



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



Année :2022

N° : MM302022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE BIOTECHNOLOGIE MÉDICALE

Intitulé

Rôle du laboratoire dans l'étude du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré

Soutenu par :
Gaouzi Zainab

Soutenu le :
19/07/22

Devant le jury composé de :

Pr. BENKIRANE Souad, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.

Présidente

Pr. TLIGUI Houssain, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.

Encadrant

Pr. IBRAHIMI Azeddine, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.

Examineur

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE BIOTECHNOLOGIE MÉDICALE

Intitulé

Rôle du laboratoire dans l'étude du microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré

Soutenu par :
Gaouzi Zainab

Soutenu le :
19/07/22

Devant le jury composé de :

Pr. BENKIRANE Souad, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.

Présidente

Pr. TLIGUI Houssain, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.

Encadrant

Pr. IBRAHIMI Azeddine, Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.

Examineur

Remerciements

Mes vifs remerciements sont adressés à toutes les personnes qui ont aidé ou contribué et m'ont facilité la tâche de mener à terme ce travail. Je leur exprime toutes mes sincères reconnaissance et gratitude pour leur aide et leur soutien et aussi pour les précieux conseils et l'orientation qu'ils ont bien voulu me réserver durant toute la période de préparation de ce travail, et particulièrement :

Aux responsables, au corps professoral et à l'équipe pédagogique du Master de biotechnologie médicale de la Facultés de médecine et de pharmacie de RABAT, dont je suis fière d'y étudier, pour les efforts qu'ils n'ont jamais cessé de déployer en vue de nous prodiguer une formation de très haut niveau et selon les standards les plus élevés en la matière et dans les conditions les plus adéquates.

Au professeur TLIGUI Houssain de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'encadrer ce travail et de le diriger avec tant d'intérêt, de patience et de compréhension et aussi de ses précieux conseils et de son écoute et du temps qu'il a bien voulu me consacrer malgré ses obligations et son emploi du temps chargé.

Ainsi, j'exprime ma profonde gratitude au professeur BENKIRAN Souad pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Son savoir, son expérience et sa manière d'enseigner, me sont d'un précieux apport.

J'aimerais remercier Professeur IBRAHIMI Azeddine pour l'intérêt porté à mon travail, sa présence au sein de mon jury constitue pour moi un grand honneur. Ses qualités professionnelles et humaines me servent d'exemple.

Résumé :

Notre tube digestif abrite plus de 10 milliards de microorganismes, l'ensemble de ces micro-organismes (bactéries, virus, parasites et champignons), constitue le microbiote intestinal humain. Son rôle est de mieux en mieux connu et les chercheurs tentent aujourd'hui de comprendre les liens entre son déséquilibre et certaines pathologies.

La présence des microorganismes dans le tube digestif est connue depuis des siècles, et il a été supposé depuis le temps que ces microorganismes et le tube digestif (Flore intestinale) vivent en symbiose. Mais les moyens techniques disponibles pour étudier le microbiote étaient limités, en réalité une minorité d'espèces bactériennes du microbiote intestinal qui pouvait être cultivée.

Avec l'évolution de la biotechnologie et les techniques de détection des microorganismes l'étude du microbiote intestinal a connu un nouvel élan. Les scientifiques sont désormais intéressés à étudier le microbiote intestinal et les interactions microorganismes-hôte.

Une étude du microbiote intestinal chez des nouveaux nés prématurés a été réalisée au niveau du laboratoire de Recherche du centre hospitalier CHU Ibn Sina. La détection des microorganismes colonisant la flore intestinale dès le jeune âge a été réalisée utilisant la PCR en temps réel sur 350 selles prélevées de 50 patients.

Dans ce contexte ce travail comporte un aperçu bibliographique sur le microbiote intestinal chez le nouveau-né, les bactéries qui font la flore intestinale des nouveaux nés et leurs classifications, suivie par les méthodes d'étude les plus fréquentes lors de son étude.

Ce travail comporte également toutes les techniques utilisées lors de l'étude du microbiote intestinale des 50 prématurés. Les détails du choix des phylums visés dans l'étude, des détails sur la méthode de conservation des selles, sur la technique des extractions, sur les amorces utilisées, l'interprétation des résultats.

Mots clés : Microbiote intestinal, PCR en temps réel, Phylums, Détection des microorganismes.

Abstract :

Our digestive tract is home to more than 10 billion microorganisms, all these microorganisms (bacteria, viruses, parasites and fungi) constitute the human intestinal microbiota. Its function is becoming increasingly well known and researchers are now trying to understand the links between its imbalance and certain pathologies.

The presence of microorganisms in the digestive tract has been known for centuries, and it has been assumed that these microorganisms and the digestive tract (intestinal flora) live in symbiosis. But the technical means available to study the microbiota were limited, actually a minority of bacterial species of the intestinal microbiota could be cultured.

With the evolution of biotechnology and the techniques of detection of microorganisms the study of the intestinal microbiota has received a new impetus. Scientists are now interested in studying the intestinal microbiota and the microorganism-host interactions.

A study of the intestinal microbiota in newborns has been conducted at the research laboratory of the CHU Ibn Sina hospital center, the detection of microorganisms colonizing the intestinal flora from the young age was realized using the PCR in real time on 350 stools collected from 50 patients.

In this context, this work includes a bibliographic overview of the intestinal microbiota in the newborn, the microorganisms that colonize the intestinal flora of newborns and their classification, followed by the most frequent methods of studies during the study.

This work also includes all the techniques used in the study of the intestinal microbiota of 50 premature babies. It also includes the details of how the phyla choice was made, how the stools are conserved, the technique of extractions, the primers used, the interpretation of the qPCR results.

Key words: Intestinal microbiota, Real-time PCR, Phyla, Detection of microorganisms.

الملخص:

بكتيريا الأمعاء هي مجموعات من البكتيريا تعيش في الأمعاء، تشمل أنواعا متعددة، ويؤثر

وجودها وتوازنها على صحة الشخص.

ويبلغ عدد البكتيريا التي تعيش في الأمعاء أكثر من 10 مليارات ، ومنها بكتيريا صديقة تشكل أكثر من 85%

من مجموع بكتيريا الأمعاء، وتعيش البكتيريا في الأمعاء في توازن مع بعضها ومع الجسم، ويؤدي اختلال هذا التوازن إلى حدوث مشكلات أو أمراض.

إن وجود الكائنات الحية الدقيقة في الجهاز الهضمي معروف منذ قرون ، وقد افترض منذ فترة طويلة أن هذه

الكائنات الحية الدقيقة والجهاز الهضمي (الجراثيم المعوية) تعيش في تكافل. لكن الوسائل التقنية المتاحة لدراسة الجراثيم كانت محدودة ، و مع تطور التكنولوجيا وتقنيات الكشف عن الكائنات الحية الدقيقة ، شهدت دراسة الجراثيم المعوية دفعة جديدة. بحيث أنه يهتم العلماء الآن بدراسة تفاعلات ميكروبيوتا الأمعاء والكائنات الحية الدقيقة .

تم إجراء دراسة الجراثيم المعوية عند الأطفال المولودون قبل أوانهم في مختبر الأبحاث (مستشفى CHU ابن

سينا). تم إجراء الكشف عن الكائنات الحية الدقيقة التي استعمرت البيت الجرثومي المعوي منذ الصغر باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي (qPCR) على 350 مولود مأخوذة من 50 مريضاً.

في هذا السياق ، يتضمن هذا العمل لمحة ببيولوجرافية عن الجراثيم المعوية عند الأطفال حديثي الولادة ، والبكتيريا

التي تشكل الفلورا المعوية لحديثي الولادة وتصنيفاتها ، متبوعة بأساليب الكشف الأكثر إستخداما أثناء دراستها.

يشتمل هذا العمل أيضاً جميع التقنيات المستخدمة أثناء دراسة الجراثيم المعوية لـ 50 طفلاً مولوداً قبل الأوان. و تفاصيل اختيار فروع البكتيريا المستهدفة في هته الدراسة ، تفاصيل عن طريقة الحفاظ على عينة ، وتقنية استخراجها ، وتفسير النتائج المحصل عليها .

الكلمات المفتاحية: ميكروبيوتا الأمعاء ، تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي ، فروع البكتيريا ، الكشف عن

الكائنات الحية الدقيقة.

Liste des abréviations :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique.

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction).

UPGM : Méthode de groupe de paires non pondérée avec moyenne arithmétique (Unweighted pair group method with arithmetic mean).

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

NGS : Séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing).

PGM : Machine à génome personnel (Personal Genome Machine).

SOLiD : Séquençage par ligation oligonucléotidique et détection (sequencing by oligonucleotide ligation and detection).

Ta : Température d'hybridation (annealing température).

Taq pol : Taq polymérase.

ADNm : Acide DésoxyriboNucléique matrice.

FRET : Transfert d'énergie de résonance de fluorescence (Fluorescence resonance energy transfer).

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire.

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique.

PBS : Phosphate buffer saline.

RNase : Ribonuclease.

ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique.

UV : Lumière ultra-violet.

Ct : Seuil de cycle (Threshold cycle).

ELISA : Le dosage immuno-enzymatique (enzyme-linked immunosorbent assay).

MALDI-TOF : Désorption/ionisation laser assistée par matrice (Matrix-assisted laser desorption/ionization).

NIR : Spectroscopie infrarouge proche (Near-infrared spectroscopy).

dPCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne numérique (Digital Polymerase Chain Reaction).

Liste des figures :

<u>Figure 1</u> : Microbiote intestinal.....	3
<u>Figure 2</u> : Méconium brun d'un nouveau-né humain.....	6
<u>Figure 3</u> : Histogramme simplifié de l'évolution de la classification.....	10
<u>Figure 4</u> : Carl Von Linné.....	11
<u>Figure 5</u> : Arbre phylogénétique sous différentes formes.....	12
<u>Figure 6</u> : Culture bactérienne.....	14
<u>Figure 7</u> : Métagénomique par séquençage du gène 16s.....	16
<u>Figure 8</u> : Métagénomique par séquençage et assemblage.....	17
<u>Figure 9</u> : Le principe de la PCR.....	19
<u>Figure 10</u> : L'amplification de l'ADN matrice au fur et à mesure des cycles.....	19
<u>Figure 11</u> : Le détecteur qui surveille la fluorescence.....	20
<u>Figure 12</u> : La fluorescence du Syber Green.....	21
<u>Figure 13</u> : La fluorescence de la sonde TaqMan.....	21
<u>Figure 14</u> : Prélèvements des selles.....	23
<u>Figure 15</u> : Les 9 articles de l'étude du microbiote intestinal.....	24
<u>Figure 16</u> : Résumé des informations des articles étudiés.....	24
<u>Figure 17</u> : Les 6 articles de l'étude du microbiote intestinal.....	25
<u>Figure 18</u> : Liste des amorces et des sondes des gènes ARN 16S des bactéries recherchées.	27
<u>Figure 19</u> : Conservation des échantillons.....	29
<u>Figure 20</u> : Protocole de l'extraction.....	32
<u>Figure 21</u> : Spectrophotomètre à microvolumes (nanodrop).....	33
<u>Figure 22</u> : Kits du master mix de la PCR quantitative.....	35

