombre de Bacteroidetes dans le microbiote intestinal.

Finalement, compte tenu de la complexité et du caractère clos du microbiote en tant que système écologique, il apparaît que chaque interaction entre les microbes et l'hôte est marquée par une co-évolution constante influencée par divers événements survenant au cours de la vie de l'hôte (E.

Ley *et al.*, 2006). Chaque individu développe un microbiote unique en raison de ce processus de co-évolution.

Contrairement à l'abondante diversité taxonomique, la diversité fonctionnelle du microbiote intestinal est moins significative entre les individus. Cette ressemblance des profils fonctionnels du microbiote a facilité l'introduction de l'idée d'un microbiome fonctionnel central ou core microbiome au lieu d'un core microbiota (noyau phylogénétique) (Kurokawa *et al.*, 2007). Ce noyau fonctionnel est composé de groupes de gènes qui sont systématiquement présents en quantité similaire dans le microbiote de différents individus, malgré des profils taxonomiques distincts. L'existence d'un noyau fonctionnel s'accompagne d'une stabilité fonctionnelle probablement attribuable à la redondance fonctionnelle, où des dizaines, même des centaines, de gènes bactériens pourraient coder pour la même fonction (Turnbaugh et Gordon, 2009).

I.1.3. Répartition du microbiote dans l'intestin

L'intestin grêle : La proportion de streptocoques augmente dans le duodénum mais le microbiote reste rare (10^4 - 10^5) car le chyme gastrique est très acide, la bile est toxique pour de nombreux micro-organismes et le liquide pancréatique contient une série d'enzymes qui pourraient littéralement digérer le micro-organisme essayant de s'établir à cet endroit. Dans le jéjunum, la concentration bactérienne augmente et les lactobacilles et les streptocoques prédominent. Dans l'iléon, la concentration et la diversité des micro-organismes résidents augmentent rapidement et reflètent progressivement ce qui est présent dans le côlon (Margolles et Suárez, 2021).

Gros intestin : La densité et la diversité microbiennes sont énormes. L'acidité a pratiquement disparu, les composants toxiques de la bile ont été réabsorbés grâce à la circulation entéro-hépatique et surtout, le flux du contenu intestinal ralentit, ce qui favorise l'accumulation de micro-organismes (Sommer et Bäckhed, 2013). Le microbiote est dominé par les bactéries, mais on y trouve également des archées (responsables de la production de méthane), des levures du genre *Candida* et divers micro-organismes et divers protozoaires (principalement des amibes et des coccidies) (tableau 1). Parmi les embranchements bactériens, les plus abondants sont les Firmicutes (principalement de l'ordre des Clostridiales comme *Faecalibacterium prausnitzii*) et les Bacteroidetes (dont les principaux représentants sont *Bacteroides* et *Prevotella* comme principaux représentants). Ces deux groupes constituent environ 80 % de la communauté microbienne totale (40 % chacun). Les actinobactéries (représentées par *Bifidobacterium spp.*) peuvent représenter 10 % supplémentaires. Les groupes bactériens moins abondants comprennent les protéobactéries (principalement les *Enterobacteriaceae*) et les Verrucomicrobia (*Akkermansia muciniphila*), avec des concentrations inférieures à 3 % dans chaque cas (Margolles et Suárez, 2021).

Tableau I.1.3.1. Diversité taxonomique des microorganismes représentatifs du microbiote indigène (Margolles et Suárez, 2021)

Domaine	Le Royaume	Phylum	Classe	Exemple
Archaea	Archaea	A.II Euryarcheota	Méthanobactéries	Les méthanogènes intestinaux
Bacteria	Bacteria	B.XII. Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Escherichia</i> (colon)
			Epsilonproteobacteria	<i>Helicobacter</i> (estomac)
		B.XII. Firmicutes	Clostridia	<i>Lachnospira</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Roseburia</i> (colon)
			Bacilles	<i>Lactobacillus</i> (vagin, intestin grêle), <i>Staphylococcus</i> (peau), <i>Streptococcus</i> (bouche)
		B.XIV. Actinobactéries	Actinobactéries	<i>Bifidobacterium</i> (colon), <i>Propionibacterium</i> (peau, colon), <i>Corynebacterium</i> (peau), <i>Gardnerella</i> (vagin)
		B. XX. Bacteroidetes	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> (colon)
B. XXII. Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	<i>Akkermansia</i> (colon)		
Eucaryote	Protiste	Protozoaires	Rhizopode	<i>Amebas</i> commensales(bouche, intestin)
			Mastigophora	<i>Giardia</i> (duodénum)
	Champignons	Ascomycota	Saccharomycetes	<i>Candida</i> (vagin, bouche, colon)
		Basidiomycot	Exobasidiomycètes	<i>Malassezia</i> (peau)
	Animaux	Arthropode	Arachnida	<i>Demodex</i> (acariens de la peau)

I.2. Historique et évolution des connaissances

La première preuve scientifique que les microbes font partie du corps humain normal remonte au milieu des années 1880 (figure 1).

Le pédiatre autrichien Theodor Escherich a identifié une bactérie dans les intestins d'enfants en bonne santé et de ceux souffrant de diarrhée. Cette bactérie a ensuite été baptisée *Escherichia coli* (Shulman *et al.*, 2007). La découverte d'*E. coli* a jeté les bases de l'étude des micro-organismes intestinaux.

L'étude des micro-organismes intestinaux. Bientôt, *Veillonella parvula* (1898) (Veillon et Zuber, 1898) et les *bifidobactéries* (1899) (Tissier, 1899) ont également été isolées.

Les nombreux autres microbes ont été isolés des voies nasales, buccales, cutanées, gastro-intestinales et urogénitales et décrits comme faisant partie du microbiome humain.

En 1965, Dubos et al. ont publié des images microscopiques de tissus congelés dans l'estomac de rats, montrant de nombreuses bactéries en forme de bâtonnets ou de bulbes attachées à la muqueuse gastrique. Suggère leur importance et leur caractère irremplaçable. D'autres expériences sur des rats et des jeunes porcs ont montré que ces animaux ont également des niveaux élevés de bactéries lactiques dans leur tractus gastro-intestinal. Dubos pensait que certains composants de la flore gastro-intestinale étaient parvenus à une symbiose avec l'hôte au cours du processus d'évolution, ce qui était le cas pour les bactéries lactiques. L'hôte au cours de l'évolution, ce qui constitue la véritable flore endophyte. La découverte de Dubos a confirmé la présence de bactéries dans les organismes vivants et a incité à poursuivre les recherches sur les bactéries vivantes.

En 1992, Bocci a proposé pour la première fois que la microflore intestinale ait la même fonction métabolique que des organes virtuels, et l'a considérée comme « l'organe humain négligé ». Les chercheurs ont progressivement réalisé l'importance de la microflore intestinale dans son ensemble pour héberger le tractus intestinal. Bocci a souligné que les traces de lipopolysaccharide sécrétées par le microbiote pouvaient activer le système immunitaire et prévenir l'infection et le cancer des hôtes.

Un projet international, le Human Microbiome Project (HMP) (Lu, 2020), a été lancé en 2007. Ce projet visait à caractériser les micro-organismes et leur rôle dans le corps humain grâce à la récente technologie de séquençage du génome entier. Ce projet a permis de faire progresser considérablement la recherche sur le microbiote, puisque quelque 200 espèces bactériennes membres du microbiote ont été nouvellement identifiées au cours des trois premières années du projet. À ce jour, de plus en plus d'espèces de microbiote et leurs rôles dans la santé humaine sont découverts, et les connaissances sur le microbiote se développent rapidement.

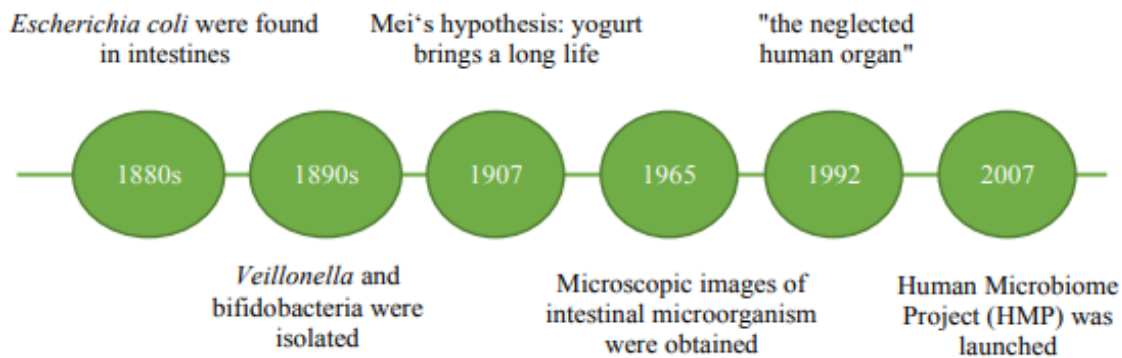


Figure I.2.1. Histoire de l'étude du microbiote (Lu, 2020).

I.3. Physiologie du microbiote chez l'homme

I.3.1. Fonctions métaboliques

Le microbiote intestinal tire son alimentation de plusieurs sources (tableau 1). Il s'agit notamment des composants alimentaires ingérés (glucides, protéines et lipides) et des composants dérivés de l'hôte, notamment les cellules épithéliales et le mucus. Le microbiote intestinal utilise ces substrats pour générer l'énergie nécessaire aux processus cellulaires et à la croissance. Au cours du processus d'utilisation de ces substrats, le microbiote produit plusieurs métabolites qui influencent la santé humaine et le métabolisme. La fermentation des glucides entraîne la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) qui sont utilisés par l'hôte (Ramakrishna et Roediger 1990). La fermentation des protéines donne lieu à des métabolites phénoliques qui peuvent exercer des effets délétères sur l'hôte (Windey *et al.*, 2012). L'intestin et le foie ont la capacité de détoxifier ces métabolites (Ramakrishna *et al.* 1989). Le microbiote intestinal synthétise également plusieurs molécules telles que la vitamine K et les constituants de la vitamine B (LeBlanc *et al.*, 2013). Certains d'entre eux peuvent contribuer directement à la nutrition humaine grâce à leur absorption au niveau de l'intestin.

Dans l'étude (Arumugam *et al.*, 2011) dans laquelle trois entérotypes du microbiote intestinal humain ont été identifiés, l'analyse des voies métaboliques a abouti à des conclusions intéressantes.

Elle suggère que les microbes de l'entérotype 1 tirent principalement leur énergie de la fermentation des hydrates de carbone et des protéines, car ils sont enrichis en gènes représentant les enzymes saccharolytiques, les galactosidases, les hexosaminidases, les protéases et les enzymes des voies de la glycolyse et du pentose phosphate. Les entérotypes 2 et 3 ont été considérés comme tirant leur énergie principalement de la dégradation des mucines, bien que le dernier ait

probablement aussi le potentiel d'utiliser des hydrates de carbone par fermentation en raison de la présence d'un nombre important d'espèces de Bacteroides.

L'entérotype 1 était enrichi en enzymes impliquées dans la biosynthèse de la biotine, de la riboflavine, du pantothénate et de l'ascorbate, tandis que l'entérotype 2 était enrichi en enzymes impliquées dans la biosynthèse de la thiamine et du folate. Les enzymes de dégradation de l'amidon augmentent avec l'âge, ce qui est cohérent avec l'évolution des habitudes alimentaires.

Tableau I.3.1.1. Nutriments microbiens dans le côlon humain (Ramakrishna, 2013)

Source	Nature	Composants	Quantité par jour (g)
Diététique	Amidon résistant (RS, résistant à la digestion par l'amylase)	RS de type 1 : granules d'amidon entourés d'une matrice végétale indigeste.	8–40
		Type 2 RS : sous forme naturelle d'amidon à haute teneur en amylose dans le maïs, le riz, etc.	
		Type 3 RS : amidons cristallisés obtenus par des procédés de cuisson et de refroidissement uniques.	
		Type 4 RS : amidon modifié chimiquement par estérification, réticulation ou transglycosylation.	
	Polysaccharides non amylacés	Celluloses	8–20
		Hémicelluloses	
		Gommes	
		Pectines	
	Sucres et alcools de sucre non absorbés	Lactose	2–10
		Fructose	
		Sorbitol	
		Lactitol	
	Oligosaccharides	Mannitol	2–8
		Maltitol	
		Xylitol	
		Fructooligosaccharides	
	Protéines	Raffinose	1–2
		Stachyose	
		Inuline	
		Polydextrose (utilisé dans l'industrie alimentaire)	
Sécrétions gastro-intestinales	Protéines	Chitines et sucres aminés	3–9
		Protéines alimentaires	
		Enzymes et protéines et peptides sécrétés, y compris les immunoglobulines, les peptides antimicrobiens, etc.	
	Glycoprotéines Multiple	Mucus	2–3
		Cellules épithéliales décollées	20–30

La quantité par jour indiquée dans la dernière colonne est la quantité totale approximative qui pénètre dans le côlon par jour pour chaque grande catégorie de nutriments spécifiée dans la colonne 2.

I.3.2. Production de vitamines et digestion

Bien que le séquençage et l'assemblage de génomes entiers aient été historiquement utilisés pour l'étude d'organismes uniques, des rapports récents ont montré la validité de cette approche pour étudier des communautés microbiennes mixtes (Backhed *et al.*, 2005). Dans ce contexte, l'échantillonnage des informations génétiques du microbiote intestinal humain, également connu sous le nom de microbiome intestinal humain, nous a permis de mieux comprendre les caractéristiques génétiques des bactéries entériques (Gill *et al.*, 2006). Afin de déterminer si et dans quelle mesure le microbiome entérique présente des caractéristiques physiologiques qui n'ont pas été développées par son hôte humain, le potentiel métabolique des séquences microbiennes a été analysé par la classification de tous les gènes microbiens identifiés sur la base de l'encyclopédie des gènes et des génomes de Kyoto et des groupes orthologues groupés (COG).

Ces analyses ont montré que le microbiome intestinal distal de deux sujets est enrichi d'une variété de COGs impliqués dans la synthèse d'acides aminés essentiels et de vitamines, tels que ceux nécessaires à la synthèse du désoxyxylulose 5-phosphate (DXP), un précurseur des vitamines thiamine et pyrodoxal (Gill *et al.*, 2006). Récemment, la combinaison de 22 métagénomés fécaux nouvellement séquencés provenant d'individus de quatre pays a permis d'identifier trois groupes robustes, appelés entérotypes, qui ne sont pas spécifiques à une nation ou à un continent. En particulier, les voies du métabolisme des vitamines sont fortement représentées dans tous les entérotypes, tandis que deux entérotypes sont particulièrement riches en gènes qui spécifient les enzymes biosynthétiques de la biotine, de la riboflavine et de l'acide folique pour la production de biotine, de riboflavine, de pantothénate, d'ascorbate, de thiamine et de folate. Ces différences phylogénétiques et fonctionnelles entre les entérotypes reflètent donc différentes combinaisons de chaînes trophiques microbiennes avec un impact probable sur les interrelations synergiques avec l'hôte humain (Arumugam *et al.*, 2011).

Récemment, des études transcriptomiques visant à explorer les gènes régulés des bifidobactéries résidant dans des échantillons fécaux de sujets adultes ont identifié la présence de gènes bifidobactériens censés être impliqués dans la biosynthèse de plusieurs vitamines B et du folate, qui sont fortement exprimés lorsque les bifidobactéries se trouvent dans leur niche écologique naturelle (Klaassens *et al.*, 2011). Étant donné qu'il est pratiquement impossible de quantifier ou de démontrer la production de vitamines par des organismes individuels du microbiome humain à l'aide de méthodes traditionnelles (par exemple, HPLC, tests microbiologiques), ces approches et peuvent fournir des preuves de cette production de vitamines *in situ*, tout en permettant le développement de méthodologies visant à augmenter leur production (Gosalbes *et al.*, 2011).

I.4. Déséquilibres microbiens et implications physiopathologiques

I.4.1. Concept de dysbiose à travers le microbiote intestinal

Levy *et al.* (2017) ont distingué trois types de dysbiose définis comme la « prolifération de pathobiontes, la perte de commensaux ou la perte de diversité », tandis que Vangay *et al.* (2015) ont distingué quatre types de dysbiose, à savoir « la perte de taxons clés, la perte de diversité, les changements dans la capacité métabolique ou la prolifération de pathogènes ». Les pathogènes sont définis ici comme des membres du microbiote commensal qui ont le potentiel de causer des pathologies (Chow et Mazmanian, 2010). De nombreuses définitions ont tenté d'établir un lien entre la dysbiose et la maladie, par exemple « la dysbiose est un changement dans la composition des communautés commensales résidentes par rapport à la communauté trouvée chez les individus sains » (Petersen et Round, 2014).

Une critique fondamentale sur l'utilisation du terme dysbiose a été formulée par Levy *et al.* (2017), qui ont observé qu'il ne suffit pas de comparer des individus malades avec une cohorte de contrôle sans maladie ; il faut en particulier des comparaisons entre différentes manifestations d'une même maladie. Cette demande permettrait d'obtenir un niveau d'association plus étroit sans toutefois résoudre entièrement le problème de la cause ou de la conséquence. Ces auteurs ont également appelé à des interprétations fonctionnelles plutôt que taxonomiques du microbiote dysbiotique et ont soulevé le point d'une forte dépendance contextuelle des observations.

En étudiant le lien entre la dysbiose pédiatrique et la maladie, Vangay *et al.* (2015) ont mentionné des facteurs de confusion importants qui doivent être pris en compte dans de telles analyses microbiote-maladie, comme la maturation temporelle du microbiote intestinal et la dépendance de la composition du microbiote sur le type d'accouchement (césarienne vs. Vaginale) (Chu *et al.*, 2017), sur le régime alimentaire (allaitement maternel vs Allaitement au biberon) et sur l'utilisation antérieure d'antibiotiques. Une description détaillée du microbiote intestinal des nourrissons tenant compte de ces facteurs a été fournie pour des nourrissons en bonne santé (Backhed *et al.*, 2015) et des États-Unis (Baumann-Dudenhoefter *et al.*, 2018). Une seule étude cas-témoins a documenté une association de maladie du microbiote, à savoir la malnutrition chez les enfants du Bangladesh, avec le développement de l'âge du microbiote en utilisant l'apprentissage automatique sur les données de séquence d'ARN 16S qui ont abouti à un « indice de maturité relative du microbiote ». Les auteurs ont constaté une immaturité relative du microbiote chez les enfants souffrant de malnutrition (Subramanian *et al.*, 2014).