<u>Figure 23</u> : Exemple de résultat du nanodrope (spectrophotomètre à microvolumes).....	37
<u>Figure 24</u> : résultats PCR en temps réel. A : émission de fluorescence par SYBER Green. B : émission de fluorescence par sonde TaqMan.....	39
<u>Figure 25</u> : Tracé d'amplification PCR en temps réel montrant les trois phases.....	42
<u>Figure 26</u> : Graphe d'amplification du contrôle positif, contrôle négatif et d'un échantillon dans lequel l'échantillon franchit la ligne de seuil plus tard que le contrôle positif. NB : Le contrôle négatif n'atteint pas le seuil car il ne contient pas d'ADN matrice initial à amplifier.....	42
<u>Figure 27</u> : (A) Graphe d'amplification en échelle linéaire. (B) Graphe d'amplification en échelle semi-logarithmique.....	43
<u>Figure 28</u> : Graphe d'amplification de 3 échantillons avec contrôle positif et négatif.....	44
<u>Figure 29</u> : Résumé des interprétations des résultats de la PCR en temps réel pour chaque patient, + : présence de bactérie, - : absence de bactérie.....	45

Liste des Tableaux :

<u>Tableau 1</u> : Sybergreen Programme.....	34
<u>Tableau 2</u> : Taqman Programme.....	34
<u>Tableau 3</u> : Programme de la plaque.....	35
<u>Tableau 4</u> : Taq-polymerase kit: Luna Universal Probe qPCR Master Mix.....	36
<u>Tableau 5</u> : Sybergreen : Luna Universal q PCR Master Mix.....	36
<u>Tableau 6</u> : Valeurs optimales des ratios qui détermine la pureté des acides nucléiques...	38
<u>Tableau 7</u> : les différences entre le Syber Green et la TaqMan en anglais.....	40

SOMMAIRE

I. Introduction.....	1
II. Revue bibliographique.	2
1. Microbiote intestinal chez le nouveau-né :	2
a) Définition du microbiote :	2
b) Différents types du microbiote :.....	3
c) Le microbiote intestinal chez les nouveaux nés :	4
i. Généralités :	4
ii. Source du microbiote intestinal :	5
2. Les micro-organismes constituant les selles chez le nouveau-né :.....	6
a) Définition des micro-organismes :	6
b) Types des micro-organismes intestinaux chez le nouveau-né :	7
i. Non pathogènes :	7
ii. Pathogènes :	8
c) Classification des micro-organismes :.....	9
i. Histoire :	9
ii. Nomenclature des organismes :	13
III. Méthodes d'étude de biologie moléculaire du microbiote intestinal.	14
1. Métagénomique :.....	15
2. Méthode classique : Réaction en chaine quantitative en temps réel qPCR:	18
IV. Matériel et méthodes.	22
1. Les échantillons :.....	22
2. Méthode de travail :.....	23
3. Les bactéries colonisant le microbiote intestinal du nouveau-né :.....	23
4. Amorces :	26
5. Conservation :	27

6. Extraction :	29
7. Quantification de l'ADN issu de l'extraction :	32
8. Amplification en chaine polymérase quantitative : ..	34
V. Résultats et discussion :	37
1. Résultats de la quantification de l'ADN extrait :	37
2. Résultats de la PCR en temps réel :	38
a) Les deux technologies d'émission de fluorescence : la TaqMan et SYBER Green :	38
b) L'interprétation de la PCR :	41
c) Exemple d'interprétation de nos résultats.	43
3. Autres techniques d'étude du microbiote :	47
VI. Conclusion :	49
VII. Bibliographie :	50

I. Introduction.

L'évolution du domaine de la biotechnologie et la génomique, ont donné naissance à l'application des techniques modernes de génomique et de biologie moléculaire à l'étude des communautés d'organismes microbiens dans leur environnement(1). Ce domaine d'étude en plein essor a entraîné des avancées significatives qui ont facilité l'étude du microbiome humain(2).

Le microbiome humain est une communauté microbienne décrite comme la somme de toute la vie microbienne vivant dans ou sur le corps humain(3). C'est une entité qui a de vastes effets métaboliques, nutritionnels et immunologiques sur l'hôte. Elle a suscité beaucoup d'intérêt au sein de la communauté de la recherche biomédicale.

Le microbiome évolue chez un hôte sain de la naissance à la mort, en l'ajustant constamment pour maintenir un équilibre avec le système immunitaire de l'hôte. L'évolution continue du microbiome humain après la naissance est régie par des facteurs de l'hôte tels que le système immunitaire adaptatif et inné, ainsi que par des facteurs externes tels que l'alimentation, les médicaments, l'exposition aux toxines, et les maladies(3,4).

L'étude du microbiote intestinal est particulièrement importante car il joue un rôle essentiel dans le maintien d'un état sain chez l'hôte en régulant les fonctions de maintien de la barrière intestinale intacte, le métabolisme alimentaire, l'homéostasie énergétique, l'inhibition de la colonisation par des organismes pathogènes et la régulation des réponses immunitaires(3–5). Les perturbations de la composition du microbiote intestinal (appelée dysbiose intestinale) induite par de nombreux facteurs o(2) ont été associées à un certain nombre de maladies humaines, notamment les troubles gastro-intestinaux, l'obésité, les accidents vasculaires cérébraux, le cancer, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde, les allergies et les maladies liées au système nerveux central tel que la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer(6–9).

Les fonctions bénéfiques du microbiote intestinal sont acquises en même temps que la colonisation initiale par les bactéries, se développant en un processus complexe essentiel à l'humain qui commence dès la naissance et se poursuit pendant les 2 à 3 premières années de vie en subissant des changements de densité de population et une diversification successive en bactérie. Ce processus de développement du microbiote essaye constamment d'établir un équilibre entre les microorganismes et l'hôte. Un déséquilibre du microbiote intestinal causé

par des agents pathogènes ou des facteurs externes peut influencer profondément la santé intestinale et systémique pendant la vie d'une personne(10).

L'importance de la colonisation de l'intestin par des microbes au début de la vie est essentielle au développement de la santé du nouveau-né, qui peut même aller jusqu'à affecter sa vie d'adulte(11). Le professeur en médecine spécialisé en pédiatrie néonatalogie à l'hôpital d'enfant de rabat s'est intéressé à faire une étude sur le microbiote intestinal chez les nouveaux prématurés. Pour ce faire elle a demandé au directeur du laboratoire du centre hospitalier universitaire CHU Ibn Sina, professeur Tligui Houssain de l'accompagner dans cette étude au niveau de l'étape près analytique en étudiant les microorganismes présents dans les selles de ces prématurés.

Dans ce contexte, le but de ce mémoire est de souligner le rôle du laboratoire dans l'étude près analytique et analytique du microbiote intestinal de ces nouveaux nés prématurés, en ce qui concerne le comment et la manière de l'élaboration de ce genre de projet au niveau d'un laboratoire marocain avec le matériel et le personnel qui est présent, tout en respectant le budget de l'étude. Recherché toutes les informations nécessaires pour la réalisation de l'étude, choisir la meilleure technique qui peut être réalisée, connaître les bactéries qui colonisent le microbiote intestinal des nouveaux nés dès la naissance, bien préparer et conserver les échantillons et rechercher les bactéries présentes dans les échantillons.

II. Revue bibliographique.

1. Microbiote intestinal chez le nouveau-né :

a) Définition du microbiote :

Le microbiote est une communauté écologique de micro-organismes commensaux, symbiotiques et pathogènes vivant dans des environnements spécifiques et sur tous les organismes multicellulaires étudiés, des plantes aux animaux. Comprendant des bactéries, des archées, des protistes, des champignons et des virus(12).

Le microbiote est généralement utilisé en référence à un hôte. Il réfère à la taxonomie des micro-organismes présents.

Contrairement au microbiome qui décrit soit les génomes collectifs des micro-organismes qui résident dans une niche environnementale, soit les micro-organismes eux-mêmes(13).

L'ensemble du microbiome et l'hôte sont appelés holobionte terme qui correspond à une entité vivante naturelle constituée d'un organisme supérieur (pluricellulaire) et de son microbiote (la cohorte de microorganismes qui lui est étroitement associée).

b) Différents types de microbiote :

- **Le microbiote cutané** : est l'ensemble des micro-organismes situés sur la peau.
- **Le microbiote vaginal** : ou flore vaginale, est l'ensemble des micro-organismes qui se trouvent dans le vagin. Ils permettent de limiter les infections en créant une compétition avec les germes pathogènes.
- **Le microbiote placentaire** : est l'ensemble des micro-organismes qui se trouvent dans le placenta
- **Le microbiote des organes sexuels masculins** : est l'ensemble des micro-organismes qui se trouvent dans les organes sexuels masculins.
- **Le microbiote des plantes** : est l'ensemble des micro-organismes qui se trouvent chez les plantes.
- **Le microbiote du sol** : est l'ensemble des micro-organismes qui se trouvent dans le sol.
- **Le microbiote des aliments** : microbiote des produits laitier ou de salaisons ...
- **Le microbiote intestinal** : ou microflore intestinale est l'ensemble des micro-organismes présent dans le tube digestif. Il ne s'agit pas uniquement de bactéries intestinales, mais également de cellules de l'estomac (figure 1).

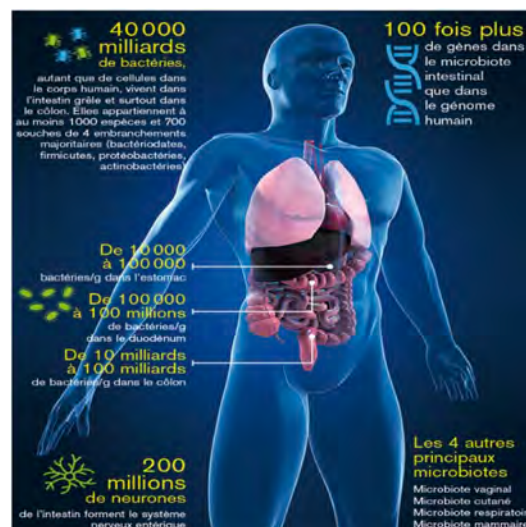


Figure 1 : Microbiote intestinal(14).

À l'âge adulte, le tube digestif humain renferme jusqu'à 100 000 milliards de microorganismes interagissent constamment avec elles-mêmes et leur hôte, dix fois plus de cellules que n'en contient l'organisme humain et plus de 3 millions de gènes, soit 100 fois plus que de gènes présents dans le génome humain(15). Ce microbiote intestinal humain représente une biomasse considérable estimée à 1 kg de bactéries dotée de multiples fonctions physiologiques, il peut être considéré par certains comme un véritable organe « caché » (16).

Dans des conditions physiologiques saines, cette symbiose microbiote-hôte est généralement mutualiste(17) a un rôle important dans la santé de l'hôte en fournissant des fonctions bénéfiques telles que le métabolisme des composés non digestibles et l'apport d'acides gras à chaîne courte, de vitamines et de trois acides aminés essentiels : la valine, la leucine et l'isoleucine, Régulant aussi plusieurs voies métaboliques comme : absorption des acides gras, du calcium, du magnésium..., et participant dans la prévention de la colonisation par des agents pathogènes et la régulation de la structure de la muqueuse intestinale et de l'immunité (12).

Si le microbiote intestinal est colonisé par un pathogène ou autre choses, il peut causer un déséquilibre de son rôle ou entraîne un déséquilibre pathologique à l'organisme, en particulier des maladies auto-immunes et inflammatoires.

Dès les premières années de vie, le microbiote est nécessaire pour que l'immunité intestinale apprenne à distinguer les espèces commensales des pathogènes.

c) Le microbiote intestinal chez les nouveaux nés :

i. Généralités :

Le microbiote a été considéré pendant des années comme stérile, n'étant colonisé qu'après la naissance par le microbiote maternel, l'alimentation et l'environnement(18). Alors que grâce à l'évolution de la science et des technologies il est maintenant suggérable que l'exposition microbienne peut déjà commencer pendant la gestation et que la colonisation commence avec les premières bactéries issues du microbiote maternel et de l'environnement dès la naissance(19,20). Ce microbiote est considéré également un écosystème simple qui subit progressivement des changements successifs jusqu'à atteindre une grande diversité à l'âge adulte. Son développement est profondément influencé par le génotype de l'hôte, l'âge

gestationnel, l'utilisation d'antibiotiques, le mode d'accouchement, le régime alimentaire et le contexte dans lequel le nourrisson est né(21).

Au début de la vie, l'un des premiers déterminants majeurs du microbiote intestinal est le mode d'accouchement. Les bébés nés par voie vaginale sont d'abord colonisés par les bactéries fécales et vaginales de la mère, tandis que les bébés nés par césarienne sont initialement exposés à des bactéries provenant de l'environnement hospitalier et des travailleurs de la santé. D'autres facteurs pouvant influencer sur la composition du microbiote du tube digestif du nouveau-né qui sont : l'environnement lors de la naissance, la prématurité, les mesures d'hygiène et le type d'alimentation du nourrisson(22).

ii. Source du microbiote intestinal :

La source du microbiote intestinale c'est la matière fécale, son apparence dépend de l'état de l'appareil digestif d'un individu influencé par son régime alimentaire et de sa santé. Dans le cas normale les selles sont semi-solides et enrobées de mucus (différentes sécrétions visqueuses et translucides produites par des glandes spécifiques de divers organismes), leur élimination et leur surveillance constituent l'un des pivots de l'hygiène alimentaire, mais aussi de l'hygiène générale. En tant que déchet de l'organisme, elles peuvent être vecteurs de maladies.

La composition des selles varie normalement selon le régime alimentaire, mais elles sont majoritairement composées d'environ 75 % d'eau. Les 25 % restants sont composés de matières organiques comprenant divers nutriments comme les fibres alimentaires ainsi que des bactéries vivantes et mortes, l'azote, le phosphore et le potassium. On peut aussi trouver quelques enzymes encore actives (23).

En parlons des selles, il ne faut pas oublier de ne pas parler des premières selles de chaque personne après sa naissance qui sont appelées « Méconium »(24).

Le méconium est une matière pâteuse noire accumulée dans l'intestin du bébé avant la naissance qui est évacué obligatoirement pendant les premiers jours de vie du nourrisson, il doit être expulsé au cours des 24 premières heures de vie. Certains les évacuent à la salle d'accouchement. Cette évacuation est le processus d'élimination des résidus qui sont accumulés dans l'intestin pendant qu'il était dans l'utérus.

La texture du méconium est très collante visqueuse, verdâtre ou brunâtre ou même noirâtre, et souvent inodore(24). Il est expulsé par le nouveau-né généralement de façon abondante (Figure 2).

L'évolution des selles du nourrisson par la suite, sont des selles d'un bébé allaité semi-liquides qui peuvent contenir des grumeaux. Leurs odeurs ressemblent à celle du lait et elles sont peu irritante pour la peau du bébé. Puis le nourrisson commence à grandir et passe d'un bébé allaité à un bébé nourri et commence à avoir alors des selles plus épaisses, plus dense et plus odorantes. La consistance des selles varie en fonction de son régime alimentaire.

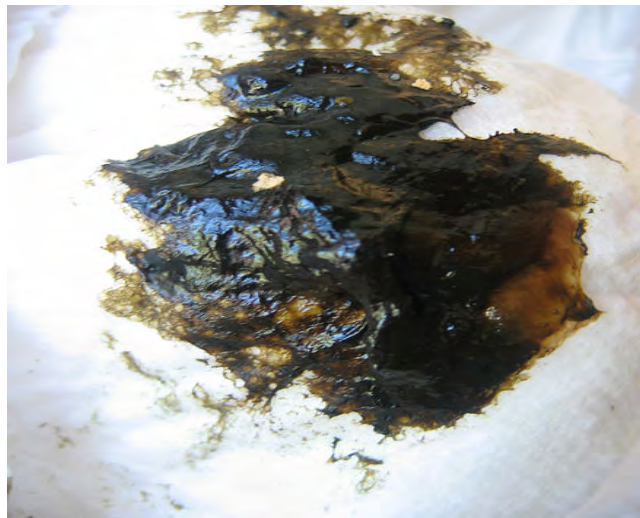


Figure 2 : Méconium brun d'un nouveau-né humain(25).

2. Les micro-organismes constituant les selles chez le nouveau-né :

a) Définition des micro-organismes :

Un micro-organisme du grec μικρός, mikrós, « petit » et de οργανισμός, organismós, « organisme » ou microbe (du grec μικρός, mikrós, « petit » et βίος, bíos, « vie ») est un être vivant invisible à l'œil nu observable grâce au microscope, représentant une grande majorité de la vie sur terre. Les micro-organismes colonisent tous les habitats de cette planète, comme l'air, les eaux marines, les eaux douces et les sols..., mais aussi des environnements plus hostiles tels que les fond des océans, les déserts, les pôles et les geysers. Ces micro-organismes se présentent sous différentes formes : les bactéries, les protistes, les amibes certains champignons microscopiques, les planaires, des algues vertes microscopiques, les archéobactéries... Certains microbiologistes incluent les virus alors que d'autres ne les considèrent pas comme des êtres vivants à part entière et donc les exclus.

Nombreux de ces micro-organismes sont associés aux plantes ou aux animaux avec lesquels ils peuvent entretenir des relations de symbiose (Association biologique, durable et réciproquement profitable, entre deux organismes vivants), de commensalisme (Le commensalisme est une interaction biologique à long terme dans laquelle les membres d'une espèce obtiennent des avantages tandis que ceux de l'autre espèce n'en bénéficient ni ne sont lésés) ou de parasitisme (Le parasitisme est une relation étroite entre les espèces, où un organisme, le parasite, vit sur ou à l'intérieur d'un autre organisme, l'hôte, lui causant des dommages). Certains micro-organismes peuvent être pathogènes, c'est-à-dire entraîner une maladie chez les plantes ou les animaux.

Même si le mot microbe signifie « petite vie » il comporte une forte connotation négative référant aux micro-organismes pathogènes, alors que les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans presque tous les écosystèmes et rapportent un bénéfice varié à l'homme. Comme Le plancton qui recycle environ 50% du CO₂, les bactéries qui participent au cycle du carbone, au cycle de l'azote et accomplissent un rôle vital dans presque tous les écosystèmes(26)

Les micro-organismes sont une forme du vivant très ancienne qui ont évolués avec le temps et qui ont appris à survivre à des conditions extrême grâce à leurs transferts horizontaux de gènes, de pair avec un haut taux de mutation et de nombreux autres moyens de la variation génétique, qui peut poser problème dans le cas des micro-organismes pathogènes qui peuvent évoluer en des super-microbe nuisant à l'humain et difficile à traiter.

b) Types des micro-organismes intestinaux chez le nouveau-né :

Sachant que le microbiote intestinal chez le nouveau-né est un élément essentiel même obligatoire pour la survie de l'être humain et qui est généralement en symbiose et a une relation de mutualisme avec l'organisme, l'un ne peut survivre sans l'autre. Parfois il peut être colonisé non que par des microorganismes qui lui sont bénéfiques, mais peut aussi être colonisé aussi par des microorganismes pathogènes qui lui sont nuisant.

i. *Non pathogènes :*

La colonisation du microbiote intestinale du nouveau-né évolue et augmente au fur et à mesure de sa croissance.

Cette colonisation varie selon différents facteurs : le mode d'accouchement, le type d'alimentation du nourrisson, l'âge gestationnel, l'hospitalisation du nourrisson et l'utilisation d'antibiotiques par le nourrisson.

Les nourrissons nés par voie vaginale et qui ont été exclusivement allaités semblaient avoir le microbiote intestinal le plus « bénéfique », donc la présence des micro-organismes bénéfiques est nécessaire pour une croissance saine de l'enfant.

Des bactéries comme :

Les bactéroïdes et les bifidobactéries jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides dans le gros intestin (22), peuvent aussi aider à la prise en charge de la diarrhée liée à l'infection à rotavirus et à l'antibiothérapie, et également influencer l'issue des maladies allergiques.

Les bifidobactéries et les lactobacilles sont considérés comme les bactéries bénéfiques pour la santé, les plus importantes pour l'hôte humain, elles sont même utilisées comme probiotiques, en raison de leur prédominance numérique chez certains nourrissons(22).

Les clostridies qui présentent une protéolyse et une grande diversité d'activités métaboliques. Ils fermentent les acides aminés, particulièrement les acides aminés aromatiques, en particulier *Clostridium bifermentans* et *Clostridium sordellii*, qui produisent du propionate de phényle. *Clostridium perfringens*, *Clostridium clostridioforme* produit de la β -glucuronidase. *Clostridium bifermentan* et *Clostridium sordellii* possèdent 7 propriétés d' α -déshydroxylation (27–29).

ii. Pathogènes :

Les voies intestinales humaines abritent une communauté bactérienne complexe, et ces micro-organismes intestinaux jouent un rôle important dans la santé humaine(30). Certains genres sont des habitants dominants de l'intestin humain mais qui produisent des substances nocives(27). Où ayant certaines espèces qui sont définie en tant qu'agents d'infections opportunistes (31).

Comme le cas des clostridies qui ont un rôle important dans l'organisme, mais qui peuvent avoir des espèces nocives pour l'hôte humain comme *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tertium* et *Clostridium difficile* qui se trouvent chez les nourrissons nourris au biberon avec des taux d'occurrence de 49 à 66 %, elles sont considérées comme agent pathogène de l'entérite nécrosante et de la diarrhée (32).

Les *Enterococcus faecalis* qui sont à l'origine d'un nombre important d'infections opportunistes dont l'endocardite bactérienne, sont des bactéries pathogènes pouvant infecté le

nouveau-né. Leurs émergences progressives de la résistance aux antibiotiques impose un certain nombre de contraintes à l'antibiothérapie est particulièrement préoccupante(33). La colonisation par cet organisme pourrait avoir des implications importantes pour la diffusion de la résistance aux antibiotiques, car les entérocoques échangent des informations génétiques de manière promiscue dans l'intestin(34).

Il a été également observé que les nourrissons nés par césarienne et qui ont été nourris au biberon semblaient avoir le plus grand nombre de *Clostridium difficile* et d'*Escherichia coli*, et le plus faible nombre de bifidobactéries(22).

c) Classification des micro-organismes :

La taxonomie est la science de la classification des êtres vivants, c'est une branche des sciences naturelles qui a pour objet l'étude de la diversité du monde vivant.

La taxonomie ou taxinomie, taxi qui provient du mot grec τάξις (taxis) « placement », « classement », « ordre » et nomie qui provient du mot grec νομός (nomos) « loi », « règle ». Taxonomie terme créé en 1813 pour exposer les principes de la classification naturelle et l'art de décrire et d'étudier les végétaux au début, terme qui dans sa forme originelle est faux car il devait normalement être « Taxéonomie » mais pour le rendre plus court et facile, le « e » fut enlevé. Plus précisément le mot taxonomie est dérivé non pas du nominatif τάξις (taxis) mais de son génitif τάξεως (taxeôs).

i. Histoire :

La classification des êtres vivants a connu 3 grands changements au cours du temps (figure 3) :

- La classification qui était avant Carl von Linné.
- La classification qui a apparue avec Carl von Linné.
- La classification qui vient de survenir après Carl von Linné.