I.4.2. Pathologies associées

On a récemment attribué la maladie de Crohn, une affection inflammatoire intestinale, à une modification du microbiote intestinal. On observe chez les patients une diminution significative des représentants du phylum Firmicutes dans leur microbiote, notamment de *Clostridium leptum* (Subramanian *et al.*, 2014) et *Faecalibacterium prausnitzii*, tant en termes de diversité que de densité (Sokol *et al.*, 2008). Toutefois, d'autres recherches de cohortes de patients atteints de la maladie de Crohn remettent en question cette association négative entre *F. prausnitzii* et la maladie de Crohn, suggérant plutôt une augmentation marquée de la présence de cette bactérie comparativement aux individus en bonne santé (Mukhopadhyaya *et al.*, 2015). En outre, on observerait une diminution de la prévalence du *F. prausnitzii* concomitante à l'amélioration clinique de ces patients (Jia *et al.*, 2010). Ces conclusions divergentes indiquent que les relations entre le microbiote et les maladies sont plus compliquées que la simple évaluation de la réduction ou l'accroissement de la présence d'une espèce bactérienne spécifique ou d'un ensemble particulier de bactéries.

Chapitre II : Le microbiome chez le nouveau-né

Chapitre II. Le microbiome chez le nouveau-né

II.1. Généralité

Pendant de nombreuses années, il a été admis que le microbiote du nouveau-né était stérile à la naissance, et que la colonisation ne débutait qu'après l'accouchement, via le microbiote environnemental, alimentaire et maternel (Martin *et al.*, 2016). Cependant, les avancées scientifiques récentes suggèrent que l'exposition microbienne pourrait commencer in utero, et que les premières bactéries coloniseraient déjà le fœtus avant même la naissance (Jiménez *et al.*, 2008).

À la naissance, ce microbiote initial est considéré comme un écosystème simple, qui évolue progressivement pour atteindre une grande diversité à l'âge adulte. Ce processus de maturation est influencé par plusieurs facteurs, tels que le patrimoine génétique de l'individu, l'âge gestationnel à la naissance, l'utilisation d'antibiotiques, le mode d'accouchement, le type d'alimentation, ainsi que les conditions environnementales. (Azad *et al.*, 2013).

Parmi les premiers déterminants, le mode d'accouchement joue un rôle clé. Les bébés nés par voie vaginale sont majoritairement colonisés par les bactéries vaginales et fécales de leur mère, tandis que ceux nés par césarienne sont d'abord exposés aux bactéries de l'environnement hospitalier et du personnel soignant. D'autres éléments tels que la prématurité, le niveau d'hygiène et le milieu de naissance influencent également la composition du microbiote intestinal néonatal (Penders *et al.*, 2006).

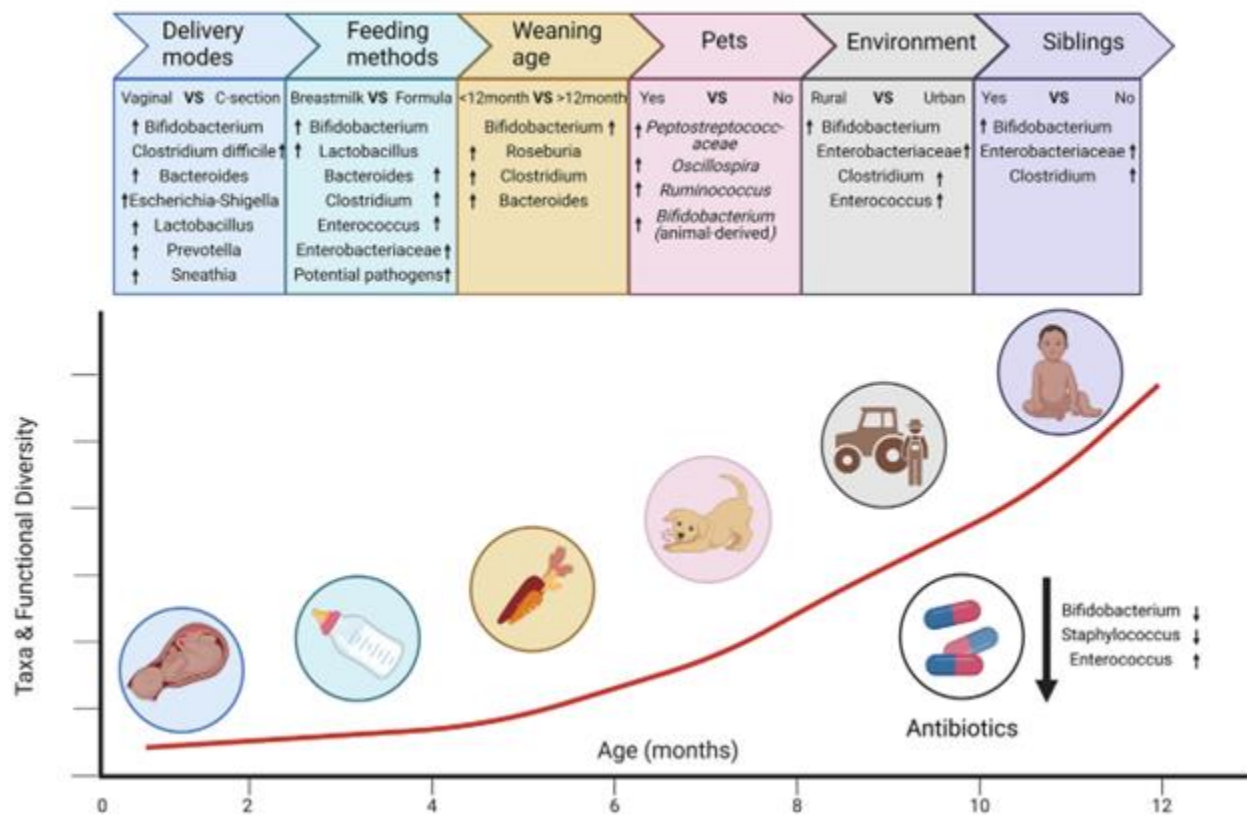


Figure II.1.1. Développement du microbiome au cours de la première année de vie. Les taxons et la diversité) fonctionnelle sont significativement influencés par le mode de naissance, la méthode d'alimentation, les types d'aliments de sevrage (Kim et al.,2025).

II.2. Modalités d'acquisition initiale du microbiome (in utero, accouchement)

L'intérêt croissant porté au microbiote intestinal découle de son rôle central dans plusieurs fonctions physiologiques essentielles, ainsi que de son implication dans diverses pathologies liées à un déséquilibre microbien. Cette prise de conscience a orienté les recherches vers la période néonatale, aujourd'hui reconnue comme déterminante dans l'établissement du microbiote.

La colonisation bactérienne du fœtus semble débuter au moment de la rupture des membranes, peu avant la naissance, et s'amplifie lors de l'accouchement, notamment par l'exposition aux microbiotes vaginal, fécal et cutané maternels, en fonction du mode d'accouchement. Ces premières communautés microbiennes pourraient jouer un rôle fondamental dans la santé à long terme de l'enfant et de la

mère. Les premières bactéries acquises influenceraient potentiellement l'expression génétique via des modifications épigénétiques, en lien avec le concept de DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), et participeraient à l'élaboration de fonctions clés telles que la maturation du système immunitaire et l'intégrité des barrières physiologiques.

Plusieurs recherches ont mis en évidence un lien entre certaines conditions perturbant l'installation précoce du microbiote comme la césarienne ou l'administration d'antibiotiques en période néonatale et un risque accru de développer des troubles comme les allergies, l'eczéma, l'asthme ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. À l'opposé, une exposition précoce à une diversité microbienne, notamment dans des environnements ruraux ou au contact d'animaux, pourrait offrir un effet protecteur. Alors que l'utérus était autrefois considéré comme un environnement stérile, des données récentes suggèrent la présence d'un microbiote in utero, notamment à travers la détection de bactéries dans le méconium, première selle du nouveau-né. Ce microbiote fœtal pourrait représenter le premier inoculum microbien, influant sur le développement physiologique du fœtus.

Enfin, l'équilibre immunologique au niveau placentaire, impliquant l'immunité maternelle et fœtale ainsi que la présence de bactéries commensales, contribuerait au bon déroulement de la grossesse. Cette stabilité pourrait également favoriser la maturation immunitaire et jouer un rôle clé dans la santé future de l'enfant, intégrant ainsi le microbiote in utero dans le cadre conceptuel du DOHaD (Gschwind et *al.*,2018).

II.3. Rôle de l'allaitement maternel

Le lait maternel est très nutritif et possède une composition unique, notamment par sa teneur élevée en protéines, en lactose, ainsi qu'en facteurs de croissance spécifiques et en microbiome. Il est considéré comme l'aliment idéal pour la nutrition des nourrissons grâce à la présence de certains éléments nutritionnels tels que la lactoferrine, les immunoglobulines et les leucocytes, qui confèrent une immunité aux nourrissons. Divers micro-organismes présents dans les premiers jets de lait maternel modulent la colonisation du microbiote dans l'intestin grêle des nourrissons, et il a été reconnu que cela influence de manière significative le développement et la maturation du système immunitaire de l'enfant. Ainsi, l'allaitement est considéré comme essentiel pour la croissance et le développement global du nouveau-né, car il établit une tolérance immunitaire locale et systémique aux molécules étrangères ingérées pendant l'allaitement. Bien que le lait maternel ait longtemps été considéré comme stérile, des chercheurs ont récemment confirmé la présence de certains commensaux et d'autres bactéries probiotiques, considérées comme bénéfiques pour l'intestin du nourrisson. Les

staphylocoques, les bifidobactéries, les streptocoques et les bactéries lactiques sont certains des micro-organismes identifiés dans le lait maternel. Parmi eux, les bifidobactéries sont reconnues pour stimuler la croissance d'autres bactéries bénéfiques dans le système intestinal du nourrisson, bien que l'origine exacte de ces bactéries reste controversée. Le lait maternel consommé par les nourrissons (environ 800 mL/jour) contient environ 10^5 à 10^7 bactéries, ce qui prouve la proximité étroite entre le microbiote intestinal du nourrisson et celui de sa mère. De plus, les oligosaccharides du lait maternel (HMOs) jouent un rôle essentiel dans le développement des bactéries bénéfiques chez les nourrissons allaités. La souche de *Lactobacillus* présente dans le lait maternel stimule la production de cytokines et de médiateurs inflammatoires (CD4+, CD8+, cellules tueuses naturelles et cellules T régulatrices). Les bactéries contenues dans le lait maternel exercent une fonction biothérapeutique importante, en raison de leurs multiples propriétés bénéfiques. Elles possèdent un potentiel probiotique qui favorise l'équilibre de la flore intestinale, des effets antiallergiques capables de moduler les réponses immunitaires, ainsi que des propriétés antiarythmiques. De plus, ces micro-organismes ont démontré leur capacité à inhiber la capacité infectieuse du virus VIH ainsi que d'autres agents pathogènes, contribuant ainsi à la protection de la santé du nourrisson (Melekoglu et al., 2023).

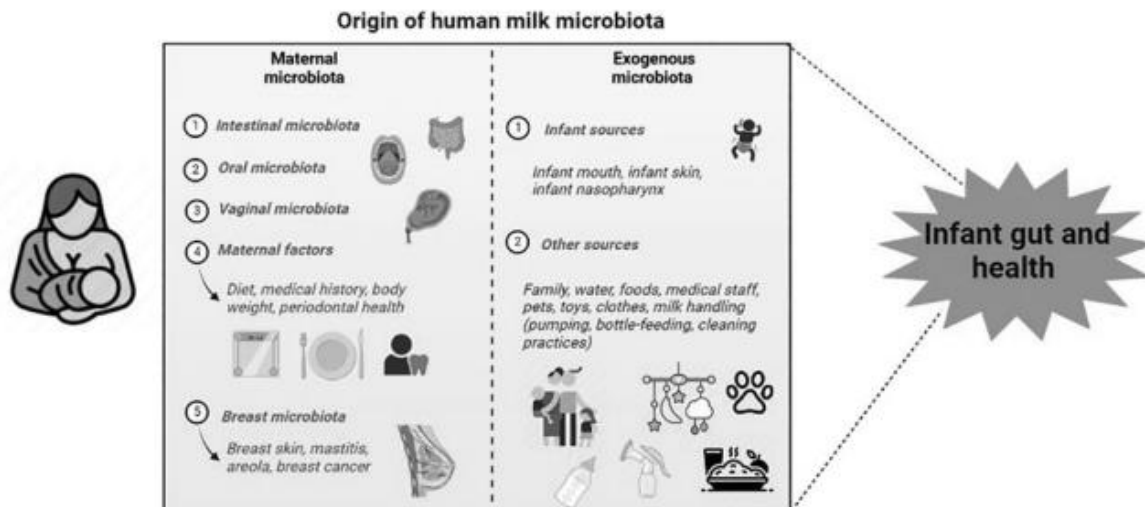


Figure II.3.1. Origine du microbiote du lait maternel. Le microbiote maternel ainsi que le microbiote exogène jouent un rôle important dans l'origine du microbiote du lait maternel, lequel influence ensuite le microbiote intestinal et la santé du nourrisson (Melekoglu et al., 2023).

Des échantillons de selles ont été collectés quotidiennement et analysés par séquençage de l'ADN. Les nourrissons prématurés nourris avec le lait maternel de leur propre mère (MOM) présentaient des

niveaux plus élevés de bactéries bénéfiques telles que Clostridiales, Lactobacillales et Bacillales, tandis que ceux nourris avec du lait maternel donné (HDM) ou du lait infantile (F) présentaient des niveaux plus élevés de bactéries potentiellement nocives comme les Enterobacterales. Même après avoir pris en compte des facteurs tels que le sexe, l'âge post-natal, le poids et l'âge gestationnel à la naissance, les nourrissons ayant reçu le lait de leur propre mère ont montré une plus grande diversité du microbiome intestinal au fil du temps par rapport aux autres types d'alimentation. Ceux nourris avec au moins 70 % de MOM dans leur alimentation présentaient les plus grandes abondances de Lactobacillales, Bacillales et Clostridiales, tandis que ceux nourris uniquement au HDM ou au lait infantile avaient une abondance plus élevée d'Enterobacterales.

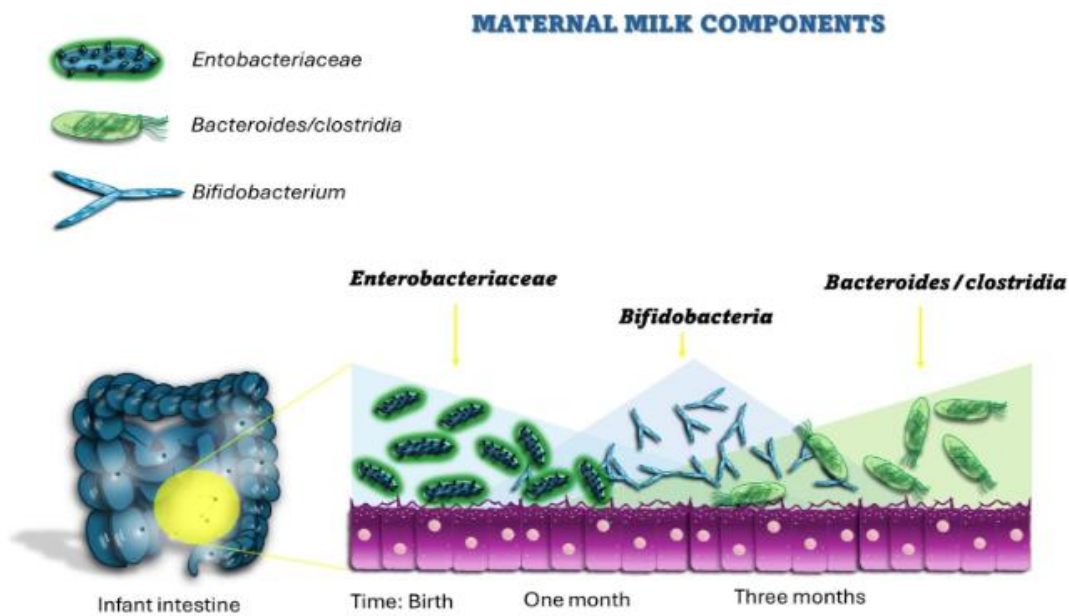


Figure II.3.2. Les composants du lait maternel peuvent façonner le développement du microbiome des nourrissons (Inchingolo et al., 2024).

II.4. Influence du mode d'accouchement :

L'implantation de l'immunité du fœtus prépare le nouveau-né à vivre dans un monde microbologique. Après la naissance, l'enfant possède une immunité qui lui permet de faire face à une variété de stimuli (exposome), qu'ils soient des toxines environnementales, alimentaires, médicamenteuses ou microbiennes. L'environnement intra-utérin (fœtus, liquide amniotique et placenta) est considéré comme stérile, c'est-à-dire dépourvu de micro-organismes. De rares études ont suggéré la présence

d'un microbiote très peu abondant (moins de 100 bactéries) dans l'environnement fœtal, décrivant un microbiote viable chez le fœtus (contenant *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Afiplia*, et *Brevundimonas*) qui contribuerait à l'établissement précoce de l'immunité. Cependant, ces résultats ont été remis en question car ils seraient dus à des contaminations microbiennes survenues tout au long de la procédure expérimentale, depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'analyse des données de séquençage. Par ailleurs, l'absence de micro-organismes dans le méconium collecté chez des enfants sains nés par césarienne corrobore l'absence de microbiote fœtal. Ce constat est également conforté par l'obtention d'animaux axéniques par césarienne. Il est important de souligner que l'existence d'une communauté microbienne fonctionnelle se développant au niveau des tissus fœtaux n'est pas compatible avec les théories actuelles en immunologie, microbiologie clinique et sur les fonctions des microbiotes. Ainsi, le développement du système immunitaire fœtal (migration des cellules dendritiques fœtales vers les ganglions lymphatiques mésentériques, hypermutation somatique des lymphocytes B fœtaux et expansion de la diversité du répertoire des récepteurs des lymphocytes T) est probablement guidé par des composants immunitaires maternels (complexes antigène-IgG), ainsi que par des fragments microbiens, des vésicules extracellulaires dérivées du microbiote maternel et des métabolites microbiens issus du microbiote intestinal maternel capables de traverser le placenta. De nombreux mécanismes de défense existent donc pour protéger le fœtus. Ainsi, les dialogues entre le microbiote digestif de la mère et celui du fœtus sont essentiels car ils soutiennent le bon développement du fœtus et le préparent à l'exposition à divers stimuli à la naissance (Comtet-Marre et *al.*, 2024).

II.4.1.1. Naissance césarienne:

La transmission naturelle du microbiote de la mère à l'enfant est perturbée par la naissance par césarienne (CS), ce qui entraîne une déviation du développement du microbiote, en particulier au cours des 6 à 12 premiers mois de la vie. En fait, la césarienne est peut-être le facteur qui a les effets les plus uniformes sur le microbiote intestinal d'un individu à l'autre et d'une étude à l'autre. Une vaste étude portant sur près de 600 nourrissons a révélé que le mode d'accouchement était le principal facteur influençant la composition du microbiote intestinal du nourrisson, avec un effet plus important que les traitements antibiotiques postnatals. Une caractéristique particulièrement importante et omniprésente du microbiote intestinal du nourrisson né d'un accouchement par voie basse est la faible abondance relative des bifidobactéries et l'absence quasi-totale de *Bacteroides*; c'est-à-dire les taxons qui devraient normalement provenir de la mère à la naissance et qui sont largement responsables de la fermentation des oligosaccharides du lait maternel dans l'intestin de l'enfant. Ces tendances sont

observées dans pratiquement toutes les études portant sur l'impact du lait maternel sur le microbiote intestinal du nourrisson (tableau 1), y compris dans plusieurs grandes études de cohorte portant chacune sur 600 à 1 000 nourrissons. En outre, l'abondance relative des bactéries pathogènes est souvent accrue chez les nourrissons nés de CS. Ces taxons sont courants à l'hôpital et se transmettent aux nouveau-nés à partir des surfaces hospitalières

Il a été suggéré qu'en termes de contact microbien, l'accouchement par CS après rupture des membranes ressemblerait davantage à un accouchement par voie vaginale qu'à une CS élective dans laquelle l'enfant n'a aucun contact avec le microbiote du canal de naissance de la mère. Si l'exposition de la mère et de l'enfant au processus d'accouchement a sans aucun doute des effets physiologiques, il n'y a aucune raison de s'attendre à ce que la colonisation microbienne résultant de l'accouchement, même en cas de rupture des membranes, soit très bénéfique, car il est peu probable que des microbes fécaux maternels soient présents dans la filière pelvienne de mères en bonne santé. En effet, l'hypothèse n'a pas reçu beaucoup de soutien dans la littérature scientifique. Seules quelques études ont comparé l'effet de différents types de CS sur le microbiote intestinal du nourrisson. Les CS d'urgence semblent entraîner des changements plus radicaux et plus durables dans le microbiote intestinal des nourrissons, peut-être en raison de différences au niveau de l'état de santé. En conclusion, il n'existe actuellement aucune preuve suggérant un effet bénéfique de la rupture des membranes ou de la césarienne pendant le travail par rapport à la césarienne avant le travail sur le microbiote intestinal du nourrisson. Jusqu'à présent, seules quelques études ont examiné la composante virale du microbiote intestinal, appelée virome intestinal, dans la petite enfance. Des résultats récents montrent que la plupart des virus présents dans l'intestin des nouveau-nés sont des phages, c'est-à-dire des bactéries infectant des virus. Il est prouvé que les phages sont transmis par la mère à la naissance en même temps que leurs bactéries hôtes. Par conséquent, la diversité totale des virus et des phages (Korpela,2021).

Table II.4.1.1-1. Différences cohérentes du microbiote entre nourrissons nés par césarienne et par voie vaginale (Korpela,2021).

	Increased in CS	Decreased in CS	Reference (large birth cohort studies meta-analyses)
Bacteroides		+	[12, 14, 16, 17]

Bifidobacteria		+	[12, 14, 16]
Clostridia	+		[12]
Gram-negative pathogens	+		[14, 18]
Gram-positive pathogens	+		[14, 16, 18]

II.4.1.2. Naissance normale:

Deux des mesures préventives les plus anciennes et probablement les plus efficaces contre les maladies de l'enfance et de l'âge adulte sont les accouchements naturels (CN) (l'accouchement par voie basse (AVB) avec le moins possible de médicaments/antibiotiques) et l'allaitement du nourrisson (Dietert,2013).

Des études ont montré que l'accouchement par voie vaginale favorise le transfert de communautés bactériennes de la mère au nouveau-né. Le microbiote intestinal du nourrisson présente ainsi une forte similarité avec le microbiote vaginal maternel, ce qui contribue à l'établissement d'un microbiote équilibré dès la naissance (Dominguez-Bello et al., 2013)."

II.5. Facteurs microbiens et environnementaux influençant la colonisation néonatale

Bien que la séquence d'établissement de la flore intestinale soit aujourd'hui relativement bien connue, elle demeure un phénomène complexe. Le nouveau-né, stérile dans l'utérus, est brusquement exposé à une flore bactérienne abondante dès la naissance. Il est alors rapidement colonisé par une flore simple issue de celle de sa mère et de l'environnement immédiat. Toutefois, l'enfant ne conserve pas toutes les bactéries rencontrées : un processus de sélection naturelle semble opérer. Il a été démontré que la colonisation initiale se fait essentiellement par les flores vaginale et fécale de la mère, mais c'est la flore fécale qui joue un rôle primordial. Les nouveau-nés sont colonisés principalement par des entérobactéries et des bifidobactéries (d'origine fécale), plutôt que par des lactobacilles (d'origine vaginale).

Par la suite, le nourrisson est continuellement exposé à de nouvelles bactéries venant de l'environnement, de l'alimentation, ainsi que de la peau des adultes, à travers l'allaitement, les caresses ou les baisers. Une flore intestinale complexe et stable, proche de celle de l'adulte, ne semble s'établir qu'entre 2 et 4 ans. Les facteurs microbiens permettant à une souche donnée de s'implanter restent encore mal connus. Une étude sur l'implantation d'*Escherichia coli* a révélé que les souches résidentes possèdent des caractéristiques génétiques particulières (comme des gènes codant pour des fimbriae ou des hémolysines) favorisant leur persistance, contrairement aux souches transitoires.

Des recherches chez l'animal ont également montré que les premières bactéries colonisant le tube digestif peuvent induire des glycosylations spécifiques du glycocalyx et moduler l'expression des gènes des entérocytes, ce qui leur confère un avantage écologique.

Malgré les différences observées entre les études dues aux méthodes utilisées ou aux variations individuelles et géographiques, un schéma général d'implantation peut être identifié. Chez les nouveau-nés à terme, les premières bactéries colonisatrices sont des aérobies et anaérobies facultatives : principalement des entérobactéries (notamment *E. coli*), des entérocoques et des staphylocoques. Celles-ci consomment rapidement l'oxygène, réduisant le potentiel redox de la lumière intestinale, ce qui permet ensuite l'implantation de bactéries anaérobies strictes (comme *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*) ainsi que des lactobacilles, microaérophiles.

Les méthodes moléculaires ont confirmé cette séquence d'implantation. Elles ont aussi permis d'identifier des genres bactériens difficiles ou impossibles à cultiver auparavant. Par exemple, Harmsen et ses collègues, grâce à des sondes spécifiques, ont mis en évidence deux genres supplémentaires : *Coriobacterium* (présent en plus grande quantité chez les nouveau-nés nourris au lait artificiel) et le groupe *Atopobium*, dont la diversité augmente avec l'âge (Campeotto et al., 2007)

II.6. Importance précoce du microbiome pour la santé

Au cours des dernières décennies, notre compréhension de la manière dont les communautés microbiennes influencent la santé et les maladies de leur hôte s'est considérablement améliorée. Cette avancée a été facilitée par la disponibilité et l'accessibilité de techniques modernes telles que la gnotobiologie, le séquençage de nouvelle génération (NGS) et la métatranscriptomique. De plus en plus de preuves établissent un lien entre le microbiote et la physiopathologie de maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le cancer, l'obésité, le diabète de type 2 ou

encore certains troubles neurologiques. La colonisation microbienne commence dès la naissance, et plusieurs facteurs influencent la composition du microbiote à ce stade, notamment le mode d'accouchement, les traitements antibiotiques pendant la grossesse ou la petite enfance, l'alimentation maternelle, le type d'allaitement (maternel ou artificiel), ainsi que l'introduction des aliments solides. Le patrimoine génétique de l'hôte ne jouerait qu'un rôle limité, estimé à environ 9 %. Le microbiote d'un nourrisson au cours de ses trois premières années de vie se distingue de celui d'un adulte par une diversité plus faible et une variabilité interindividuelle plus importante. Dans les premières semaines, des familles bactériennes comme les Bifidobacteriaceae et Lactobacillaceae prédominent, car elles se nourrissent d'oligosaccharides abondants dans le lait maternel. Lors de la diversification alimentaire, ces bactéries diminuent au profit de genres tels que Bacteroides, Clostridium ou Ruminococcus. L'impact du microbiote sur le développement du système immunitaire a été reconnu très tôt. Les interactions précoces entre les microbes et le système immunitaire sont cruciales. Pendant la grossesse, les métabolites microbiens d'origine maternelle et les composés alimentaires soutiennent le développement immunitaire fœtal. À la naissance, le nouveau-né est confronté à des bactéries vivantes et reste dépendant de la protection maternelle, principalement via l'allaitement. En plus de l'immunité passive conférée par le lait maternel, les cellules immunitaires innées et la barrière intestinale participent à la défense contre les pathogènes et à l'établissement d'une relation bénéfique avec le microbiote néonatal. Chez l'humain, une partie de l'immunité adaptative est déjà présente avant la naissance, contrairement à la souris où elle se développe surtout après. La diversification alimentaire entraîne un changement important dans la composition du microbiote intestinal, qui devient plus riche et plus proche de celui d'un adulte. Cette période critique est souvent qualifiée de « fenêtre d'opportunité », car les influences environnementales pendant cette phase peuvent avoir un effet déterminant sur la santé à long terme, la maturation du microbiote et du système immunitaire muqueux (Kalbermatter et al.,2021).

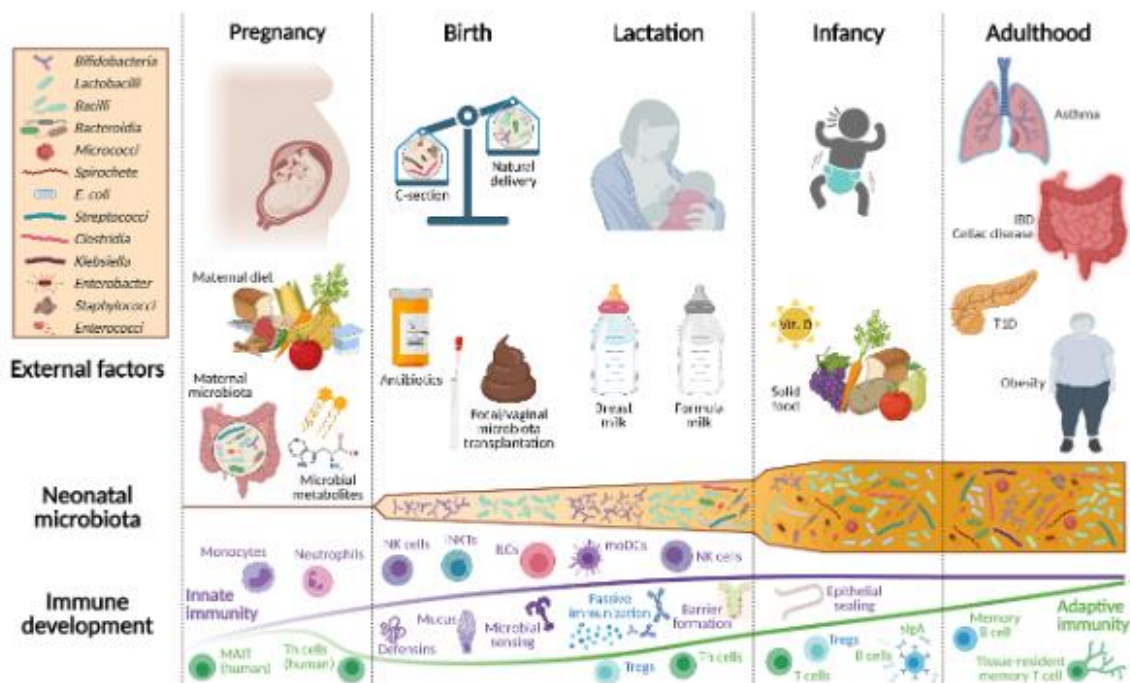


Figure II.6.1. Vue d'ensemble des facteurs environnementaux influençant le développement du microbiote néonatal et du système immunitaire muqueux (Kalbermatter et al., 2021).

II.7. Perturbations précoces et conséquences possibles

II.7.1. Traitement antibiotique périnatal et microbiote intestinal néonatal

Le moment, la durée et le type d'exposition aux antibiotiques sont particulièrement importants si l'on considère les principaux facteurs qui influencent la composition et la fonction du microbiote intestinal du nouveau-né. L'impact du traitement antibiotique sur le microbiote du nouveau-né en développement peut découler à la fois de l'absorption d'antibiotiques par la mère pendant la grossesse et l'allaitement et de l'exposition directe des nourrissons, en raison de leur état de santé. Dans les paragraphes suivants, nous examinons ces deux conditions, en distinguant les conséquences de l'exposition directe et indirecte aux antibiotiques chez les nouveau-nés à terme et prématurés.

II.7.1.1. Exposition maternelle aux antibiotiques

L'antibiothérapie maternelle peut influencer la composition du microbiote de l'enfant en raison de l'exposition prénatale du fœtus ou des modifications du microbiote de la mère ou de l'allaitement.

L'antibioprophylaxie intra-partum est utilisée chez 40 % des femmes ayant subi une césarienne élective ou d'urgence et chez les femmes colonisées par un streptocoque du groupe B (SGB, *Streptococcus agalactiae*). Les antibiotiques maternels peuvent affecter la colonisation microbienne néonatale de deux manières :

-Par le cordon ombilical, les antibiotiques atteignent le sang du fœtus et persistent jusqu'à au moins dix heures après l'administration (Dierikx *et al.*, 2020).

- Les antibiotiques peuvent modifier le microbiome vaginal et intestinal de la mère, entraînant une altération de la transmission microbienne verticale et de l'immunité post-natale (Dierikx *et al.*, 2020).

Le traitement antibiotique pendant le travail modifie le développement du microbiote intestinal chez les nouveau-nés prématurés, réduit les défenses de l'hôte intestinal, provoque certaines altérations du microbiote vaginal avant l'accouchement et influence la composition du microbiote oral néonatal.

L'antibioprophylaxie périnatale est utile pour prévenir les infections à *Streptocoque* du groupe B chez les nouveau-nés. La céphazoline et la benzylpénicilline sont les deux antibiotiques intrapartum les plus fréquemment utilisés, qui réduisent les différentes souches de streptocoques oraux, ce qui pourrait expliquer la diminution de la concentration de la famille des Streptococcaceae chez les nourrissons nés de mères ayant reçu des antibiotiques intrapartum. Les streptocoques oraux sont importants pour l'établissement de colonisateurs ultérieurs en raison de la production de polysaccharides et d'adhésines qui recrutent des bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Par conséquent, l'altération de la concentration en streptocoques oraux. La PAI (prophylaxie antibiotique intrapartum) peut également entraîner une diminution de la diversité et une plus faible concentration de *Lactobacilles* dans le microbiote vaginal, ce qui peut être associé à un risque élevé d'accouchement prématuré et à un risque accru d'infection vaginale par le SGB. En particulier, la PAI est associée à une concentration relative plus faible d'*Actinobactéries*, notamment de *Bifidobacteriaceae*, et à une abondance relative plus importante de protéobactéries par rapport aux nourrissons non exposés. On sait que les *bifidobactéries* peuvent stimuler les gènes qui favorisent l'intégrité de la muqueuse et réduire l'expression des gènes inflammatoires, tandis que les *protéobactéries* sont associées aux maladies métaboliques et inflammatoires.

Enfin, il existe peu de données concernant les effets de la PAI sur la composition du lait maternel. Il a été rapporté que les mères souffrant de PAI ont une concentration plus faible ou l'absence de *Bifidobacterium spp.* Dans leur lait (Morreale *et al.*, 2023).

II.7.1.2. Exposition néonatale aux antibiotiques : Conséquences pour les enfants nés à terme

Le microbiote intestinal néonatal est influencé par le moment, la durée et le type d'exposition aux antibiotiques. L'antibiothérapie empirique est associée à une diversité bactérienne intestinale plus faible et à une concentration majeure d'*Enterobacter* chez les nourrissons nés à terme au cours du premier mois.

Chez les enfants nés à terme, l'administration d'antibiotiques au cours des premières heures de vie a réduit le taux de *Bifidobacterium* dans les jours suivant immédiatement la naissance et a ensuite augmenté le taux d'*Enterobacteriaceae* (figure 1).