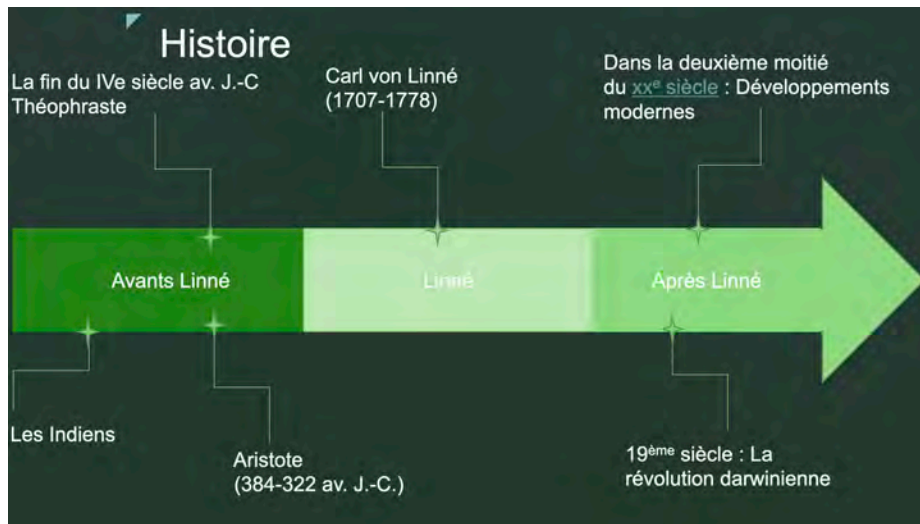


Figure 3 : Histogramme simplifié de l'évolution de la classification(35-39).

Dès le premier âge les êtres humains ont essayé de classer les autres êtres vivants, elle a commencé avec les indiens qui ont essayé d'émettre des critères en se basant sur la facilité à capturer l'organisme, leurs utilités pour l'être humain, leurs saveurs, leurs parties comestibles pour les classer.

La première classification des végétaux est généralement attribuée à Théophraste à la fin du IVe siècle av. J.-C.

Et la première classification des animaux a été faite par le philosophe Aristote l'un des penseurs les plus influençant de son époque qui avait des connaissances sur presque toutes les disciplines : biologie, physique, métaphysique, logique, poétique, politique, rhétorique, éthique... Et qui a divisé les animaux en deux classes, ceux qui ont du sang et ceux qui n'en ont pas.

En sous-divisant les animaux à sang rouge en cinq classes : les vivipares, les cétacés, les oiseaux, les ovipares et les poissons ; et les animaux à sang blanc en quatre : les mollusques, les testacés, les crustacés et les insectes(35).

Puis en (1707-1778) et grâce à Carl von Linné (figure 4), médecin et botaniste suédois, la taxonomie des êtres vivants a connu une révolution et a commencé à rependre à des critères précis et rigoureux qui étaient basé sur l'anatomie de l'être vivant. Appelée systématique classique (parfois dite « linnéenne »). Pour ce faire, son équipe et lui ont voyagé à travers le monde pour classer les végétaux et les animaux, selon ce système qui est basé sur des critères de ressemblance « morphologique » et d'affinité, purement anthropocentrique reflétant des causes de la diversité des êtres vivants comme des créations divine chaque organisme n'ayant aucune relation avec l'autre. Cette classification fut la base de la systématique scientifique

jusqu'au milieu du XXe siècle(36). Une systématique qui conçoit une classification des plantes d'après les organes sexuels visibles et nomme et classe de manière systématique toutes les espèces connues de l'époque. S'intéressant notamment à trois grands règnes de la nature : les plantes, les animaux et les minéraux Le règne (du latin « regnum », au pluriel « regna ») est, dans la taxonomie de Carl von Linné (qui classe la biodiversité en fonction des caractères communs partagés), le plus haut niveau de classification des êtres vivants chez Linné. Mais dans les classifications les plus récentes, le règne n'est plus que le deuxième niveau de classification, après le domaine ou l'empire(37).

Chaque règne est divisé en embranchements (ou parfois divisions, en botanique), que l'on nomme également phylum en latin comme en anglais. Les principaux niveaux de la classification taxonomique sont le monde vivant, l'empire ou le domaine, le règne, l'embranchement ou la division, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce.

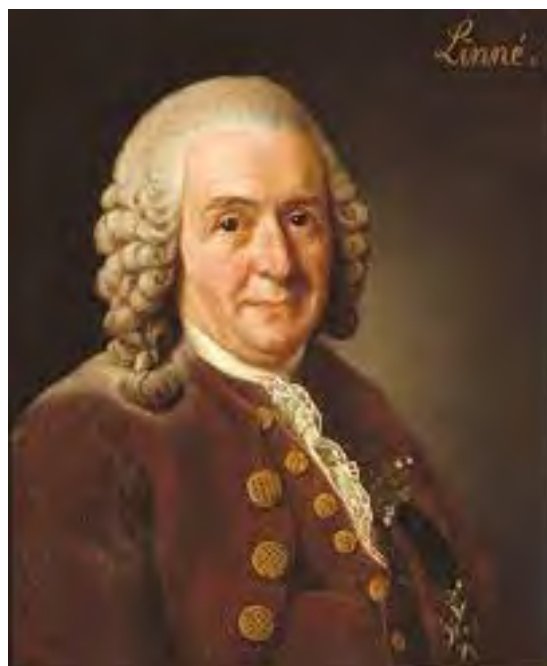


Figure 4 : Carl Von Linné(38).

En 1859 Charles Darwin a recommandé dans « L'Origine des espèces » une classification exclusivement généalogique, que les espèces doivent être classées également selon leur degré d'apparement évolutif non seulement sur leurs morphologies et il voulut donc changer la classification qui était basée sur la ressemblance des espèces. Un siècle après sa proposition fut l'apparition de la systématique dites « systématique de l'évolution », qui

classe les êtres vivants en deux divisions : les procaryote et les eucaryotes. Et en cinq règnes : les plantes, les animaux, les bactéries, les champignons et les protistes(39).

Puis au milieu du XXe siècle plus précisément en 1950, la phylogénétique ou la cladistique fut initié par Willi Hennig, cette nouvelle systématique s'est développée à partir d'une méthode de reconstruction qui a connu un développement foudroyant. Elle est fondée globalement sur des relations évolutives qui reflète la phylogénie c'est-à-dire qui reflète les degrés d'apparentement entre espèces(40). Et aussi sur les progrès de la génomique, de l'analyse génétique automatique et du développement des outils et modèles informatiques qui rapporte une meilleure connaissance et un meilleur suivi des espèces.

La systématique phylogénétique est fondée sur le clade qui est un groupe monophylétique dont tous les membres sont plus apparentés entre eux qu'avec n'importe quel autre groupe, et un cladogramme (arbre phylogénétique) (figure 5) qui est une hiérarchie de clades. Cet arbre spécifie des relations de degrés de parenté entre les taxons qu'il classifie. Dans le cadre de la théorie de l'évolution, les relations de degré de parenté entre taxons sont expliquées par l'existence d'ancêtres communs(40).

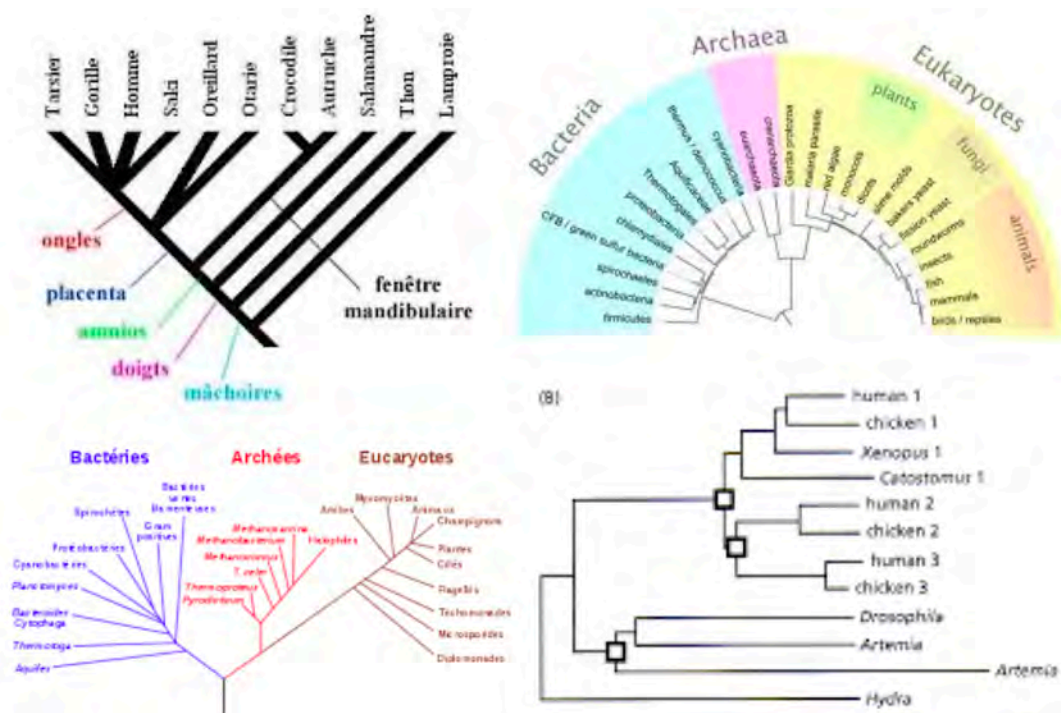


Figure 5 : Arbre phylogénétique sous différentes formes(41).

La construction de l'arbre phylogénétique est basée sur l'état de caractères dérivés partagés, qui se réalise à l'aide de programmes informatiques en utilisant des logiciels d'analyse

cladistique utilisant la synapomorphie, afin de proposer des hypothèses de clades. Les caractères peuvent en cladistique inclure des connaissances morphologiques, génétiques, biochimiques ou encore comportementales.

La construction de l'arbre phylogénétique se fait selon deux modèles(42) :

- Modèle de distance : utilisation d'algorithme comme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) ou Neighbor-Joining pour le calcul des distances entre les paires de séquences.

L'UPGMA : algorithme itératif de clustering, à chaque étape on crée un nouveau cluster regroupant deux clusters proches et on rajoute un nœud à l'arbre.

Neighbor-Joining : algorithme qui calcule d'abord la divergence de chaque taxon par rapport aux autres. Qui a la différence de UPGMA, il ne choisit pas le couple de taxon ayant la plus petite distance pour faire de lui le premier clade de l'arbre.

- Modèle probabiliste : Méthodes basées sur les caractères. Utilisant l'algorithme Maximum de parcimonie (Maximum Parsimony) qui Consiste à choisir l'arbre qui minimise le nombre de changements d'états de caractère, choisir l'arbre le plus parcimonieux, qui "coute" le plus petit nombre d'événements évolutifs le long de ses branches.

ii. *Nomenclature des organismes :*

La nomenclature des organismes est une discipline de différentes sciences du vivant, qui a été développé par des biologistes pour qu'ils désignent à la fois les unités de classification du vivant et pour qu'ils indiquent leur position dans les classifications biologiques. Les groupes d'organismes que classent les systématiciens (les taxons). Cette classification hiérarchique est basée sur la nomenclature binomiale linnéenne.