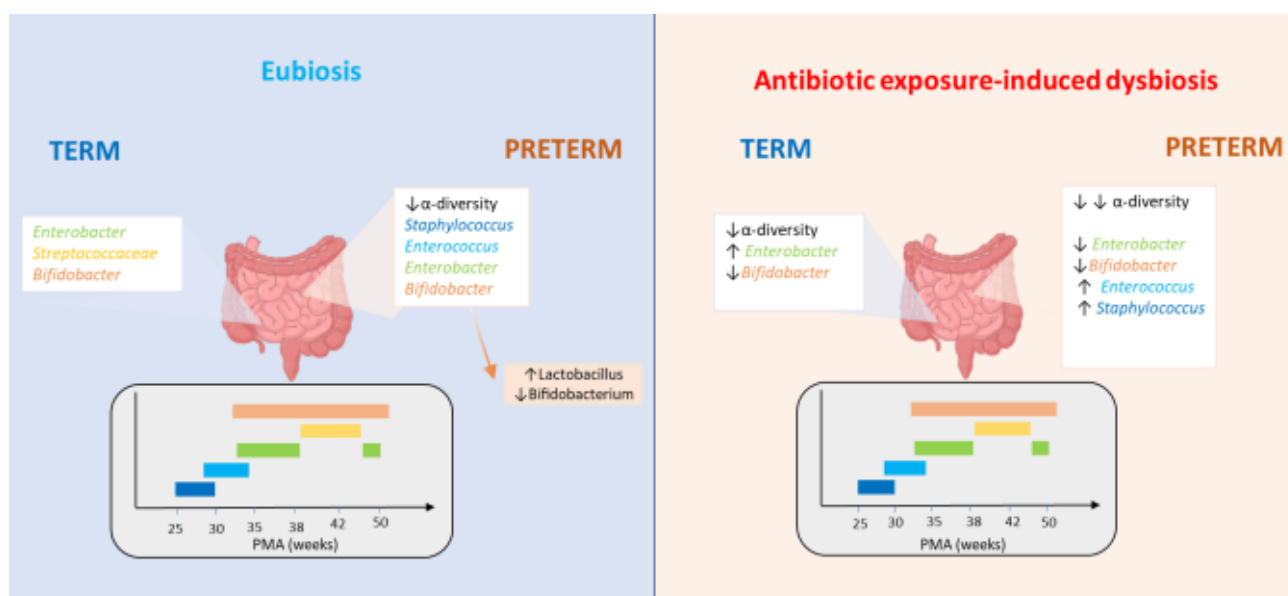


Figure II.7.1. Effets de l'antibiothérapie sur le microbiote intestinal du nouveau-né en fonction de l'âge post-ménstruel (PMA). Dans la boîte bleue (conditions d'eubiose), les couleurs du graphique indiquent l'expression des espèces bactériennes concernées chez les enfants nés à terme et les prématurés en fonction de l'âge post-ménstruel (Morreale et al., 2023).

Il est important de souligner que la dysbiose du microbiote intestinal est probablement un facteur de risque important pour la septicémie précoce, comme l'ont montré Zhou et al. Car les patients atteints de septicémie précoce, qui est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les prématurés, et *Staphylococcus spp.*

Une étude transversale rétrospective menée par Rooney *et al.* A révélé que chez tous les nourrissons dans la semaine suivant l'arrêt du traitement, chaque jour supplémentaire d'antibiotiques était associé à une plus faible concentration d'anaérobies obligatoires tels que *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*,

Bacteroides et de producteurs de butyrate tels que *Bifidobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Eubacteriaceae*, *Fusobacteriaceae* à la fin du traitement (Figure 1). Une faible concentration de Bacteroidetes a été associée à un risque accru de développer un diabète de type 1, de l'asthme et des maladies allergiques.

Il a également été démontré que l'antibiothérapie néonatale peut être associée à une diminution de la croissance au cours de la première année de vie, tandis que pendant la petite enfance et l'enfance, elle pourrait être liée à un risque accru de surpoids et d'obésité. Cette diminution de la croissance est plus grave chez les nouveau-nés qui reçoivent un traitement antibiotique complet. La cause possible de ce trouble de la croissance pourrait être une dysbiose médiée par les antibiotiques, telle que la réduction de *Bifidobacterium*, qui joue un rôle important dans la digestion des composés alimentaires et module le métabolisme énergétique et la satiété de l'hôte. En outre, les troubles de la croissance pendant l'enfance sont associés à de mauvais résultats en matière de développement neurologique et à une augmentation des facteurs de risque cardiométaboliques plus tard dans la vie.

La durée du traitement augmente également le risque de *Clostridium difficile* ou de résistance aux antimicrobiens. Pour ces raisons, la co-administration ou la post-administration de probiotiques peut représenter un traitement réalisable visant à réduire les effets des antibiotiques sur le microbiote intestinal. En fait, les probiotiques peuvent restaurer l'équilibre micro-écologique intestinal ainsi que la barrière intestinale et améliorer la colonisation intestinale en inhibant la croissance excessive des pathogènes opportunistes (Morreale *et al.*, 2023).

II.7.1.3. Exposition néonatale aux antibiotiques : Conséquences pour les prématurés

L'utilisation d'antibiotiques est une pratique néonatale courante pour la prévention et le traitement de la septicémie, qui est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les prématurés.

Les nouveau-nés prématurés présentent une composition différente du microbiote intestinal, avec une colonisation retardée des bactéries communes telles que les *Bifidobacteria* et les *Bacteroides* et une concentration accrue d'agents pathogènes tels que les *Clostridia* (figure 1). Cette composition différente du microbiote peut être due à une naissance prématurée, à l'influence de l'environnement hospitalier, aux interventions médicales après la naissance et à l'utilisation d'antibiotiques. Malheureusement, pour diverses raisons, telles que la chorioamnionite ou la rupture prématurée des membranes, une antibiothérapie prolongée est fréquemment appliquée à ces bébés et l'exposition périnatale aux antibiotiques peut augmenter le risque de septicémie tardive et de NEC. Cela est

probablement dû à une diminution globale de la production d'IL-17A dans l'intestin et à une augmentation de la translocation bactérienne.

Gibson et al. Ont montré que l'administration de méropénème, de céfotaxime et de ticarcilline-clavulanate à des enfants prématurés entraînait une réduction significative de la diversité bactérienne intestinale, tandis que l'ampicilline, la vancomycine et la gentamicine n'avaient pas d'effets uniformes sur la richesse des espèces.

Dans une étude d'observation menée par Zwittink et al, un traitement antibiotique intraveineux de courte durée (≤ 3 jours) et de longue durée (≥ 5 jours) (amoxicilline/ceftazidime) au cours de la première semaine postnatale chez 15 enfants peu prématurés (35 ± 1 semaines de gestation) a gravement affecté leur colonisation intestinale normale. Les deux traitements ont eu des effets négatifs sur la famille des Enterobacteriaceae, ont réduit la concentration de Bifidobacterium et ont augmenté la présence d'Enterococcus jusqu'à deux semaines après l'arrêt du traitement, ce qui représentait un risque pour la santé des nourrissons (Figure 1). Seul le traitement à court terme a permis de rétablir les concentrations de Bifidobacterium au cours des six premières semaines postnatales, ce qui pourrait permettre de contrôler d'autres espèces bactériennes et de jouer un rôle important dans l'induction de la tolérance et la maturation du système immunitaire au début de la vie. L'utilisation d'antibiotiques à large spectre au cours de la première semaine de vie serait associée à différents niveaux de marqueurs inflammatoires tels que sVCAM-1, sCD14, sCD19, sCD27, IL-1RII, sVEGF-R1 et HSP70 (une protéine répondant au stress) à l'âge d'un an. En outre, les coliques infantiles au cours des trois premiers mois de la vie sont associées à une augmentation des marqueurs inflammatoires tels que l'IL-33, tandis que les enfants atteints d'eczéma ont une capacité réduite à induire des cytokines Th1 (telles que l'IFN- γ et le CXCL9).

D'autres études ont confirmé qu'un traitement antibiotique de courte durée (moins de trois jours) chez les nourrissons peut n'avoir que des effets légers et temporaires sur la composition du microbiote intestinal et de ses métabolites.

Zhu et al. Ont analysé le microbiote des selles et les métabolites de 36 nouveau-nés prématurés répartis en trois groupes. Deux d'entre eux ont été traités avec de la pénicilline et du moxalactam ou du pipéracillintazobactam pendant 7 jours, tandis que le troisième n'a pas reçu d'antibiotiques. Les deux groupes traités présentaient une réduction de la diversité bactérienne intestinale et une augmentation des bactéries dangereuses telles que les streptocoques, qui peuvent provoquer des infections graves comme la septicémie néonatale, et les Pseudomonas. Le groupe traité à la pipéracilline-tazobactam a

également présenté une prolifération d'*Enterococcus*, qui est intrinsèquement résistant à différents antibiotiques et peut provoquer des infections nosocomiales.

Enfin, dans une revue systématique qui a identifié 129 études, des altérations du microbiote intestinal humain dues à l'exposition aux antibiotiques ont été rapportées. En particulier, l'amoxicilline, l'amoxicilline/clavulanate, les céphalosporines, les macrolides, la clindamycine, la tigécycline, les quinolones et la fosfomycine ont augmenté l'abondance des *Entérobactéries* autres qu'*E. coli* (en particulier *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* Et *Klebsiella spp.*). L'amoxicilline, les céphalosporines, les macrolides, la clindamycine, les quinolones et les sulfamides ont réduit la concentration d'*E. coli*, tandis que l'amoxicilline/clavulanate, contrairement aux autres pénicillines, a augmenté l'abondance d'*E. coli*. La pipéracilline et la ticarcilline, les carbapénèmes, les macrolides, la clindamycine et les quinolones diminuent fortement l'abondance des bactéries anaérobies (Zimmermann et Curtis, 2019).

II.7.2. Âge gestationnel

L'âge gestationnel influence fortement le développement du microbiome intestinal dans la petite enfance. Comparé au microbiome des enfants nés à terme, le microbiome des enfants prématurés se caractérise par une faible diversité bactérienne, une abondance relative accrue des entérobactéries (par exemple, *Klebsiella*, *Enterobacter*), une rareté de *Bifidobacterium* et un enrichissement des gènes de résistance aux antibiotiques. Le microbiome intestinal des prématurés est souvent dominé par quelques espèces bactériennes seulement. Le développement altéré du microbiome des prématurés par rapport aux enfants nés à terme est probablement dû à un certain nombre de facteurs, notamment l'exposition fréquente aux antibiotiques, l'environnement des unités de soins intensifs néonataux, les retards et les interruptions dans la mise en place de l'alimentation entérale, et l'immaturation de l'intestin et du système immunitaire. Contrairement aux enfants nés à terme, le mode de naissance ne semble pas avoir une forte influence sur le microbiome des enfants prématurés. La composition du microbiome des prématurés varie également en fonction de l'âge post-menstruel (PMA ; âge gestationnel à la naissance plus âge chronologique).

Au début de l'PMA, le microbiome des prématurés est dominé par *Staphylococcus* et *Enterococcus*, suivi d'une transition vers la domination des *Enterobacteriaceae* (par exemple, *Klebsiella*, *Escherichia*), puis d'une augmentation de l'abondance de *Clostridium*, *Veillonella* et d'autres anaérobies et d'une émergence tardive de *Bifidobacterium*. Cette progression prévisible suggère que les processus de développement de l'hôte influencent l'assemblage des communautés microbiennes intestinales.

Par exemple, la maturation postnatale de la synthèse des acides biliaires et du cycle entérohépatique contribue au développement du microbiome intestinal chez les souris néonatales. Les interactions entre les microbes contribuent également au développement du microbiome chez les prématurés. Par exemple, les interactions inhibitrices entre *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* et *Candida* peuvent conduire à la succession ordonnée de ces organismes dans l'intestin des prématurés (Younge, 2023).

II.8. Lien possible avec les maladies ultérieures

II.8.1. Asthme et respiration sifflante atopique

Parmi les sept études ayant exploré l'association directe entre la diversité alpha (α -diversity) du microbiote intestinal et l'asthme ou la respiration sifflante atopique, deux ont rapporté qu'une diversité alpha plus élevée durant la première année de vie, comparée à une diversité faible, était significativement associée à l'absence de respiration sifflante atopique à l'âge d'un an et à l'absence d'asthme à 5 et 6 ans. Les cinq autres études n'ont observé aucune association significative. Trois études ont utilisé une mesure alternative pour décrire la composition globale du microbiote intestinal, en évaluant la maturité microbienne basée sur les changements dans les taxons bactériens au fil du temps chez des participants sains, comparée à celle d'enfants ayant développé des maladies respiratoires infantiles. Une étude a utilisé cette approche comme indicateur indirect de la diversité, en raison de leur corrélation positive. Une étude a rapporté qu'une maturité microbienne accrue à l'âge de 5 semaines était associée à un risque plus élevé d'asthme entre 6 et 11 ans, tandis que deux autres ont trouvé qu'une immaturité microbienne à 12 mois était associée à un risque accru d'asthme à 5 et 6 ans. Bien que les résultats diffèrent entre les études, dans l'ensemble, une faible abondance relative des genres *Bifidobacterium* (dans les selles à 1 et 3 mois), *Faecalibacterium*, *Roseburia*, et *Ruminococcus* (à 3 mois et à 1 an), a été associée à un risque accru d'asthme et de respiration sifflante atopique entre 1 et 6 ans. Une faible abondance de *Lachnospira* à 3 mois, mais une abondance plus élevée à 1 an, a également été liée à ces affections. Une étude a montré que la faible présence de *Veillonella* à 3 mois était associée à la respiration sifflante atopique à 1 an, tandis que deux autres ont observé qu'une forte abondance de *Veillonella* à 3 mois et à 1 an était liée à l'asthme et à la respiration sifflante atopique à 5 ans. Trois études ont également examiné l'association entre les champignons (mycobiote) et l'asthme. L'une a séquencé les gènes fongiques conservés tels que 18S rRNA, et deux autres ont utilisé les séquences des régions ITS1 et ITS2. Une abondance élevée de *Candida* et *Rhodotorula*, ainsi qu'une faible abondance de *Malassezia* à 1 mois, et une augmentation de *Pichia*

kudriavzevii à 3 mois, ont été associées à un risque accru d'asthme et de respiration sifflante atopique (Alcazar et al.,2022).

II.8.2. Entérocolite nécrosante

Même après que le microbiome soit bien établi chez les nourrissons en bonne santé, une dysbiose, ou des changements dans la composition ou la diversité microbienne, peut se produire en cas de changements alimentaires, d'exposition aux antibiotiques ou d'infection. Ces conditions dysbiotiques peuvent favoriser l'invasion et la croissance d'espèces pathogènes et perturber les circuits régulateurs du système immunitaire qui maintiennent un équilibre entre les mécanismes pro- et anti-inflammatoires. Le microbiome intestinal chez les nouveau-nés, en particulier chez les prématurés, étant donné sa nature dynamique, est fragile et impressionnable. En conséquence, le microbiome est extrêmement sensible aux influences extérieures pouvant affecter de manière significative la santé à court et à long terme de l'hôte. Le développement de NEC (entérocolite nécrosante) dans la population des prématurés est une maladie multifactorielle, dévastatrice et encore mal comprise. Un lien entre NEC et une étiologie microbienne est reconnu depuis des décennies, corroboré par des épidémies dans les unités de soins intensifs néonataux (NICUs), la présence de pneumatosi intestinalis comme sous-produit probable de la fermentation bactérienne, et la présence souvent concomitante de bactériémie. Ainsi, NEC est de plus en plus considéré, au moins en partie, comme lié à une perturbation de l'homéostasie immunitaire intestinale, ainsi qu'à une perturbation générale des schémas normaux de colonisation dans l'intestin en développement, plutôt qu'à la croissance d'un seul pathogène. L'avènement de diverses techniques d'analyse métagénomique du microbiome intestinal humain en développement a ouvert la voie à des études cherchant à déterminer s'il existe un motif microbien signature prédisposant ou annonçant l'apparition de NEC. Comme l'a résumé Berrington et ses collègues, les analyses récentes des données microbiomiques des nourrissons prématurés souffrant de NEC montrent une grande variabilité dans les schémas de dysbiose proposés. Certaines études impliquent une augmentation des Proteobacteria et une diminution des Firmicutes dans le développement de NEC, tandis que d'autres notent plus d'un schéma de dysbiose au sein d'un même groupe néonatal. Morrow et ses collègues ont observé des schémas dominants de Firmicutes et de Proteobacteria dans leur cohorte de nourrissons prématurés, le premier étant associé à une apparition plus précoce de NEC, tandis que le second était associé à une apparition plus tardive de la maladie (Gritz, et Bhandari.,2015).

**Chapitre III : Les techniques
d'analyse du microbiote – des
méthodes classiques aux
approches moléculaires
avancées**

Chapitre III. Les techniques d'analyse du microbiote – des méthodes classiques aux approches moléculaires avancées

III.1. Les méthodes classiques

III.1.1. Culture bactérienne

La culture bactérienne est l'une des techniques classiques qui ont largement contribué au développement de la microbiologie, en permettant l'étude des caractéristiques physiologiques et fonctionnelles des micro-organismes. Toutefois, cette méthode présente des limites notables, en particulier lorsqu'il s'agit d'analyser des communautés microbiennes complexes comme celles du microbiote intestinal. En effet, de nombreux micro-organismes ne peuvent pas se développer dans des conditions artificielles de laboratoire, car ils dépendent d'environnements spécifiques ou d'interactions biologiques complexes avec d'autres espèces. De plus, cette technique demande un temps considérable et n'offre qu'un aperçu partiel de la diversité microbienne réelle, ce qui réduit son efficacité dans certains contextes de recherche ou de diagnostic.

Le principe de cette méthode repose sur l'ensemencement d'un échantillon biologique sur un milieu nutritif adapté (solide ou liquide), suivi d'une incubation dans des conditions de température et d'humidité favorables à la croissance bactérienne. Si des micro-organismes compatibles sont présents, ils formeront des colonies visibles qui peuvent ensuite être isolées et analysées. Ces colonies servent à identifier les espèces, étudier leur comportement, ou tester leur sensibilité aux antibiotiques. Toutefois, cette approche ne permet d'explorer que les bactéries cultivables, ce qui limite la portée et la précision de l'analyse.

III.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique fondamentale en microbiologie qui permet de classer les bactéries en deux catégories principales : les Gram positives et les Gram négatives, en fonction des différences structurales et chimiques de leur paroi cellulaire. Développée par Hans Christian Gram en 1884, cette méthode utilise une série de colorants appliqués successivement : le violet de gentiane, le lugol, un agent décolorant à base d'alcool, puis la safranine comme contre-colorant.

Les bactéries dites Gram positives retiennent le violet en raison de leur paroi épaisse composée principalement de peptidoglycane. En revanche, les bactéries Gram négatives ne retiennent pas ce colorant et apparaissent en rose après la coloration avec la safranine, du fait de leur paroi plus fine et de la présence d'une membrane externe.

Cette technique est largement appréciée pour sa simplicité, sa rapidité, et son utilité dans le diagnostic initial des infections bactériennes. Elle offre aussi une indication précieuse pour orienter les méthodes de culture et les traitements antibiotiques.

Cependant, la coloration de Gram comporte des limites importantes : elle ne permet pas d'identifier précisément les espèces bactériennes et n'est pas adaptée à certaines bactéries atypiques, comme les mycoplasmes, qui n'ont pas de paroi cellulaire, ou les bactéries intracellulaires. De plus, des erreurs dans la procédure ou un mauvais état des échantillons peuvent entraîner des résultats erronés (Beveridge, 2001 ; Madigan et al., 2015).

Pour une analyse complète et fiable, cette méthode est souvent combinée avec des techniques complémentaires telles que la culture microbiologique, les tests biochimiques ou les analyses moléculaires avancées.

III.1.3. Tests biochimiques

L'analyse biochimique constitue l'un des piliers traditionnels dans l'identification des bactéries. Cette approche repose sur la capacité des micro-organismes à réaliser des réactions enzymatiques ou métaboliques spécifiques lorsqu'ils sont mis en contact avec des substrats adaptés. Chaque espèce bactérienne possède un profil biochimique particulier, qui peut servir d'empreinte pour la différencier des autres.

Parmi les tests les plus utilisés, on retrouve :

Le test de catalase, qui détecte la production d'oxygène à partir de la dégradation du peroxyde d'hydrogène ; Le test d'oxydase, qui identifie la présence d'enzymes intervenant dans la chaîne respiratoire ; Les tests de fermentation, qui mettent en évidence la production d'acides ou de gaz à partir de sucres ; Le test d'utilisation du citrate, qui vérifie si la bactérie peut utiliser le citrate comme seule source de carbone.

Ces tests sont généralement regroupés dans des systèmes standardisés (comme API, Enterotube, etc.), qui permettent d'effectuer une batterie de réactions simultanément pour obtenir un profil biochimique global de la souche testée (Simner et al., 2024).

Malgré leur utilité, ces techniques présentent plusieurs limites :

Elles nécessitent une culture pure, ce qui n'est pas toujours facile à obtenir à partir d'échantillons complexes (Alavi et al., 2024).

Le temps d'incubation peut être long (24–48 h), ce qui ralentit le diagnostic.

Certains résultats peuvent être ambigus ou peu reproductibles, surtout si les conditions de culture ne sont pas bien contrôlées.

Enfin, des espèces bactériennes proches peuvent avoir des profils similaires, rendant l'identification incertaine sans techniques complémentaires.

Avec l'évolution des outils de diagnostic, ces tests sont souvent couplés à des technologies plus performantes comme la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) ou la biologie moléculaire (PCR, séquençage 16S rRNA). Cela permet de confirmer les résultats biochimiques ou de compléter les données dans les cas d'ambiguïté (Simner et al., 2024).

Cependant, dans les laboratoires à ressources limitées, les tests biochimiques conservent leur importance en raison de leur faible coût, facilité de mise en œuvre, et leur accessibilité dans les contextes de routine clinique.

III.2. Les méthodes immunologiques

III.2.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La méthode ELISA est une technique immuno-enzymatique largement utilisée pour la détection et la quantification d'antigènes, d'anticorps ou d'autres protéines spécifiques dans des échantillons biologiques. Elle repose sur une interaction spécifique entre un anticorps et un antigène, suivie d'une réaction enzymatique produisant un signal colorimétrique détectable. Cette méthode est appréciée pour sa sensibilité, sa spécificité, ainsi que sa capacité à analyser simultanément de nombreux échantillons (Li ; Zhang, 2023).

Dans le cadre de l'étude du microbiote intestinal, ELISA permet la mesure de biomarqueurs immunitaires tels que des cytokines inflammatoires (par exemple, IL-6, TNF- α) ou la calprotectine fécale, qui sont des indicateurs importants de l'état inflammatoire de l'intestin. Elle est également utilisée pour détecter des protéines spécifiques produites par certaines bactéries, offrant ainsi des informations indirectes sur la composition microbienne et les interactions entre l'hôte et le microbiote (Chen, Wang, Liu, 2022).

Malgré ses nombreux avantages, la méthode ELISA présente des limites, notamment sa dépendance à la qualité des anticorps utilisés et la sensibilité aux interférences causées par la complexité des matrices biologiques. De plus, ELISA ne permet pas une identification directe des espèces bactériennes, ce qui nécessite souvent un recours à d'autres techniques moléculaires complémentaires pour une caractérisation plus approfondie du microbiote (Li ; Zhang, 2023).

III.2.2. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de laboratoire utilisée pour détecter et localiser des protéines ou d'autres molécules spécifiques dans des cellules ou des tissus en utilisant des anticorps marqués par des fluorochromes. Cette méthode repose sur la reconnaissance précise entre l'anticorps et son antigène, permettant une visualisation directe grâce à la fluorescence émise sous microscope à fluorescence.

Le principe de l'immunofluorescence peut être divisé en deux approches principales : la méthode directe, où un anticorps primaire est directement conjugué à un fluorochrome, et la méthode indirecte, qui utilise un anticorps secondaire fluorescent pour amplifier le signal. Cette technique permet une observation détaillée de la distribution et de la localisation des molécules ciblées, offrant une résolution spatiale élevée (Smith et al., 2022).

Dans le domaine de la recherche sur le microbiote intestinal, l'immunofluorescence est très utile pour identifier des bactéries spécifiques et étudier leurs interactions avec les cellules hôtes. Elle nécessite toutefois un équipement spécialisé et une optimisation des protocoles afin d'éviter les signaux parasites et d'assurer une bonne spécificité (García et al., 2023).

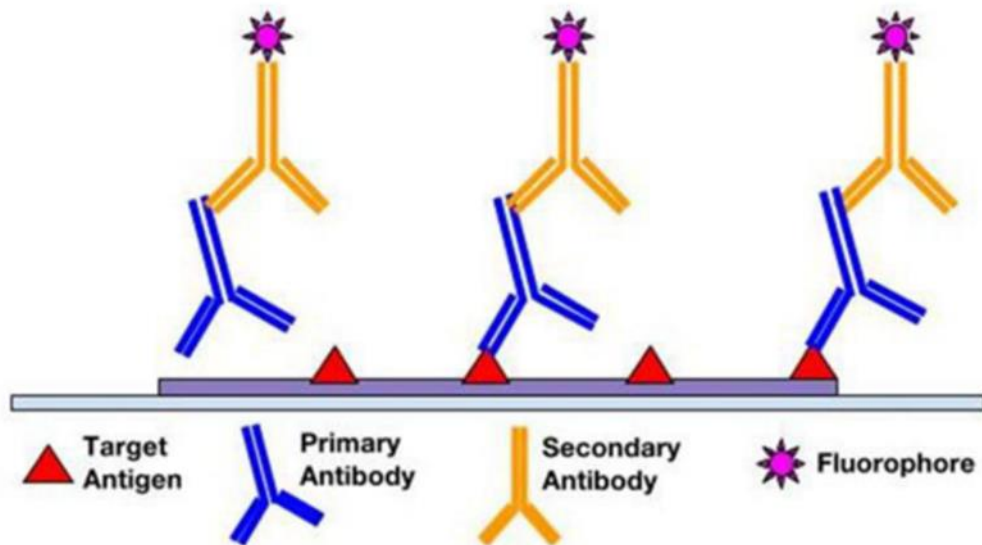


Figure III.2.1. Direct immunofluorescence (Im et al., 2019).

III.2.3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique analytique qui permet d'examiner rapidement les caractéristiques individuelles de milliers de cellules ou particules en suspension. Cette méthode consiste à faire passer les éléments un par un devant un faisceau laser, qui évalue simultanément plusieurs propriétés physiques et chimiques. Parmi celles-ci, on trouve la taille des cellules, leur structure interne, ainsi que la présence de marqueurs spécifiques détectés grâce à des anticorps fluorescents.

Dans la recherche sur le microbiote intestinal, la cytométrie en flux est utilisée pour identifier avec précision différentes populations microbiennes ainsi que les cellules immunitaires qui leur sont associées. Cette approche offre aussi la possibilité d'isoler ces populations pour des analyses plus approfondies. Cependant, la technique exige une préparation rigoureuse des échantillons et une sélection soignée des fluorochromes afin d'éviter les interférences entre signaux. L'analyse des résultats requiert en outre des compétences techniques spécifiques pour interpréter correctement les données (Durand, Martin, 2023).

En intégrant la cytométrie en flux à d'autres méthodes biologiques, les chercheurs peuvent obtenir une compréhension plus détaillée des interactions complexes entre le microbiote et l'organisme hôte, ce qui contribue à mieux appréhender son rôle dans la physiologie humaine.

III.3. Les méthodes moléculaires avancées

III.3.1. PCR (Polymérase Chain Réaction)

La réaction en chaîne par polymérase, communément appelée PCR, est une méthode puissante utilisée pour multiplier rapidement des segments spécifiques d'ADN à partir d'une très faible quantité initiale. Ce procédé repose sur l'action d'une enzyme thermostable, l'ADN polymérase, capable de synthétiser de nouveaux brins d'ADN en utilisant des amorces qui se fixent sur les séquences cibles. Le protocole inclut une succession de cycles thermiques : d'abord la séparation des brins d'ADN par chauffage, puis la fixation des amorces lors d'un refroidissement, et enfin la synthèse des nouveaux brins à une température adaptée à l'enzyme.

Grâce à cette amplification répétée, la PCR permet d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour être détectée et analysée, ce qui est particulièrement utile pour identifier des microorganismes présents en très faible quantité dans des échantillons complexes comme ceux du microbiote intestinal. Cette technique est devenue un outil incontournable pour caractériser la diversité microbienne et détecter la présence de gènes spécifiques associés à certaines fonctions biologiques. Toutefois, le succès de la PCR dépend fortement de la conception précise des amorces, de la qualité des échantillons et de la rigueur appliquée pour éviter toute contamination, qui pourrait compromettre les résultats. L'interprétation des données nécessite également une expertise technique afin d'assurer la fiabilité des analyses (Miller et al., 2021).

L'intégration de la PCR avec d'autres approches analytiques permet aujourd'hui d'approfondir la connaissance des interactions complexes entre les microorganismes et leur environnement, notamment dans le contexte du microbiote humain.

III.3.2. Séquençage du gène 16S rRNA

Le séquençage du gène 16S ribosomal ARN (16S rRNA) est une méthode largement utilisée en microbiologie pour identifier et classifier les bactéries. Ce gène, présent chez toutes les bactéries, possède des régions conservées qui permettent la conception d'amorces universelles, ainsi que des régions variables qui fournissent des informations spécifiques à chaque espèce bactérienne. Grâce à cette particularité, le séquençage du 16S rRNA constitue un outil puissant pour étudier la diversité microbienne dans des écosystèmes complexes, notamment le microbiote intestinal.

Le procédé commence par l'extraction de l'ADN total de l'échantillon, suivi de l'amplification par PCR des régions ciblées du gène 16S rRNA. Les fragments amplifiés sont ensuite séquencés, généralement par des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS), permettant d'obtenir des millions de lectures en parallèle. Ces données sont analysées bioinformatiquement pour identifier les taxons présents et évaluer leur abondance relative.

Cette approche offre une résolution fine pour différencier les communautés bactériennes et comprendre leur composition fonctionnelle. Elle a révolutionné la microbiologie en permettant d'accéder à la diversité microbienne non cultivable par les méthodes classiques. Toutefois, malgré ses nombreux avantages, le séquençage du 16S rRNA présente certaines limites, notamment dans la discrimination entre espèces très proches ou pour l'identification des microorganismes au niveau de la souche (Jiang et al., 2023).

En combinant le séquençage du 16S rRNA avec d'autres techniques moléculaires et métagénomiques, il est possible d'obtenir une vision plus complète de la dynamique du microbiote et de ses interactions avec l'hôte.

III.4. Les avantages de chaque technique

III.4.1. Méthodes classiques

Les méthodes classiques d'analyse du microbiote, telles que la culture bactérienne, présentent plusieurs avantages significatifs. Elles sont généralement simples à réaliser et peu coûteuses, ce qui les rend accessibles dans la plupart des laboratoires (Lagier et al., 2018). Ces méthodes permettent d'isoler des microorganismes vivants, offrant ainsi la possibilité d'étudier leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques de manière approfondie (Wang et al., 2021). Cette capacité d'isolation est particulièrement utile pour effectuer des tests fonctionnels, tels que l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques, cruciale dans le contexte clinique (Smith & Johnson, 2023). De plus, la culture bactérienne offre des informations précises sur la morphologie et le métabolisme des bactéries, données essentielles pour une identification fiable (Liu et al., 2022). Enfin, malgré certaines limitations dans la diversité des espèces détectées, les méthodes classiques constituent une base indispensable pour la microbiologie appliquée, notamment en facilitant le développement de traitements comme les probiotiques et en complétant les analyses moléculaires plus récentes (Lagier et al., 2018).

III.4.2. Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques jouent un rôle crucial dans l'identification et l'étude des microorganismes, en particulier ceux difficiles à cultiver par les méthodes classiques. Ces

techniques reposent sur la reconnaissance spécifique d'antigènes bactériens par des anticorps, ce qui garantit une haute spécificité et sensibilité dans la détection. Une des forces majeures des méthodes immunologiques réside dans leur rapidité d'exécution, permettant des résultats en temps réduit, ce qui est particulièrement précieux en contexte clinique où un diagnostic rapide est essentiel (Khan et al., 2020). De plus, ces méthodes permettent la détection de bactéries vivantes ou mortes, ainsi que des protéines et toxines spécifiques, offrant ainsi une compréhension fonctionnelle et pathogénique approfondie (Garcia et al., 2021). Elles sont également adaptables à divers formats, tels que les tests ELISA, l'immunofluorescence ou les tests de flux cytométrique, rendant leur application flexible selon les besoins du laboratoire (Smith & Lee, 2022). En résumé, les méthodes immunologiques constituent une alternative puissante aux techniques de culture, en particulier pour la détection rapide et précise des agents pathogènes dans les échantillons complexes.

III.4.3. Méthodes moléculaire

Les méthodes moléculaires représentent une avancée majeure dans l'étude du microbiote, permettant d'identifier avec une grande précision des micro-organismes, y compris ceux qui ne peuvent pas être cultivés en laboratoire. Ces techniques reposent principalement sur l'analyse des séquences d'acides nucléiques, telles que le séquençage de l'ADN ou la PCR, ce qui offre une sensibilité et une spécificité élevées (Janda & Abbott, 2023). L'un des principaux avantages est leur capacité à révéler la diversité complète des communautés microbiennes, y compris les espèces rares ou difficiles à détecter par des méthodes classiques (Kim et al., 2022). De plus, les méthodes moléculaires permettent une analyse quantitative, ce qui facilite l'étude des variations relatives des populations bactériennes en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques (Wang et al., 2021). Elles offrent également la possibilité de détecter des gènes spécifiques liés à des fonctions métaboliques ou à la résistance aux antibiotiques, fournissant des informations fonctionnelles précieuses (Zhao & Li, 2020). Enfin, l'intégration de ces techniques dans les études du microbiote a ouvert la voie à de nouvelles perspectives en microbiologie, en médecine personnalisée et en écologie microbienne (Janda & Abbott, 2023).

Partie pratique

**Chapitre IV : Étude du
microbiome à travers une
enquête**

Chapitre IV. Étude du microbiome à travers une enquête

IV.1. Objectif de l'enquête

Cette étude a pour objectif d'explorer et d'analyser les facteurs périnataux susceptibles d'influencer la constitution et le développement du microbiome chez le nouveau-né, à travers la collecte de données terrain au moyen d'un questionnaire adressé aux mères. Elle vise à fournir une analyse descriptive et analytique des variables les plus étroitement liées à la colonisation microbienne initiale, notamment le type d'accouchement, le mode d'alimentation, l'environnement immédiat du nourrisson, ainsi que les traitements administrés autour de la naissance.

L'étude cherche également à dégager des premières conclusions sur l'impact potentiel de ces facteurs sur l'équilibre microbien au cours des premiers jours de vie, à partir de données empiriques. Ces résultats pourraient constituer une base de réflexion pour de futures recherches expérimentales ou cliniques plus approfondies. Par ailleurs, cette enquête vise à sensibiliser les mères et les professionnels de santé à l'importance des facteurs environnementaux et comportementaux dans la promotion d'un microbiome néonatal équilibré, favorable à la santé à long terme de l'enfant.

IV.2. Méthodologie de l'enquête

Dans le cadre de cette étude, une enquête descriptive a été menée afin de recueillir des données sur les principaux facteurs susceptibles d'influencer le développement du microbiome chez le nouveau-né. La méthodologie adoptée est détaillée comme suit:

IV.2.1. Type d'enquête

Une étude descriptive, transversale et basée sur un questionnaire a été adoptée, dans le but de recueillir et d'analyser les données relatives aux facteurs associés à la colonisation microbienne initiale chez le nouveau-né, à travers un questionnaire adressé aux mères.

IV.2.2. Population cible

L'enquête a concerné un échantillon de mères ayant récemment accouché, choisies selon une méthode d'échantillonnage raisonné (ou aléatoire) et résidant dans la région de [Sidi aissa et Bousaada]. Les critères d'inclusion comprenaient des mères de nouveau-nés en bonne santé, âgés de moins de trois mois.

IV.2.3. Mode de collecte des données

Les données ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire structuré, conçu spécifiquement pour cette étude. Le questionnaire comprenait des questions fermées et semi-ouvertes portant sur :

- Les données sociodémographiques de la mère ;
- Les conditions de la grossesse et de l'accouchement (type d'accouchement, lieu, complications éventuelles) ;
- Le mode d'alimentation du nourrisson ;
- L'environnement postnatal immédiat ;
- L'utilisation éventuelle d'antibiotiques ou d'autres traitements.

La distribution du questionnaire s'est faite [en personne à la maternité] « après explication de l'objectif de l'étude et obtention du consentement éclairé des participantes.