L'utilisation de la nomenclature binomiale a été systématisé par Carl von Linné au xviiiè siècle. Qui est un système de nomenclature selon lequel une espèce est dénotée par un binôme, un nom à deux termes, le premier étant le nom générique « le genre » et le second le nom spécifique « l'espèce elle-même »(43).Le nom binominal est en latin, il doit être composé en italique si le texte de la publication est en typographie romaine.

Ce n'est pas aussi simple que ça, dans ce système, le nom d'une catégorie peut servir à préciser le rang relatif d'un taxon, désigner des taxons de rang de plus en plus inclusif. Car il existe de plus des conventions d'écriture qui permettent d'incorporer au nom de certains taxons une marque formelle de catégorie. Lorsqu'on parle de *Homo sapiens*, la forme du nom,

constitué par deux mots dont le premier commence par une majuscule, imprimés dans un corps différent de celui du texte, indique qu'il s'agit d'un taxon appartenant à la catégorie taxonomique espèce, lorsqu'on parle d'Hominidae, la majuscule et le suffixe -idae indiquent qu'il s'agit d'un nom appartenant à la catégorie famille ; et le préfixe « homin- » dans ce dernier nom, racine du mot latin « homo » dont le génitif est « hominis », indique que le taxon de la catégorie genre dont le nom est « Homo » appartient au taxon de la catégorie famille « Hominidae »(44). Ceci est encore plus compliqué que cela si on rentre dans les détails de chaque catégorie et sous-catégorie qui en zoologie le nom des sous-espèces doit être écrit en trois mots ; et des sous-niveaux, tels que la sous-famille ou la superfamille, sont identifiés par des suffixes, -inae et -oidea au sein du niveau famille...

Vu la complexité de la nomenclature, le code de nomenclature zoologique actuel ne reconnaît que trois catégories, les groupes, devenus niveaux dans la dernière édition : la famille, le genre et l'espèce(45). Le code ne traite pas des noms des taxons dans les catégories de rang supérieur à la catégorie famille, ni de rang inférieur à celui de la sous-espèce. Alors que le code de nomenclature botanique régleme des catégories plus nombreuses(46).

III. Méthodes d'étude de biologie moléculaire du microbiote intestinal.

La culture bactérienne intestinale est depuis longtemps une technique de référence en écologie microbienne (figure 6). Cette méthode est basée sur la sélection aléatoire de colonies bactériennes dans des milieux sélectifs ou non sélectifs, suivie d'une caractérisation phénotypique des isolats à l'aide d'outils de microbiologie anaérobie standard. Avec l'utilisation de cette technique, on estime qu'au moins 20 à 30 % des bactéries qui composent l'écosystème intestinal peuvent être obtenues par cette méthode, elle propose donc une vision biaisée du microbiote intestinal(47).



Figure 6 : Culture bactérienne(48).

L'objectif principal de notre travail est d'étudier le microbiote intestinal chez les nouveaux nés prématurés dans sa totalité et spécialement les bactéries car elles sont l'un des microbes les plus abondants chez l'homme, en choisissant la méthode la plus adéquate et la plus faisable pour ne pas biaiser les résultats finaux selon le matériel, les connaissances du personnel du laboratoire de recherche CHU Ibn Sina et le budget du projet.

Pour ce faire on a cherché au sein des articles scientifiques indexés pour voir et comparer les techniques et les méthodes d'étude du microbiote intestinal.

Ainsi, des méthodes de biologie moléculaire indépendantes de la culture ont été développées et appliquées au microbiote intestinal dans les années 1990 (49). Ces méthodes reposent principalement sur l'étude de marqueurs moléculaires : les gènes codants pour l'ARN ribosomal 16S (16S rRNA). L'ARNr 16S est une macromolécule omniprésente qui constitue la petite sous-unité 30S des ribosomes procaryotes. Long d'environ 1500 paires de bases, l'ARNr 16S présente une structure en mosaïque, alternant régions conservées (identiques pour toutes les bactéries) et régions variables et hypervariables (spécifiques à chaque espèce bactérienne). Ainsi, le pouvoir de résolution de cette molécule permet l'étude du règne procaryote dans son ensemble (richesse, diversité...) et à tous les niveaux taxonomiques. De nombreuses méthodes d'analyse du microbiome intestinal reposent sur les propriétés de cette molécule (50): électrophorèse dénaturante, hybridation in situ, PCR quantitative, métagénomique, puces phylogénétiques... Avec l'apparition des techniques de séquençage de seconde génération, ces derniers ont connu un essor important au cours de la dernière décennie et sont rapidement devenus la méthode standard pour décrire un écosystème microbien complexe comme le microbiote intestinal.

Lors de l'étude du microbiote intestinal tous ce résumé aux deux méthodes les plus utilisées « la métagénomique » ou la PCR quantitative.

1. Métagénomique :

La métagénomique est l'analyse génomique des communautés microbiennes par extraction et séquençage ou clonage de leur ADN. Elle permet d'étudier des communautés de microorganismes directement dans leur milieu naturel. Permettant l'analyse du potentiel génétique d'un écosystème dans sa globalité(51), a d'abord été appliquée à l'analyse des sols et écosystèmes extrêmes(52). Elle est constituée des génomes de nombreux micro-organismes

individuels présents dans un échantillon environnemental. Contrairement à la méthode classique pour étudier les microorganismes, la métagénomique ne se base pas sur la culture des microorganismes dans des milieux, mais elle se base sur l'analyse génétique directe de génomes contenus dans un échantillon environnemental.

Le domaine de la métagénomique a d'abord commencé par le clonage de l'ADN environnemental, suivi du criblage de l'expression fonctionnelle (53), et a ensuite été rapidement complété par le séquençage aléatoire direct de l'ADN environnemental(54,55). Ce séquençage métagénomique de l'ADN, pour étudier la diversité microbienne et fonctionnelle, peut se faire en deux options :

- o 1^{ère} façon est le séquençage du gène ARNr 16s hautement conservé amplifié à partir de l'ADN métagénomique, les séquences obtenues peuvent être alignées pour générer un arbre phylogénétique dans lequel la diversité des micro-organismes présents dans l'échantillon est révélée (figure 7).

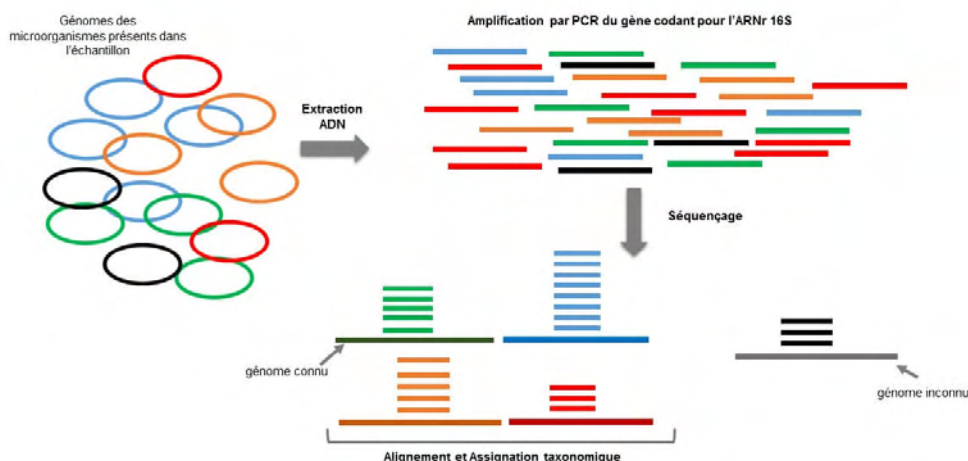


Figure 7 : Métagénomique par séquençage du gène 16s(56).

- o 2^{ème} façon est d'obtenir les informations des micro-organismes d'un échantillon, des informations sur la diversité des gènes et leurs fonctions en séquençant directement l'ADN métagénomique. Les fragments d'ADN plus petits qui se chevauchent sont réassemblés en une séquence plus longue, ou séquence continue (un contig). Grâce à cette procédure, des séquences très complètes des génomes microbiens de l'échantillon peuvent être obtenues. Les gènes sont ensuite prédits et annotés fonctionnellement et

taxonomiquement par comparaison avec d'autres gènes connus à partir d'une référence base de données (figure 8).

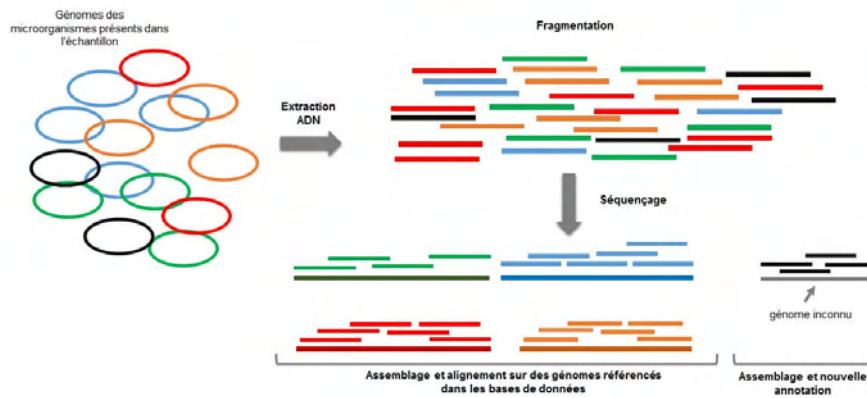


Figure 8 : Métagénomique par séquençage et assemblage(56).

L'évolution rapide et la réduction des coûts du séquençage de nouvelle génération sont aussi responsables du développement de la métagénomique puisqu'elle est basée sur le séquençage. Le séquençage nouvelle génération (NGS), également connu sous le nom de séquençage à haut débit à savoir, Illumina, Roche 454, Ion torrent : Proton / PGM et SOLiD, sont des technologies récentes. Ces dernières ont permis l'obtention des séquences des acides nucléiques de manière beaucoup plus rapide et précise, avec un prix moins cher que les techniques classiques. Le séquençage nouvelle génération a révolutionné l'étude de la génomique et de la biologie moléculaire, en facilitant la réalisation des millions de réactions et l'obtention des séquences en parallèle sur des fragments de petite taille. Les données brutes sont ensuite réorganisées par un traitement informatique pour reconstituer la séquence complète(57–59).

En analysant les articles (12,53) qui ont utilisé la métagénomique pour l'étude du microbiote intestinal, on a observé qu'ils ont tous suivi la même méthodologie de travail qui est la suivante :

1. Extraire la globalité l'ADN génomique de l'échantillon.
2. Amplification par PCR des régions variables du gènes 16S en utilisant des amorces qui vont se lier à la région variable du gène pour une amplification globale de tous les gènes 16s de toutes espèces bactériennes présentes.
3. Electrophorèse pour vérifier s'il y'a eu une amplification ou pas.
4. Séquençage à haut débit avec préparation de la bibliothèque.