IV.3. Analyse et interprétation des résultats

IV.3.1. Répartition des participantes selon l'âge

Tableau IV.3.1.1. Répartition des mères selon la tranche d'âge.

Tranche d'âge (ans)	Fréquence (n)	Pourcentage
Moins de 20	7	11,7%
20 à 30	27	45%
30 à 40	18	30%
Plus de 40	8	13,3%

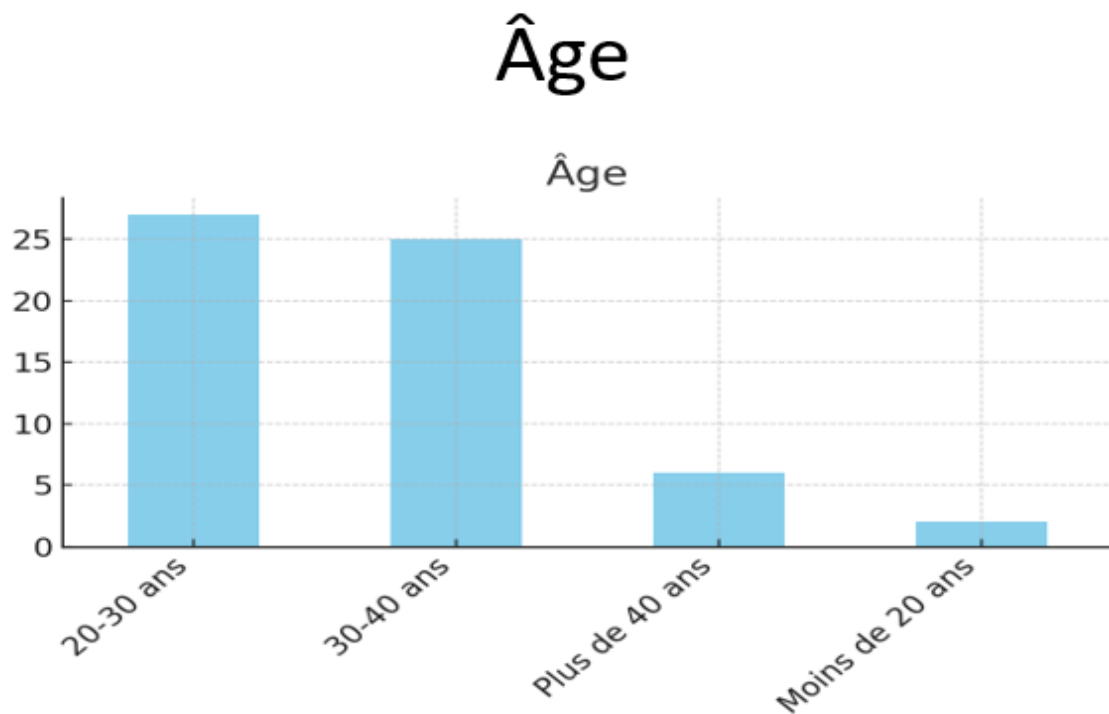


Figure IV.3.1. Diagramme en barre de la répartition par âge.

IV.3.1.1. Analyse et interprétation

Les résultats indiquent que la majorité des participantes à cette étude appartiennent à la tranche d'âge de 20 à 30 ans (45 %), suivie par celles âgées de 30 à 40 ans (30 %). Ces données reflètent une forte représentation des femmes en âge de procréer actif, ce qui constitue une variable démographique importante dans l'étude du microbiome néonatal. En effet, l'âge maternel peut influencer la diversité et la composition du microbiote du nouveau-né à travers divers facteurs tels que l'état de santé de la mère, la maturité du système immunitaire, les pratiques de soins prénatals, ainsi que le mode d'accouchement. Ces éléments jouent un rôle déterminant dans l'acquisition initiale du microbiote chez le nourrisson.

IV.3.2. Répartition des participantes selon le lieu de résidence

Table IV.3.1.1-1. Répartition des participantes selon le lieu de résidence.

Lieu de résidence	Pourcentage (%)
Milieu urbain	50 %
Milieu rural	50 %

Répartition des mères selon le lieu de résidence

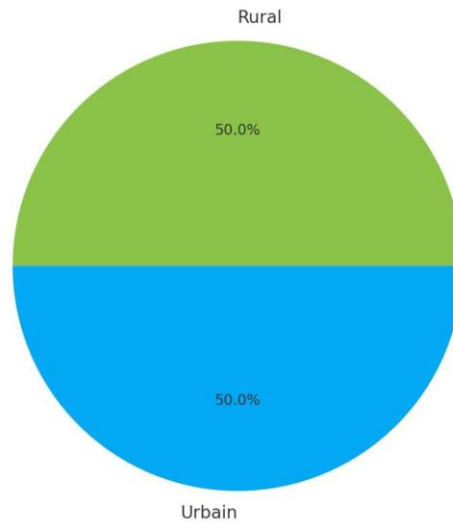


Figure IV.3.1.11. Diagramme circulaire répartition des participantes selon le lieu de résidence.

IV.3.2.1. Analyse et interprétation

Une répartition parfaitement équilibrée entre les milieux de résidence : 30 mères (50 %) résident en zone rurale et 30 autres (50 %) en zone urbaine. Cette répartition équitable garantit une représentation homogène des deux environnements, ce qui permet une comparaison fiable de l'impact des conditions de vie rurales et urbaines sur le microbiome néonatal. Elle réduit également les biais potentiels liés à une surreprésentation géographique, et renforce ainsi la validité externe des résultats obtenus.

Une étude menée par Bäckhed et al. (2015) publiée dans *Cell Host & Microbe*, a mis en évidence que les conditions de vie (hygiène, alimentation, exposition microbienne) influencent significativement le développement du microbiote intestinal chez les nouveau-nés. Par conséquent, tenir compte du lieu de résidence dans l'analyse constitue un paramètre déterminant dans la compréhension des variations du microbiome.

IV.3.3. Répartition des participantes selon la présence des maladies chroniques

Tableau IV.3.3.1. Répartition des participantes selon la présence des maladies chroniques.

Réponse	Pourcentage (%)
Oui (présence de maladies chroniques)	21,7 %
Non (absence de maladies chroniques)	78,3 %

Répartition des maladies chroniques chez les familles:

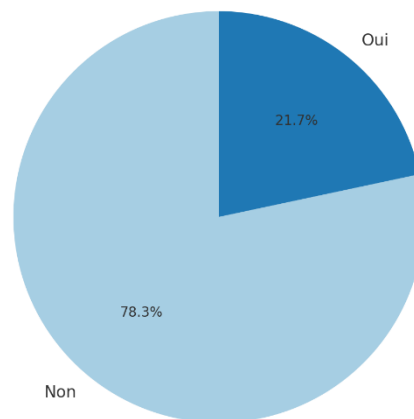


Figure IV.3.2. Diagramme circulaire de la répartition des participantes selon la présence des maladies chroniques.

IV.3.3.1. Analyse et interprétation des résultats

Les résultats de ce questionnaire montrent que 21,7 % des mères interrogées souffrent de maladies chroniques, tandis que 78,3 % ne présentent aucune affection chronique déclarée. Cette répartition met en évidence un élément important à considérer dans l'étude du microbiome néonatal, à savoir l'état de santé de la mère. D'un point de vue scientifique, la présence de maladies chroniques chez la mère — telles que le diabète, l'hypertension artérielle ou les maladies auto-immunes — est associée à des modifications physiopathologiques susceptibles d'influencer la transmission microbienne mère-enfant. Cette transmission peut se produire lors de l'accouchement (par voie basse ou césarienne) ou par le biais de l'allaitement maternel. Ces altérations peuvent modifier la diversité et la composition du microbiome intestinal du nouveau-né, ce qui pourrait avoir des répercussions sur le développement de son système immunitaire et sa santé à long terme. Par

conséquent, l'analyse de la relation entre l'état de santé maternel et la structure du microbiome chez les nouveau-nés s'avère essentielle pour mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués. Ces données offrent une base pour orienter de futures stratégies de prévention visant à améliorer la santé des mères et, indirectement, celle de leurs enfants à travers un microbiome néonatal équilibré et fonctionnel.

IV.3.4. Répartition des types de maladies chroniques dans les participantes

Tableau IV.3.4.1. Répartition des types de maladies chroniques dans les participantes.

Types de maladies	Fréquence (n)	Pourcentage (%)
Aucune	47	78,33 %
Diabète	7	11,67 %
Asthme	4	6,67 %
Hypertension artérielle	2	3,33 %

Type de maladie

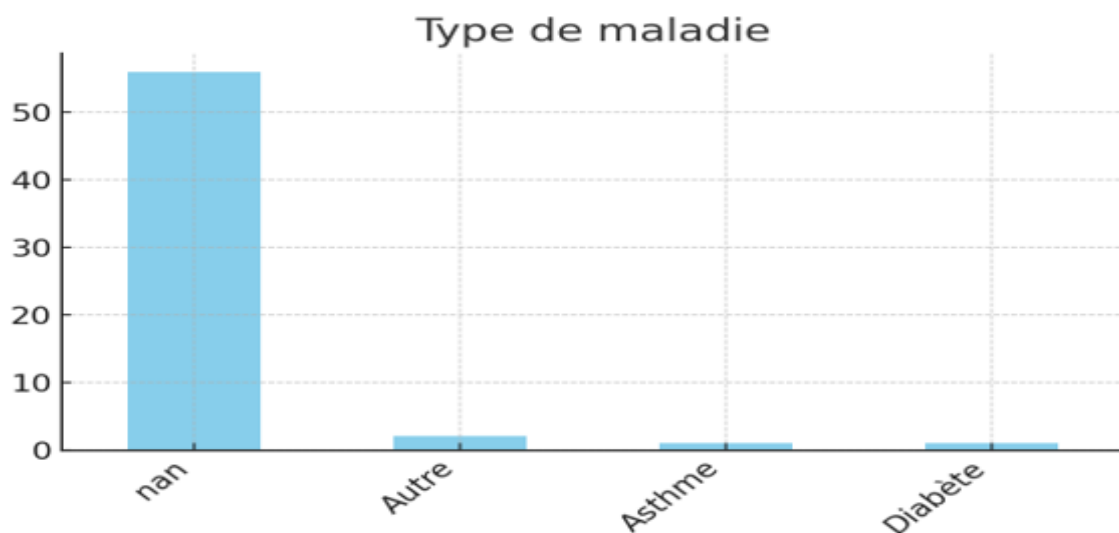


Figure IV.3.3. Diagramme en barres répartition des types de maladies chroniques dans les participantes.

IV.3.4.1. Analyse et interprétation des résultats

La répartition des types de maladies chroniques dans les familles interrogées montre une prédominance du diabète, suivi de l'asthme et de l'hypertension. Ces résultats s'inscrivent dans les données épidémiologiques nationales où ces pathologies demeurent les plus fréquentes au sein des populations adultes.

Dans le cadre de l'étude du microbiome néonatal, ces antécédents familiaux présentent un intérêt particulier. Il a été démontré que:

- Le diabète et l'obésité maternels peuvent influencer la composition microbienne du nouveau-né via des modifications du microbiome vaginal, intestinal et mammaire.
- L'asthme est associé à des altérations spécifiques du microbiote, pouvant se transmettre verticalement à l'enfant.
- L'hypertension, bien que moins étudiée en ce sens, peut indirectement affecter la santé microbienne néonatale par des complications de grossesse ou des interventions médicales (antibiotiques, césarienne...).

Ainsi, l'identification des types de maladies chroniques familiales constitue un facteur explicatif potentiel dans la variabilité du microbiome du nouveau-né, et mérite d'être intégrée dans l'analyse multivariée avec les autres variables de l'étude.

IV.3.5. Répartition des types d'accouchement

Tableau IV.3.5.1. Répartition des types d'accouchement

Types d'accouchement	Pourcentage (%)
Voie basse	63.3%
Césarienne	36.7%

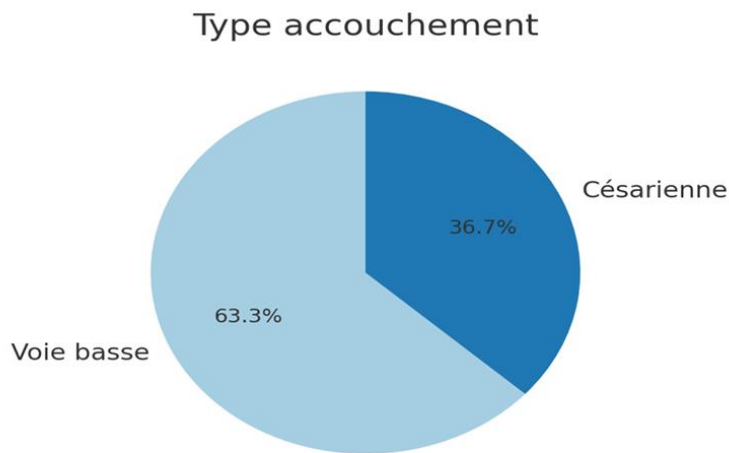


Figure IV.3.4. Diagramme circulaire répartition des Type d'accouchement

IV.3.5.1. Analyse et interprétation des résultats

La figure IV.4 montre que la majorité des nouveau-nés inclus dans l'étude sont nés par voie basse (63,3 %), tandis que 36,7 % sont nés par césarienne. Cette répartition est essentielle pour comprendre la diversité du microbiome chez le nouveau-né, car plusieurs études indiquent que l'accouchement par voie basse permet le transfert de bactéries bénéfiques de la mère à l'enfant, ce qui joue un rôle clé dans l'établissement du microbiote intestinal dès les premiers jours de vie. En revanche, les nouveau-nés par césarienne peuvent présenter un retard dans le développement de ce microbiote, ce qui pourrait avoir un impact sur leur immunité à long terme

IV.3.6. Répartition des types la Durée de la grossesse

Tableau IV.3.6.1. Répartition des types de la durée de la grossesse

La durée	Pourcentage (%)
Moins de 37 semaines	8.3%
37-40 semaines	76.7%
Plus de 40 semaines	15.0%

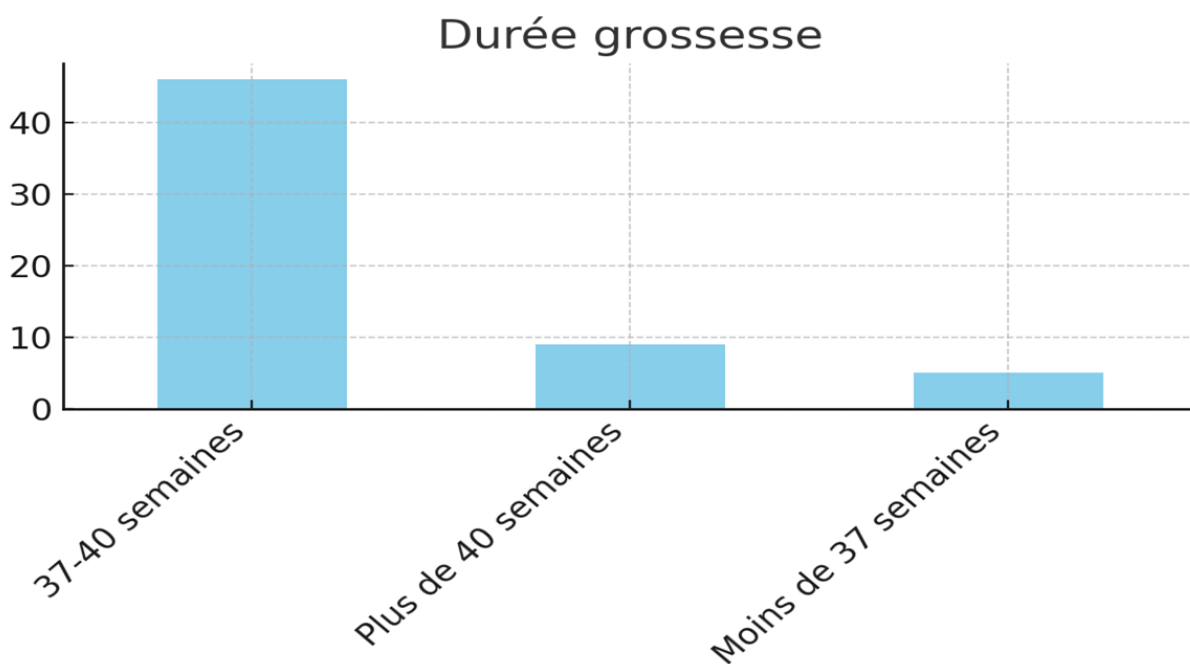


Figure IV.3.5. Graphique à barres Répartition des types de la durée de la grossesse

IV.3.6.1. Analyse et interprétation des résultats

Ces données sont importantes pour comprendre les facteurs influençant le développement du microbiome chez les nouveau-nés.

1. Grossesse à terme (37–40 semaines) :

Cette catégorie représente clairement la majorité, avec 76,7 % des cas de grossesse.

Cette période correspond à une grossesse à terme (Full-term pregnancy). Les nouveau-nés issus de grossesses à terme tendent à acquérir un microbiome intestinal plus mature et diversifié comparé aux prématurés. Ce groupe sert de référence ou de norme dans l'étude du microbiome,

où l'influence principale sur le microbiome est liée au mode d'accouchement (vaginal ou césarienne) et aux modes d'alimentation (allaitement maternel ou artificiel).

2. Naissance prématurée (moins de 37 semaines) :

Ce groupe représente 8,3 % des cas.

Cette proportion reflète les cas de naissance prématurée (Preterm birth). La prématurité est un facteur important influençant le développement du microbiome intestinal. Les enfants nés prématurément sont souvent exposés à des environnements spécifiques (comme les unités de soins intensifs néonataux – NICU) et peuvent recevoir des antibiotiques précocement, ce qui affecte directement la colonisation intestinale, la diversité microbienne, et peut entraîner une dysbiose (déséquilibre microbien).

3. Grossesse prolongée (plus de 40 semaines) :

Cette catégorie représente 15,0 %.

Elle concerne les cas de grossesse prolongée ou post-terme (Post-term pregnancy). Bien que l'impact direct du post-terme sur le microbiome néonatal soit moins étudié que celui de la prématurité, les complications associées (comme l'induction du travail ou un recours plus fréquent à la césarienne) peuvent indirectement influencer la colonisation microbienne initiale du nouveau-né.

Le tableau et les barres graphiques soulignent l'importance démographique des différentes durées de grossesse au sein de l'échantillon étudié. La durée de gestation constitue un facteur déterminant et influence sur le développement du microbiome du nouveau-né, en raison des différences observées en termes de :

- Maturité physiologique : des systèmes digestif et immunitaire.
- Modes d'accouchement : influençant l'exposition aux microbes maternels.
- Environnement postnatal : notamment l'exposition aux antibiotiques et à l'environnement hospitalier chez les prématurés.
- Modes d'alimentation : qui varient selon la durée de la grossesse et l'état de santé de l'enfant.

IV.3.7. Utilisation des antibiotiques pendant la grossesse

Tableau IV.3.7.1. Répartition des mères selon l'utilisation des antibiotiques pendant la grossesse.

Réponse	Pourcentage
Oui (13)	21,7 %
Non (47)	78,3 %

Antibiotiques grossesse

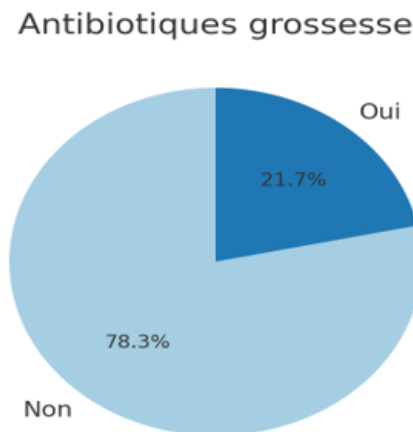


Figure IV.3.6. Diagramme circulaire répartition des mères selon l'utilisation des antibiotiques au cours de la grossesse.

IV.3.7.1. Analyse et interprétation des résultats

Selon les données recueillies, 21,7 % des mères interrogées ont rapporté avoir utilisé des antibiotiques pendant leur grossesse, contre 78,3 % qui n'en ont pas utilisé.

Sur le plan scientifique, l'exposition prénatale aux antibiotiques constitue un facteur critique pouvant influencer la transmission et la composition du microbiote chez le nouveau-né. En perturbant la flore intestinale maternelle, les antibiotiques peuvent indirectement altérer la qualité du transfert microbien lors de l'accouchement ou de l'allaitement, réduisant ainsi la diversité microbienne initiale chez le nourrisson.

Cette donnée est donc cruciale à intégrer dans l'interprétation globale des profils microbiens observés chez les nouveau-nés, notamment dans le cadre de la prévention de certaines dysbioses précoces.

IV.3.8. Répartition des mères selon le trimestre d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse

Tableau IV.3.8.1. Répartition des mères selon le trimestre d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse.

Trimestre d'exposition	Pourcentage (%)
1 ^{er} trimestre (4)	30 %
2 ^e trimestre (5)	40 %
3 ^e trimestre (4)	30 %

Trimestre ATB

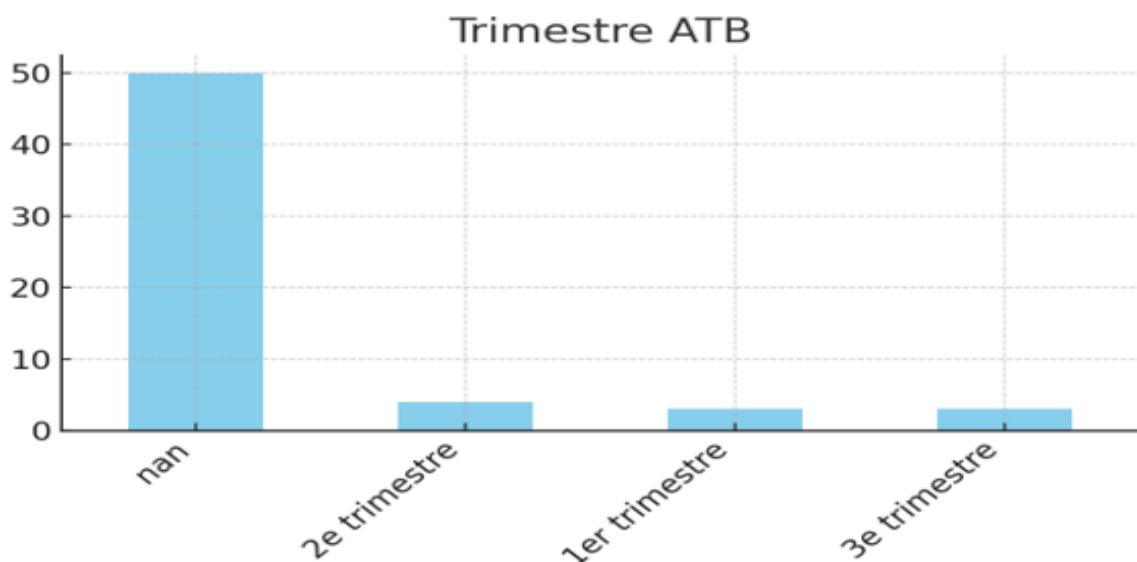


Figure IV.3.7. Graphique à barre répartition en pourcentage des trimestres d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse

IV.3.8.1. Analyse et interprétation des résultats

L'analyse de la période d'exposition aux antibiotiques pendant la grossesse montre que 40 % des mères traitées l'ont été au cours du 2^e trimestre, contre 30 % au 1^{er} trimestre et 30 % au 3^e trimestre. Cette répartition est cliniquement significative, car le moment de l'exposition peut influencer différemment le développement du microbiote néonatal. Le 1^{er} trimestre est une phase critique de l'embryogenèse, où toute perturbation microbienne ou immunitaire peut avoir des répercussions sur la tolérance fœtale.

Le 2^e trimestre, quant à lui, marque une période de maturation immunitaire, et une antibiothérapie à ce stade peut modifier le microbiote maternel, influençant indirectement le transfert microbien vers le fœtus.

Enfin, une exposition au 3^e trimestre peut avoir un impact direct sur le microbiote périnatal transmis lors de l'accouchement, en particulier si celui-ci se déroule par voie basse.

Ces données soulignent l'importance de considérer le timing de l'exposition antibiotique dans l'analyse de la colonisation microbienne néonatale.

IV.3.9. Répartition des accouchements selon le lieu

Tableau IV.3.9.1. Répartition des accouchements selon le lieu.

Lieu d'accouchement	Pourcentage (%)
Hopital	96,7 %
Domicile	3,3 %

Lieu accouchement

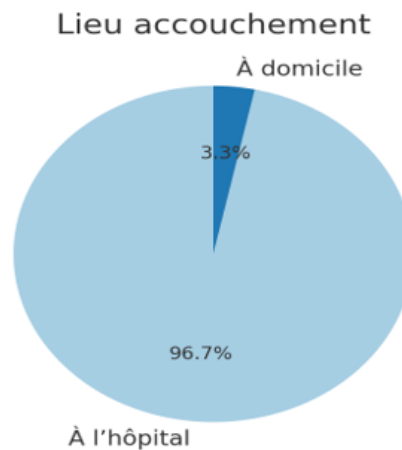


Figure IV.3.8. Diagramme circulaire répartition en pourcentage du lieu d'accouchement.

IV.3.9.1. Analyse et interprétation des résultats

La grande majorité des accouchements (96,7 %) ont eu lieu en milieu hospitalier, contre seulement 3,3 % à domicile. Ce facteur est déterminant dans l'étude du microbiome néonatal, car le lieu d'accouchement influence directement la première exposition microbienne du nouveau-né.

En milieu hospitalier, les nourrissons sont souvent exposés à une flore environnementale plus médicalisée et moins diversifiée, notamment dominée par des bactéries comme *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., ou encore *Pseudomonas* spp., souvent liées à l'environnement hospitalier.

À l'inverse, les accouchements à domicile permettent une exposition initiale plus naturelle et proche du microbiote maternel, ce qui pourrait favoriser une colonisation intestinale plus bénéfique à long terme.

Ce paramètre doit être pris en compte dans l'interprétation des profils microbiens observés chez les nouveau-nés de la cohorte étudiée.

IV.3.10. Répartition des mères selon la durée de l'allaitement maternel

Tableau IV.3.10.1. Répartition des mères selon la durée de l'allaitement maternel.

Durée de l'allaitement	Pourcentage (%)
Moins d'un mois	1,7 %
Entre 1 et 3 mois	15 %
Entre 3 et 6 mois	31,7 %
Plus de 6 mois	51,7 %

Durée allaitement

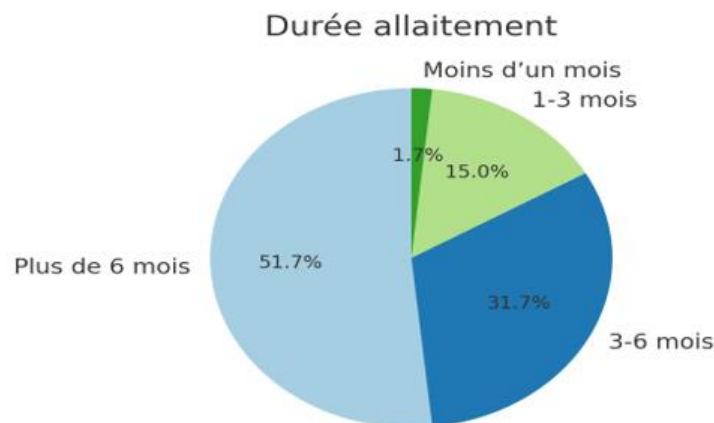


Tableau IV.3.10.2. Diagramme circulaire répartition des mères selon la durée de l'allaitement maternel.

IV.3.10.1. Analyse et interprétation

L'analyse de la durée de l'allaitement maternel montre que 51,7 % des mères ont allaité leur enfant plus de 6 mois, ce qui constitue une proportion majoritaire et très favorable au développement d'un microbiome néonatal équilibré et protecteur.

À l'inverse, 1,7 % des nourrissons n'ont bénéficié d'un allaitement que pendant moins d'un mois, et 15 % entre 1 et 3 mois, ce qui pourrait compromettre le transfert de bactéries bénéfiques via le lait maternel, notamment les Bifidobacteria et Lactobacillus.

La période de 3 à 6 mois représente 31,7 % des cas, traduisant un allaitement partiel ou transitoire.

Ces données confirment l'importance cruciale de la durée de l'allaitement dans le façonnement du microbiote intestinal du nouveau-né, en particulier durant les 1000 premiers jours de vie, période reconnue comme essentielle pour l'immunomodulation et la prévention des maladies chroniques.

IV.3.11. Répartition des mères selon la raison de l'introduction du lait infantile

Tableau IV.3.11.1. Répartition des mères selon la raison de l'introduction du lait infantile.

Raison d'introduction du lait infantile	Fréquence (n)	Pourcentage (%)
Choix personnel	25	62,5 %
Problème de santé	5	12,5%
Manque de lait	5	12,5%
Autres raisons	5	12,5 %

Raison lait infantile

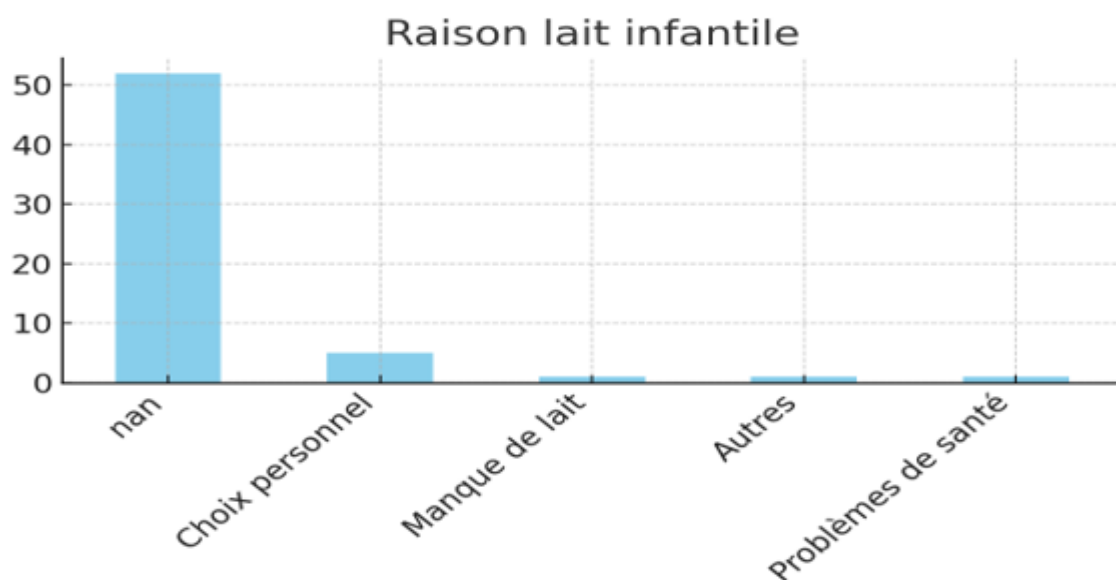


Figure IV.3.9. Répartition en barres des mères selon la raison de l'introduction du lait infantile.

IV.3.11.1. Analyse et interprétation des résultats

La raison principale de l'introduction du lait infantile chez les mères interrogées est le choix personnel, représentant 62,5 % des cas. Ce taux élevé reflète des décisions individuelles potentiellement influencées par des facteurs culturels, sociaux ou pratiques, indépendamment de raisons médicales.

Les autres raisons sont réparties équitablement entre le manque de lait, les problèmes de santé, et des raisons diverses, chacune à 12,5 %.

Ce constat suggère que les stratégies de promotion de l'allaitement maternel devraient intégrer une dimension éducative et motivationnelle, en sensibilisant les mères à l'importance du lait maternel dans le développement du microbiome intestinal du nouveau-né, et dans la prévention des infections et des pathologies inflammatoires précoces.

IV.3.12. Répartition des nourrissons selon la présence d'allergies chez les bébé

Tableau IV.3.12.1. Répartition des nourrissons selon la présence d'allergies chez les bébé.

Allergies chez le bébé	Pourcentage (%)
Oui	30%
Non	70%

Allergies bébé

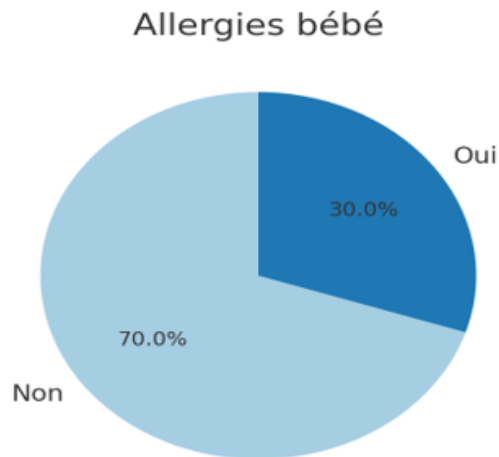


Figure IV.3.10. Diagramme circulaire répartition des nourrissons selon la présence d'allergies chez les bébé.

IV.3.12.1. Analyse et interprétation des résultats

Les résultats montrent que 30 % des nourrissons présentent des signes d'allergies, contre 70 % qui n'en présentent pas.

Ce taux relativement élevé d'allergies pourrait être lié à un déséquilibre du microbiote intestinal néonatal, connu sous le nom de dysbiose.

Plusieurs études ont démontré que les enfants allergiques présentent souvent une diversité microbienne réduite, avec une sous-représentation de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, au profit de bactéries potentiellement pro-inflammatoires.

Ces résultats soulignent l'importance de favoriser un microbiome équilibré dès la naissance, notamment à travers l'allaitement maternel prolongé et la limitation des interventions médicales perturbatrices (comme les antibiotiques précoces).

IV.3.13. Répartition des types d'allergies observées chez les bébé

Tableau IV.3.13.1. Répartition des types d'allergies observées chez les bébé.

Types d'allergies	Fréquence (n)	Pourcentage (%)
Alimentaire	5	35,7 %
Respiratoire	4	28,6 %
Autre	4	28,6 %
Cutanées	1	7,1 %

Type allergie

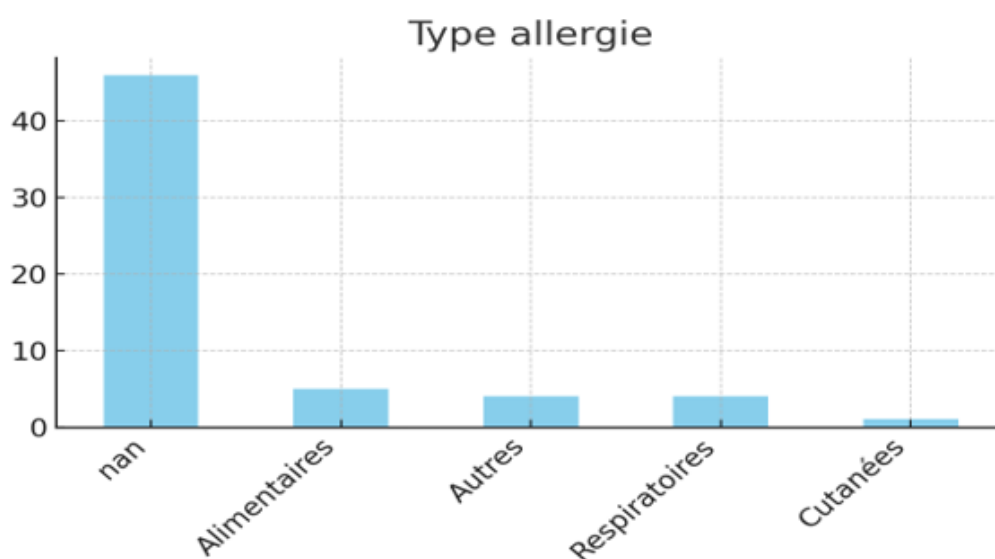


Figure IV.3.11. Diagramme en barres répartition des types d'allergies observées chez les bébé.

IV.3.13.1. Analyse et interprétation des résultats

Le diagramme en barres illustre la distribution des types d'allergies observées chez les nourrissons ayant présenté une réaction allergique.

La majorité des cas concernent des allergies alimentaires (35,7 %), suivies par des allergies respiratoires (28,6 %) et des autres types (28,6 %), tandis que les manifestations cutanées restent moins fréquentes (7,1 %).