5. Traitement des données du séquençage (traitement de qualité, assemblage...)
6. Analyse des données.

2. Méthode classique : Réaction en chaîne quantitative en temps réel qPCR:

PCR Amplification en chaîne par polymérase ou en anglais Polymerase Chain Reaction une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro* qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. La PCR a été développée en 1985 par Kary Mullis, il a reçu le prix Nobel en 1993. Le principe et les conditions expérimentales obtenues sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN au cours des cycles en jouant sur les températures (trois températures) (figure 9):

- Température de dénaturation est réalisée à environ 94°C/95°C, qui est la température où l'ADN double brin se transforme en deux simples brins, en rompant les liaisons hydrogènes entre les bases nucléiques des deux chaînes complémentaires de l'ADN.
- Température d'hybridation : T_a (annealing temperature) qui sera défini selon la nature des amorces mais généralement réaliser à environ 54°C/61°C, qui est la température où l'amorce se lie avec l'ADN matrice simple brin.

L'amorce est une courte séquence d'ARN ou d'ADN, complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière matrice par une ADN polymérase.

- Température d'élongation : est réalisée à environ 72°C, qui est une température où il a formation de brins complémentaires à partir des extrémités 3'OH des amorces grâce à la Taq polymérase.

Chaque cycle met en oeuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque cycle de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle. Pour au final donnait des millions de copies en quelques heures (figure 10)(60).

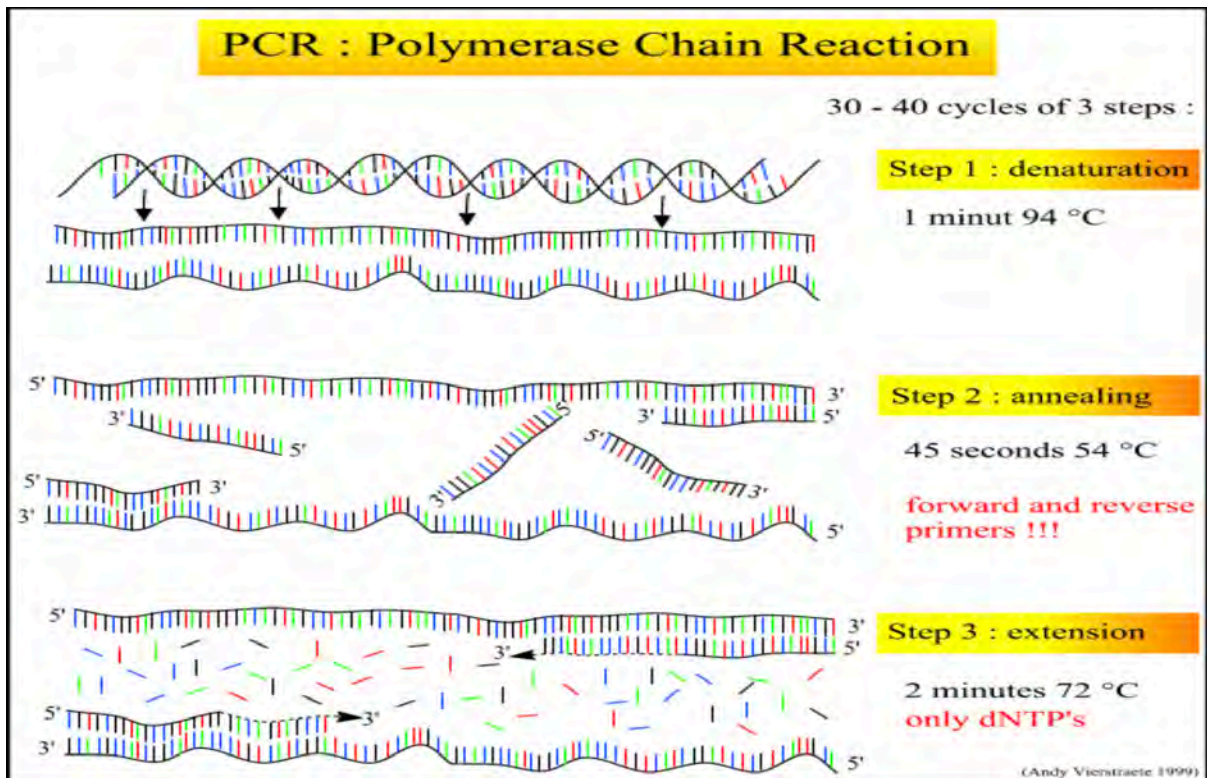


Figure 9 : Le principe de la PCR(61).

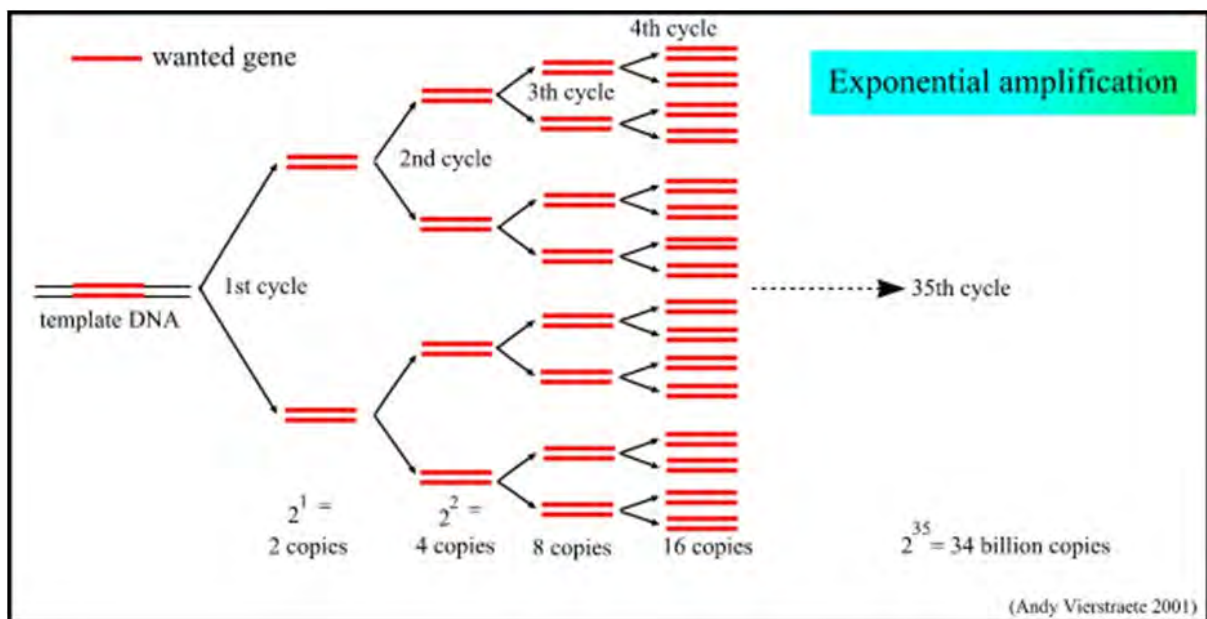


Figure 10 : L'amplification de l'ADN matrice au fur et à mesure des cycles(62).

Au fil du temps et du besoin plusieurs types de PCR en apparus chacune avec ces avantages et ces inconvénients mais le principe reste le même, amplifier l'acide nucléique en utilisant un thermocycleur qui est une machine automatisée qui contrôle les changements des températures indispensables pour chaque étape du cycle de la PCR(63). Et des réactifs

indispensables comme l'ADN matrice, amorces, la Taq polymérase, nucléotides et des compositions chimiques adéquates pour le bon fonctionnement de l'enzyme (Tris-HCl, MgCl₂, KCl, pH 8.3). Avec quelques différences au niveau de la technologie utilisée comme à titre d'exemple la PCR quantitative dite aussi PCR en temps réel, qui est une révolution dans l'utilisation de la PCR, cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (en temps réel) grâce à un marqueur fluorescent(63). Elle nécessite des thermocycleurs particuliers « l'ICycler » qui est un appareil doté d'un détecteur sensible en plus qui surveille la fluorescence dans chaque puit de la plaque à chaque cycle d'amplification (figure 11). L'émission de cette fluorescence est provoquée par un agent intercalant (SybrGreen) inséré dans de l'ADN double brin ou par libération de fluorescence par des sondes (Taqman, Balise moléculaire...).

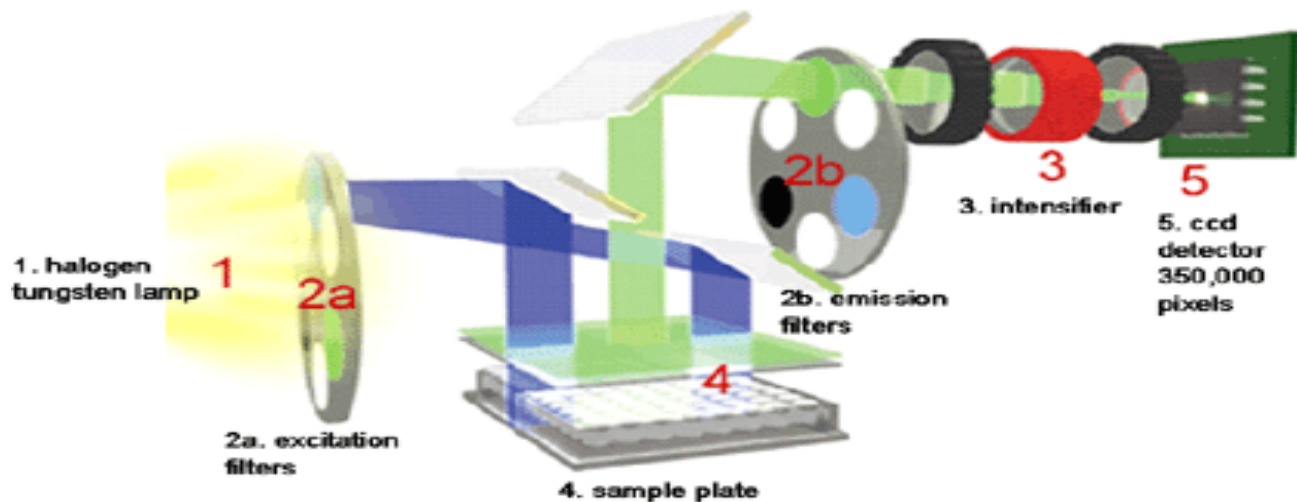


Figure 11 : Le détecteur qui surveille la fluorescence.

La méthode de détection par SYBER Green est basée sur le colorant luminescent qui se lie à l'ADN double brin mais pas à l'ADN simple brin et qui lié à l'ADN double brin a une fluorescence plus forte captée par le ICycle. Le principe est simple l'émission fluorescente augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Pendant la réponse d'amplification, la fluorescence du colorant libre dans la solution est basse. Au cours de l'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Suivie en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant la phase de l'élongation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à la phase de dénaturation du cycle suivant. L'émission de la fluorescence

est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (64) de la PCR en temps réel (figure 12).

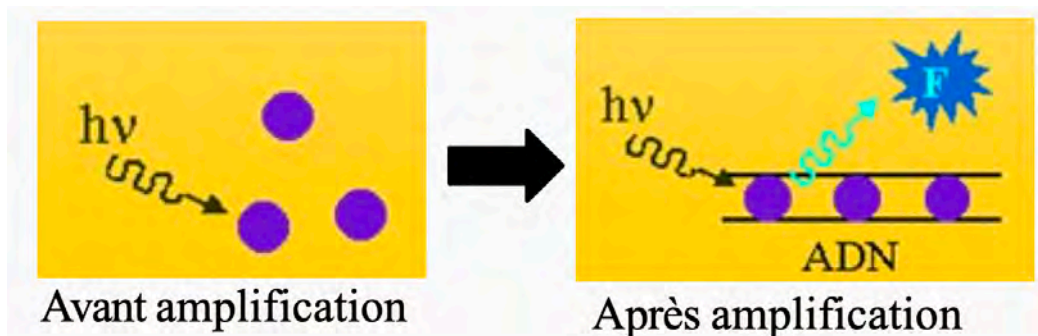


Figure 12 : La fluorescence du Syber Green.