Cette prédominance des allergies alimentaires peut être liée à un microbiote intestinal immature ou déséquilibré, caractérisé par une faible diversité bactérienne et une diminution des espèces bénéfiques (telles que *Bifidobacterium*), ce qui favorise une réponse immunitaire exacerbée et une perméabilité intestinale accrue.

De plus, la survenue d'allergies respiratoires pourrait être influencée par l'axe intestin-poumon, démontrant le rôle clé du microbiote dans le développement immunitaire systémique du nourrisson.

Conclusion

Conclusion

En conclusion de cette étude, nous affirmons que le sujet du microbiome chez le nouveau-né représente un domaine scientifique en pleine expansion, d'une importance capitale, en raison de son impact profond sur le développement du système immunitaire et l'équilibre de la santé physique et mentale de l'être humain dès les premiers instants de la vie.

Notre étude a constitué une tentative préliminaire de compréhension de certains facteurs influençant la formation du microbiome intestinal chez le nouveau-né, en s'appuyant sur une approche descriptive et analytique basée sur un questionnaire de terrain adressé aux mères de nouveau-nés. Ce travail a permis de recueillir des données environnementales, comportementales et médicales, directement ou indirectement liées à cette phase critique.

L'analyse des résultats a révélé un ensemble de facteurs récurrents potentiellement influents, notamment : le mode d'accouchement (naturel ou césarien), le type d'allaitement (naturel ou artificiel), l'utilisation d'antibiotiques, la santé générale de la mère et l'environnement entourant le nouveau-né. Ces données concordent largement avec les travaux scientifiques récents, conférant à cette étude une crédibilité initiale malgré son caractère descriptif.

Cependant, certaines limites méthodologiques ne peuvent être ignorées, en particulier l'absence d'analyses microbiologiques directes, qui auraient permis de confirmer les hypothèses de terrain, ainsi que la subjectivité ou les oublis possibles dans les réponses au questionnaire, notamment concernant les détails médicaux.

Par conséquent, nous recommandons la réalisation d'études complémentaires à l'avenir, combinant analyses de laboratoire d'échantillons fécaux et questionnaires précis, avec un suivi longitudinal des enfants sur le moyen et long terme. Nous insistons également sur la nécessité d'intégrer ce sujet dans les programmes de sensibilisation des futures mères ainsi que dans la formation médicale et paramédicale.

Nous espérons personnellement pouvoir poursuivre cette recherche au niveau doctoral ou par le biais de futures études scientifiques, afin de développer une compréhension plus approfondie et globale du microbiome chez le nouveau-né, contribuant ainsi à l'avancement scientifique et pratique dans notre environnement local et au-delà.

En conclusion, nous espérons que cette étude aura, ne serait-ce qu'à un modeste niveau, contribué à ouvrir le débat sur l'importance du microbiome en tant qu'élément clé de la santé publique et comme un domaine fertile pour la recherche scientifique en microbiologie appliquée,

particulièrement dans notre contexte local qui nécessite encore des études approfondies dans ce domaine prometteur.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- _ Abellan-Schneyder, I., Machado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., ... & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *Msphere*, 6(1), 10-1128.
- _ Alavi, A. F., et al. (2024). Evaluation of biochemical methods for bacterial identification: Insights from microplate assays. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 31(6), 1504–1511.
- _ Alcazar, C. G. M., Paes, V. M., Shao, Y., Oesser, C., Miltz, A., Lawley, T. D., ... & Field, N. (2022). The association between early-life gut microbiota and childhood respiratory diseases: a systematic review. *The Lancet Microbe*, 3(11), e867-e880.
- _ Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Chari, R. S., ... & Kozyrskyj, A. L. (2013). Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Cmaj*, 185(5), 385-394.
- _ Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111
- _ Cantón, R., Ramos, P. D. L., García-Botella, A., García-Lledó, A., Hernández-Sampelayo, T., Gómez-Pavón, J., ... & Bouza, E. (2024). Human intestinal microbiome: Role in health and disease. *Revista Española de Quimioterapia*, 37(6), 438.
- _ Comtet-Marre, S., Chakoory, O., Rochette, E., Gallot, D., Merlin, E., Pons, M., & Peyret, P. (2024). Microbiote intestinale : de la stérilité chez les nouveau-nés à la complexité des interactions chez l'adulte. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 59(3), 172-183.
- _ Dahiya, D., & Nigam, P. S. (2023). Biotherapy using probiotics as therapeutic agents to restore the gut microbiota to relieve gastrointestinal tract inflammation, IBD, IBS and prevent induction of cancer. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5748.
- _ Dierikx, T. H., Visser, D. H., Benninga, M. A., Van Kaam, A. H. L. C., De Boer, N. K. H., De Vries, R., ... & De Meij, T. G. J. (2020). The influence of prenatal and intrapartum antibiotics on intestinal microbiota colonisation in infants: a systematic review. *Journal of Infection*, 81(2), 190-204.
- _ Dietert, R. R. (2013). Natural childbirth and breastfeeding as preventive measures of immune-microbiome dysbiosis and misregulated inflammation.

- _ Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
- _ Forno, E., Onderdonk, A. B., McCracken, J., Litonjua, A. A., Laskey, D., Delaney, M. L., ... & Celedón, J. C. (2008). Diversity of the gut microbiota and eczema in early life. *Clinical and Molecular Allergy*, 6, 1-9.
- _ Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., ... & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543-547.
- _ Gritz, E. C., & Bhandari, V. (2015). The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in pediatrics*, 3, 17.
- _ Inchingolo, F., Inchingolo, A. M., Latini, G., Ferrante, L., de Ruvo, E., Campanelli, M., ... & Dipalma, G. (2024). Difference in the intestinal microbiota between Breastfeed Infants and Infants Fed with Artificial milk: a systematic review. *Pathogens*, 13(7), 533.
- _ Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(29), 8787.
- _ Jiménez, E., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., ... & Rodríguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*, 159(3), 187-193.
- _ Kalbermatter, C., Fernandez Trigo, N., Christensen, S., & Ganal-Vonarburg, S. C. (2021). Maternal microbiota, early life colonization and breast milk drive immune development in the newborn. *Frontiers in immunology*, 12, 683022.
- _ Kang, D. W., Adams, J. B., Gregory, A. C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., ... & Krajmalnik-Brown, R. (2017). Microbiota transfer therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, 5, 1-16.
- _ Kim, S., Ndwandwe, C., Devotta, H., Kareem, L., Yao, L., & O'Mahony, L. (2025). Role of the microbiome in regulation of the immune system. *Allergy International*.
- _ Korpela, K. (2021). Impact of delivery mode on infant gut microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 77(Suppl. 3), 11-19.

- _ Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B., & Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 237-264.
- _ Li, N., Zhao, C., Zhang, P., Wu, S., Dou, X., Xu, S., ... & Yu, C. (2024). The role of gut microbiota associated metabolites in digestive disorders. *Engineered Regeneration*.
- _ Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson Education.
- _ Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., ... & Knol, J. (2016). Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PloS one*, 11(6), e0158498.
- _ Melekoglu, E., Yılmaz, B., Çevik, A., Gökyıldız Sürücü, Ş., Avcıbay Vurgeç, B., Gözüyeşil, E., ... & Ozogul, F. (2023). The impact of the human milk microbiota in the prevention of disease and infant health. *Breastfeeding Medicine*, 18(6), 413-430.
- _ Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrioni, F., Mahony, J., ... & Ventura, M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*, 81(4), 10-1128.
- _ Momose, Y., Hirayama, K., & Itoh, K. (2008). Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93, 141-149.
- _ Nicolas, G. R., & Chang, P. V. (2019). Deciphering the chemical lexicon of host–gut microbiota interactions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(6), 430-445.
- _ O'Callaghan, J., Buttó, L. F., MacSharry, J., Nally, K., & O'Toole, P. W. (2012). Influence of adhesion and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* on the intestinal epithelial cell transcriptional response. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5196-5203.
- _ Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., ... & Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- _ Schirmer, M., Garner, A., Vlamakis, H., & Xavier, R. J. (2019). Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Microbiology*, 17(8), 497-511.
- _ Simner, P. J., et al. (2024). Evolving strategies in microbe identification—a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*

- _ Zimmermann, P., & Curtis, N. (2019). The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota-a systematic review. *Journal of Infection*, 79(6), 471-489.
- _ "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *nature* 486, no. 7402 (2012): 207-214.
- _ Albert, M. J., Mathan, V. I., & Baker, S. J. (1980). Vitamin B12 synthesis by human small intestinal bacteria. *Nature*, 283(5749), 781-782.
- _ Alhanout, K., Malesinki, S., Vidal, N., Peyrot, V., Rolain, J. M., & Brunel, J. M. (2010). New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1688-1693.
- _ Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 473(7346), 174-180.
- _ Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 473(7346), 174-180.
- _ Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., ... & Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host & microbe*, 12(5), 611-622.
- _ Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*, 307(5717), 1915-1920.
- _ Baumann-Dudenhoeffer, A. M., D'Souza, A. W., Tarr, P. I., Warner, B. B., & Dantas, G. (2018). Infant diet and maternal gestational weight gain predict early metabolic maturation of gut microbiomes. *Nature medicine*, 24(12), 1822-1829.
- _ Blottière, H. M., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., & Doré, J. (2013). Human intestinal metagenomics: state of the art and future. *Current opinion in microbiology*, 16(3), 232-239.
- _ Bocci, V. (1992). The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspectives in Biology and Medicine*, 35(2), 251-260.
- _ Chen, Y., Wang, J., & Liu, H. (2022). Application of ELISA in gut inflammation and microbiota research: A review. *Frontiers in Immunology*, 13, 849521.
- _ Chow, J., & Mazmanian, S. K. (2010). A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell host & microbe*, 7(4), 265-276.

- _Chu, D. M., Ma, J., Prince, A. L., Antony, K. M., Seferovic, M. D., & Aagaard, K. M. (2017). Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature medicine*, 23(3), 314-326.
- _Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270.
- _Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *science*, 326(5960), 1694-1697.
- _Dubos, R., Schaedler, R. W., Costello, R., & Hoet, P. (1965). Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*, 122(1), 67-76.
- _El Kaoutari, A., Armougom, F., Raoult, D., & Henrissat, B. (2014). Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *Médecine/sciences*, 30(3), 259-265.
- _El Kaoutari, A., Armougom, F., Raoult, D., & Henrissat, B. (2014). Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides. *Médecine/sciences*, 30(3), 259-265.
- _Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 55-71.
- _García, M., Torres, A., & Fernandez, L. (2023). Immunofluorescence microscopy in gut microbiota research: Current applications and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1109876
- _Garcia, P., Lopez, J., & Martinez, F. (2021). Immunoassays for detection of bacterial pathogens: applications and limitations. *Journal of Immunological Methods*, 488, 112921.
- _Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312(5778), 1355-1359.
- _Gosalbes, M. J., Durban, A., Pignatelli, M., Abellan, J. J., Jimenez-Hernandez, N., Pérez-Cobas, A. E., ... & Moya, A. (2011). Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PloS one*, 6(3), e17447.
- _Gschwind, R., Fournier, T., Butel, M. J., & Wydau-Dematteis, S. (2018). Établissement du microbiote-Une colonisation in utero déterminante pour la santé future ? *médecine/sciences*, 34(4), 331-337
- _Hooks, K. B., & O'Malley, M. A. (2017). Dysbiosis and its discontents. *MBio*, 8(5), 10-1128.

- _Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An introduction to performing immunofluorescence staining (pp. 299-311). Springer New York.
- _Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- _Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2023). Molecular methods in microbiology: past, present, and future. *Clinical Microbiology Reviews*, 36(1), e00014-22.
- _Jia, W., Whitehead, R. N., Griffiths, L., Dawson, C., Waring, R. H., Ramsden, D. B., ... & Cole, J. A. (2010). Is the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* relevant to Crohn's disease? *FEMS microbiology letters*, 310(2), 138-144.
- _Jiang, X., Liu, Y., & Wang, Z. (2023). Advances and challenges in 16S rRNA gene sequencing for microbiota analysis. *Frontiers in Microbiology*, 14, 112233.
- _Kaoutari, A. E., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 497-504.
- _Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkiyuokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., ... & Palva, A. (2007). The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, 133(1), 24-33.
- _Khan, M. A., Ahmed, S., & Malik, A. (2020). Advances in immunological methods for microbial detection. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1342–1354
- _Kim, H., Park, J., & Lee, S. (2022). High-throughput sequencing in gut microbiota analysis: applications and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 13, 816234
- _Klaassens, E. S., Ben-Amor, K., Vriesema, A., Vaughan, E. E., & de Vos, W. (2011). The fecal bifidobacterial transcriptome of adults: a microarray approach. *Gut microbes*, 2(4), 217-226.
- _Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 323-35.
- _Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., ... & Hattori, M. (2007). Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *Dna Research*, 14(4), 169-181.
- _La Scola, B. (2015). Nouvelle technique d'étude du microbiote : la culturomique. *Revue francophone des laboratoires*, 2015(469), 83-87.

- _Lagier, J. C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., ... & Raoult, D. (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12), 1185-1193.
- _Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B., & Raoult, D. (2018). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00001-17.
- _Lagier, J. C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., & Raoult, D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 136.
- _LeBlanc, J. G., Milani, C., De Giori, G. S., Sesma, F., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 160-168
- _Lee, K. A., Luong, M. K., Shaw, H., Nathan, P., Bataille, V., & Spector, T. D. (2021). The gut microbiome: what the oncologist ought to know. *British journal of cancer*, 125(9), 1197-1209.
- _Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219-232.
- _Ley, R. E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Current opinion in gastroenterology*, 26(1), 5-11.
- _Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848.
- _Li, K., Bihan, M., & Methé, B. A. (2013). Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome. *PloS one*, 8(5), e63139.
- _Li, X., & Zhang, Q. (2023). Advances in ELISA techniques for gut microbiota analysis. *Journal of Immunological Methods*, 513, 113482
- _Liu, Y., Zhang, Z., & Li, J. (2022). Morphological and biochemical characterization of gut bacteria: methods and applications. *Journal of Microbiological Methods*, 194, 106422.
- _Lu, Z. (2020). Microbiota research: From history to advances. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 145, p. 01014). EDP Sciences.
- _Margolles, A., & Suárez, J. E. (2021). The human microbiota: general concepts, composition, distribution and functions. *Journal of Spanish Society of Anti-Aging Medicine and Longevity and Latin-American Federation of Anti-Aging Medicine Societies*, 8.

- _Metchnikoff, I. I. (2004). *The prolongation of life: optimistic studies*. Springer Publishing Company.
- _Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., ... & Ventura, M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*, 81(4), 10-1128.
- _Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (2021). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 49(7), e35.
- _Morreale, C., Giaroni, C., Baj, A., Folgori, L., Barcellini, L., Dhimi, A., ... & Bresesti, I. (2023). Effects of perinatal antibiotic exposure and neonatal gut microbiota. *Antibiotics*, 12(2), 258.
- _Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., Meharg, C., Thomson, J. M., Russell, R. K., Berry, S. H., ... & Hold, G. L. (2015). The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes and infection*, 17(4), 304-310.
- _Parracho, H. M., Bingham, M. O., Gibson, G. R., & McCartney, A. L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of medical microbiology*, 54(10), 987-991.
- _Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024-1033.
- _Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ... & Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), 59-65.
- _Ramakrishna, B. S., & Roediger, W. E. W. (1990). Bacterial short chain fatty acids: their role in gastrointestinal disease. *Digestive diseases*, 8(6), 337-345.
- _Ramakrishna, B. S., Gee, D., Weiss, A., Pannall, P., Roberts-Thomson, I. C., & Roediger, W. E. (1989). Estimation of phenolic conjugation by colonic mucosa. *Journal of clinical pathology*, 42(6), 620-623.
- _Shulman, S. T., Friedmann, H. C., & Sims, R. H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clinical infectious diseases*, 45(8), 1025-1029.
- _Sjögren, Y. M., Jenmalm, M. C., Böttcher, M. F., Björkstén, B., & Sverremark-Ekström, E. (2009). Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical & Experimental Allergy*, 39(4), 518-526.
- _Smith, J. A., Lee, C. H., & Patel, R. (2022). Advances in immunofluorescence techniques for microbial detection. *Journal of Microbiological Methods*, 194, 106414.

- _Smith, R., & Johnson, P. (2023). Clinical applications of bacterial culture in infectious disease diagnosis. *Infectious Disease Reports*, 15(2), 124-134
- _Smith, R., & Lee, T. (2022). Applications of immunological techniques in clinical microbiology. *Clinical Laboratory Science*, 35(3), 150-160.
- _Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., ... & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- _Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota- -masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013 ; 11 : 227-238.
- _Subramanian, S., Huq, S., Yatsunenکو, T., Haque, R., Mahfuz, M., Alam, M. A., ... & Gordon, J. I. (2014). Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*, 510(7505), 417-421.
- _Subramanian, S., Huq, S., Yatsunenکو, T., Haque, R., Mahfuz, M., Alam, M. A., ... & Gordon, J. I. (2014). Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature*, 510(7505), 417-421.
- _Tissier, M. H. (1899). La reaction chromophile d'Escherich et le Bacterium coli. *CR Soc Biol*, 51, 943-945.
- _Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of physiology*, 587(17), 4153-4158.
- _Vangay, P., Ward, T., Gerber, J. S., & Knights, D. (2015). Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. *Cell host & microbe*, 17(5), 553-564.
- _Veillon, A., & Zuber, A. (1898). Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch Med Exp*, 10, 517-545.
- _Wang, X., Chen, Y., & Zhao, L. (2021). Advances in quantitative analysis of gut microbiota using molecular techniques. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695217.
- _Wang, X., Chen, Y., & Zhao, L. (2021). Advantages of culture-based methods in studying gut microbiota function. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695217.
- _Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6578–6583.

_Windey, K., De Preter, V., & Verbeke, K. (2012). Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular nutrition & food research*, 56(1), 184-196.

_Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... & Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature*, 486(7402), 222-227.

_Younge, N. (2023). Influence of infant microbiome on health and development. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 67(5), 224.

_Zhao, Q., & Li, Y. (2020). Functional gene detection in microbiota studies using molecular approaches. *Microbial Ecology*, 80(4), 909-919.