La méthode de TaqMan est basée sur l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase (AmpliTaq) qui clive une sonde doublement marquée hybridée à la séquence cible pendant l'amplification de la PCR. Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Hydrolysé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) (65).

Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle (figure 13).

Cette méthode a l'avantage d'être spécifique de l'ADN amplifié comparé au SYBER Green qui peut se lier aussi aux produits non spécifiques de la PCR

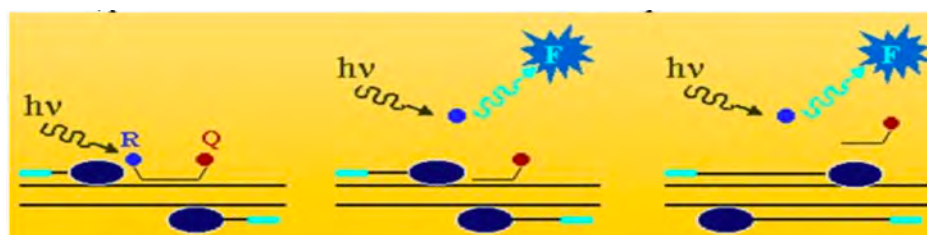


Figure 13 : La fluorescence de la sonde TaqMan.

Lors de la recherche dans les articles sur la méthodologie de travail pour l'étude du microbiote intestinal, il s'est avéré aussi que la PCR quantitative est également une technique utilisée, et selon les articles(66,67) Ils utilisent la méthodologie qui suit avec quelques différences au niveau de la machine utilisée et les bactéries recherchées :

1. Préparer les échantillons.
2. Choisir les amorces pour l'initiation à la PCR quantitative.
3. Amplification par PCR en temps réel.
4. Analyser les résultats : la lecture des résultats de l'automate et suivre la quantité de l'ADN génomique des bactéries étudiées, et voir si l'ADN est amplifié ou pas. S'il est amplifié la bactérie est présente dans l'échantillon sinon elle n'existe pas dans l'échantillon.

Pour le choix de la méthodologie de travail fallait prendre une décision entre la métagénomique et la PCR quantitative, qui dépendait de plusieurs facteurs : le budget de l'étude qu'il ne faut pas dépasser, le matériel existant au sein du laboratoire de recherche CHU, les connaissances et les compétences du personnel.

En ce qui concerne ceci, on a étudié tous les facteurs et on a pris également en considération même l'objectif de notre étude de chercher toutes les bactéries qui existent dans nos échantillons de selle. Pour au final décidé de travailler avec la PCR quantitative. Pour ce faire on a créé une méthodologie de travail adéquate à l'étude, en ce qui s'applique au choix des bactéries qu'on va viser dans l'étude, la préparation des échantillons, le choix des amorces... Ceci va bien être détaillé dans la partie qui suit « matériel et méthode ».

IV. Matériel et méthodes.

1. Les échantillons :

350 selles ont été collectées au niveau du laboratoire, pour l'étude de 50 microbiotes intestinaux des nouveaux nés prématurés dès leurs naissances.

Le prélèvement de ces échantillons a été réalisé comme suit :

Pour chaque nouveau-né 7 prélèvements des selles (Figure 14) :

- Un Prélèvement pendant la première semaine des premières selles « le méconium ».
- Deux prélèvements des selles de la deuxième semaine.

- Deux prélèvements des selles de la troisième semaine.
- Deux prélèvements des selles de la quatrième semaine.

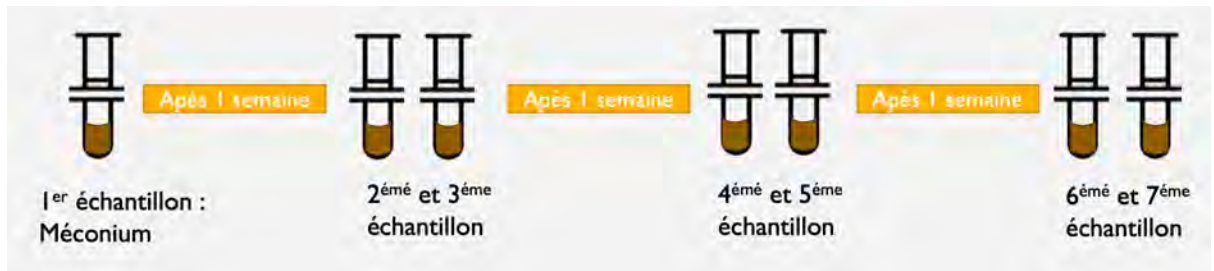


Figure 14 : Prélèvements des selles.

2. Méthode de travail :

Pour l'analyse de nos échantillons on a décidé de travailler avec la technique de biologie moléculaire la PCR quantitative. On a décidé de réaliser un protocole qui contient les étapes et les recherches qu'on doit accomplir pour mener à bien cette étude.

Le protocole est le suivant :

- Rechercher les bactéries dont on veut prouver leurs présences ou leurs absences, dans des articles qui ont étudié le microbiote intestinal sur les nourrissons. Pour se décider et viser les bactéries qu'on va chercher dans nos échantillons.
- Rechercher et choisir les amorces adéquates pour les gènes des bactéries recherchées qui vont être amplifiées.
- Préparation des 350 échantillons : la méthode de leurs conservations et la technique d'extraction de l'ADN génomique présent dans ces échantillons.
- Amplification par PCR en temps réel.
- Analyser les résultats.

3. Les bactéries colonisant le microbiote intestinal du nouveau-né :

Pour réaliser l'objectif de notre étude, on a réalisé dans un premier plan une recherche sur 9 articles qui ont fait une étude détaillée sur le microbiote intestinal chez les nouveaux nés âgés entre 0 et une année (Figure 15). Leurs perspectives de travail étaient différentes mais la finalité observer et les connaissances des bactéries colonisant l'intestin chez les nourrissons

sont les mêmes. On a étudié ces articles et on les a regroupés dans un tableau qui contient le nom, la référence, le nombre de phylum de bactérie trouvée dans leurs échantillons, le nom des phylums, le but de l'article, l'âge des enfants, impact facteur et le nom du journal ou ces articles ont été publiés pour pouvoir regrouper toutes les informations nécessaires (Figure 16).



Figure 15 : Les 9 articles de l'étude du microbiote intestinal(2,18,68–74).

Article name	Article ref	Nombre de phylum	phylum	But de l'article	L'âge des enfants	Impact facteurs	Motif recherche	JOURNAL
Meconium Microbiome Analysis Identifies Bacteria Correlated with Premature Birth	Arifolliou AN, Oh H, Cruz DIA, Dams-Richardson AD, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. <i>PLoS One</i> 2014;9(5):e970784. Published 2014 Mar 10; doi:10.1371/journal.pone.0100784	5	Firmicutes -Actinobacteria -Proteobacteria -Tenericutes -Bacteroidetes	Dans cette étude, les corrélations entre les bactéries intestinales trouvées du méconium et l'âge gestationnel ont été examinées afin de suggérer des mécanismes sous-jacents pouvant contribuer à l'accouchement prématuré.	<33 semaines >33 semaines		2/776	Microbiology Department of Pediatrics -PLOS one
Development of the Human Infant Intestinal Microbiota	Palmer, C., Bik, E. M., DiGiuseppe, D. S., Brown, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. <i>PLoS Biology</i> , 5(7), e117.	6	Firmicutes Bacteroidetes -Proteobacteria -Actinobacteria -Verrucomicrobia -Fusobacteria	nous avons conçu un microcircuit pour détecter et quantifier les séquences de gènes (ARG) ribosomique de petite sous-unité (ARPSU) de la plupart des espèces et groupes taxonomiques de bactéries actuellement reconnues. Nous avons utilisé ce microcircuit, ainsi que le séquençage de bibliothèques ciblées (ADNc-SSU) amplifié par PCR, pour profiler les communautés microbiennes dans une moyenne de 26 échantillons de selles provenant chacun de 14 nourissons humains en bonne santé et nés à terme, y compris une paire de jumeaux dizygotes, en commençant par la première selles après la naissance et se poursuivant à des intervalles définis tout au long de la première année de vie.	0-1 ans		8/1021	Genetics Microbiology and Immunology -PLOS Biology
Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota	Martin, R., Makino, H., Ostayunsk Yavuz, A., Ben-Amor, K., Rosell, M., Srikanta, E., ... A Kogi, J. (2016). Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. <i>PLoS one</i> , 11(8), e0156498	4	Firmicutes -Bacteroidetes -Proteobacteria -Actinobacteria	Cette étude vise à élucider la dynamique de la colonisation pélorale au cours des premiers mois de la vie et à identifier les facteurs qui peuvent entraîner des changements dans la composition du microbiote intestinal au début de la vie.	0-6 mois		2/776	Nutrition -PLOS one
The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota	Miani, C., Durani, S., Bottorini, F., Casari, E., Turrini, F., Maleny, J., & Ventura, M. (2017). The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. <i>Microbiology and molecular biology reviews</i> , 81(4), e00036-17.	4	Firmicutes -Bacteroidetes -Proteobacteria -Actinobacteria	Dans cette revue, nous décrivons le microbiote infantile, les mécanismes qui régissent son établissement et sa composition, et comment les communautés microbiennes peuvent être façonnées par des interventions naturelles ou artificielles. Enfin, nous discutons de la pertinence des principaux acteurs microbiens du microbiote intestinal du nourrisson, en particulier les <i>lactobacilles</i> , par rapport à leur rôle dans la santé et la maladie.	bébé		0/34	Genetics Microbiology -ASM

Figure 16 : Résumé des informations des articles étudiés(2,18,68–74).

En résumé et ce qui concerne l'information la plus importante qu'on ait retenu de ces articles et le nombre et le nom des phylums qui est un total de 8 qui sont : Firmicutes ; Bacteroidetes ; Proteobacteria ; Actinobacteria ; Verrucomicrobia ; Fusobacteria ; Euryarchaeota ; Tenericutes.

Et lorsqu'on parle de phylum on ne parle pas d'espèce mais d'une lignée d'espèces issues toutes d'une même souche ; les différentes formes revêtues par les ascendants d'une espèce.

Dans un second plan on a vu que les enfants qui ont un âge de 0-1 ans sont des enfants avec un microbiote qui sera plus développé que nos patients qui sont âgés au maximum d'un mois, on a donc décidé de rétrécir notre recherche sur des nourrissons âgés entre 0 à 6 mois. Et sur les 9 articles on a éliminé les 3 articles qu'ils ont fait une étude sur des enfants qui dépasse les 6 mois.

Ci-dessous la figure 17 des 6 articles retenus.



Figure 17 : Les 6 articles de l'étude du microbiote intestinal(18,70,72–74).

Juste en diminuant 6 mois de vie de l'enfant il y a eu diminution des nombres des phylums retrouver dans leurs microbiotes intestinaux. De 8 phylums à 4 phylums qui sont :

- Firmicutes
- Bacteroidetes
- Proteobacteria
- Actinobacteria

Puisque lors de notre étude on va utiliser la méthode de biologie moléculaire d'amplification en chaine polymérase quantitative pour rechercher les phylums des bactéries qu'on vient de déterminer, il faut choisir les amorces adéquates qui vont se lier aux gènes constitutionnels des bactéries recherchées pour une amplification de ces derniers, s'ils sont présents dans nos échantillons et suivre leurs fluorescences lors de leurs amplifications par PCR quantitative.

4. Amorces :

Pour initier la PCR en temps réel il est nécessaire de trouver les amorces spécifiques pour les gènes matrice qui vont être amplifiés.

Le choix des amorces n'était pas facile, car il fallait choisir des amorces universelles qui n'excluent aucun membre appartenant aux groupes, non pas des amorces spécifiques à l'espèce. Pour faire une recherche dans un domaine plus large « le genre » non pas « l'espèce » en remontant toujours au « phylum ».

Après une étude bien approfondie de plusieurs articles :

1. Design of Species-Specific Primers to Identify 13 Species of *Clostridium* Harbored in Human Intestinal Tracts (27).
2. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces(75).
3. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses (34).
4. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota(18).
5. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy (22).

Une sélection et une vérification des amorces ont été réalisées. Parmi plusieurs amorces on a choisi 9 amorces qui cibles les gènes d'ARNr 16S des groupes des bactéries les plus importantes pour le nouveau-né qui sont incluses dans les 4 phylums précédemment déterminés (Firmicutes ; Bacteroidetes ; Proteobacteria ; Actinobacteria) (figure 18).

Pour la détection des bactéries on a utilisé pour certaines les sondes TaqMan, leurs séquences listées dans la figure 18 et pour d'autres le SBERGreen.

Cible genre/ espèce	Phylum	Nom de l'amorce/ sonde TaqMan	Sequences d'amorces et sondes	Tm °C
Bifidobacterium	Actinobacteria	Bido-R	GCG-TGC-TTA-ACA-CAT-GCA-AGT-C	59
		Bido -F	CAC-CCG-TTT-CCA-GGA-GCT-ATT	59
		Bido sonde	TCA-CGC-ATT-ACT-CAC-CCG-TTC-GCC	70
E.coli	Proteobacteria	E.coli-R	CGC-GTA-ACG-TCA-ATG-AGC-AAA	59
		E.coli-F	CAT-GCC-GCG-TGT-ATG-AAG-AA	59
		E.coli sonde	TAT-TAA-CTT-TAC-TCC-CTT-CCT-CCC-CGC-TGA-A	68
Clostridium difficile	Firmicutes	Clostridium-R	TGT-ACT-GGC-TCA-CCT-TTG-ATA-TTC-A	58
		Clostridium-F	TTG-AGC-GAT-TTA-CTT-CGG-TAA-AGA	59
		Clostridium sonde	CCA-CGC-GTT-ACT-CAC-CCG-TCC-G	69
Bactéroides fragilis	Bacteroidetes	BFG-R	CCG-CAA-ACT-TTC-ACA-ACT-GAC	58
		BFG-F	CGG-AGG-ATC-CGA-GCG-TTA	59
		BFG sonde	CGC-TCC-CTT-TAA-ACC-CAA-TAA-ATC-CGG	68
Enterococcus	Firmicutes	Entero-R	CAG-TGC-TCT-ACC-TCC-ATC-ATT	47
		Entero-F	AGA-AAT-TCC-AAA-CGA-ACT-TG	58
		Entero sonde		
Staphylococcus	Firmicutes	Staph-R	GAA-CTG-AGA-ACA-ACT-TTA-TGG-GA	46
		Staph-F	GAT-GTG-CGA-AAG-CGT-GGG-GAT	51
Lactobacillus	Firmicutes	Lacto-R	CAC-CGC-TAC-ACA-TGG-AG	54
		Lacto-F	AGC-AGT-AGG-GAA-TCT-TCC-A	56
Enterobacteriaceae	Proteobacteria	En-Isu3R	TCA-AGG-CTC-AAT-GTT-CAG-TGT-C	47
		En-Isu3F	TGC-CGT-AAC-TTC-GGG-AGA-AGG	53
Clostridium perfringens	Firmicutes	CiPer-R	TTT-CAC-ATC-CCA-CTT-AAT-C	52
		CiPer-F	TAA-CCT-GCC-TCA-TAG-AGT	52

Figure 18 : Liste des amorces et des sondes des gènes ARN 16S des bactéries recherchées (17(75),(27),32, 68).

Une fois qu'on a sélectionné les amorces nécessaires pour les groupes des bactéries qu'on va rechercher dans nos échantillons pour l'initiation de la PCR en temps réel on peut commencer et préparer nos échantillons pour l'amplification.

5. Conservation :

Les conditions de stockage et de flux de travail sont importantes lors d'une analyse moléculaire fiable et comparable des échantillons des selles lors de l'étude des micro-organismes qui l'habite. Il faut prendre en compte le facteur le plus important qui est de maintenir l'ADN à un niveau détectable stable. Pour cette raison, il peut subsister d'autres exigences d'un coût prohibitif en matière d'équipement de refroidissement ou de congélation ou d'additifs chimiques spéciaux(76).

Sachant que le stockage des échantillons fécaux avant l'extraction de l'ADN est essentiel lors de la caractérisation de la composition du microbiote intestinal. Et que lors de notre étude le prélèvement des échantillons se faisait au fur et à mesure que le corps médical

du centre hospitalier universitaire CHU responsable des prélèvements ramenait les échantillons au niveau du laboratoire. Ceci avait pris du temps pour que la totalité de 350 échantillons soient rassemblés, il fallait penser à une méthode pour bien les conserver et pour ne pas endommager l'ADN qui se trouve dans les selles lors de cette conservation.

Pour être bien sûre de notre conservation on a cherché au niveau des articles bibliographiques qui ont aussi travaillé sur les selles, dans un but d'analyse moléculaire des bactéries, plusieurs méthodes de conservation étaient possibles.

Il existe plusieurs méthodes de stockage, conservation des échantillons en les mettant dans une basse température (-20° ou -35° ou -80°) uniquement ou par ajout d'un produit chimique avant de congeler les échantillons (-20° ou -35° ou -80°), soient :

- Ajout de l'ARNlater, solution de stabilisation qui est un réactif de stabilisation et de stockage de l'ARN tissulaire aqueux et non toxique qui imprègne rapidement les tissus pour stabiliser et protéger l'ARN cellulaire. La solution RNAlater minimise la nécessité de traiter immédiatement des échantillons de tissu ou de congeler des échantillons dans de l'azote liquide pour un traitement ultérieur. Les morceaux de tissu peuvent être récoltés et immergés dans une solution RNAlater pour le stockage sans compromettre la qualité ou la quantité d'ARN obtenue après l'isolement ultérieur de l'ARN (76).
- Ajout de l'éthanol/silice, plonger l'échantillon dans l'éthanol puis ajouté des billes de silica, cette technique prend du temps pour être réalisé, en plus ils peuvent rencontrer des difficultés à enlever les billes(76).
- Ajout de l'acide éthylène diamine tétra-acétique EDTA, dans 250 µL de selles diarrhéiques mélanger 100 mM d'EDTA (pH 8 avec une concentration de 1:4), puis centrifugation à 3,000 × g pendant 15 minutes(76).
- Ajout du phosphate-buffered saline PBS, on ce qui concerne le PBS il peut être ajouté de différentes façons pour la conservation avant l'extraction de l'ADN total :
 - ✓ Les échantillons fécaux peuvent être stockés directement dans une basse température puis avant de commencer l'extraction, les lavés trois fois par suspension dans 1,0 ml de solution saline tamponnée au phosphate puis centrifugation à 14 000 × g (77).
 - ✓ Les échantillons fécaux peuvent être recueillis dans des tubes vides puis mis en suspension dans neuf volumes de solution saline tamponnée au phosphate ensuite stocké à -30°C ou -80° jusqu'à l'extraction de l'ADN (18).

Le choix de la méthode à utiliser dépend des conditions (la durée de conservation, les moyens et le but de l'étude ...). Donc on ce qui concerne la méthode de conservation de notre étude, pour commencer on a fait dissoudre 1 comprimé de PBS dans 200 ml d'eau distillée puis dans des tubes Eppendorf de 2 mL où on a mélangé un petit pois de selle d'environ 0,5mg avec 900 µl de PBS (une concentration de 1:9) pour chaque échantillon, puis on les a stockés dans une température basse -20°C pour ceux qui allaient être étudiés dans le mois qui suit et dans -80°C pour ceux qui allaient dépasser 1 mois (Figure 19).

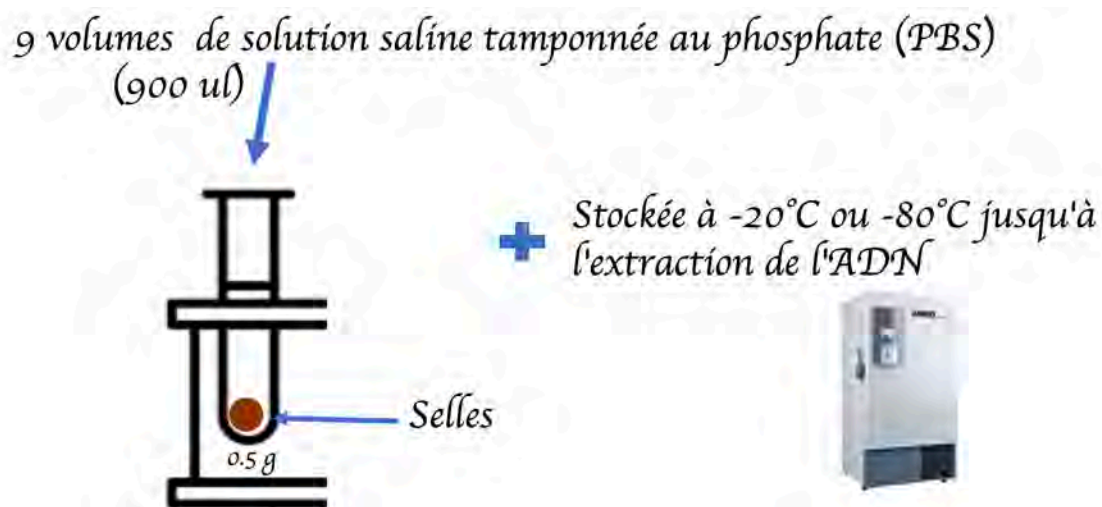


Figure 19 : Conservation des échantillons(18).

6. Extraction :

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'acide désoxyribonucléique des cellules ou des tissus. Elle peut ensuite être utilisée pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage ...

Pour extraire cette ADN il existe plusieurs techniques, la technique classique (ex :Phénol/Chloroforme) ou les kits commerciaux.

Les avantages de la technique classique sont la qualité de l'extraction, la pureté de l'extrait et le coût. Et les avantages des kits commerciaux sont la rapidité et la sécurité et la facilité de l'extraction.

Peu importe la technique utilisée pour l'extraction de l'ADN le principe est le même, extraire les acides désoxyribonucléiques en deux grandes parties :

- Extraction : digestion des tissus et lyse des cellules :

C'est la destruction de la membrane d'une cellule biologique par un agent physique, chimique ou biologique appelé lyse mécanique, lyse chimique ou lyse enzymatique.

- Purification : séparation de l'ADN des autres constituants cellulaires.

En ce qui concerne notre étude, on a utilisé le Kit commercial : Monarch® Genomic DNA Purification Kit

Un kit :

- Qui est facile à l'utilisation pour la purification d'ADN à partir de plusieurs types d'échantillons, fonctionne avec des échantillons difficiles à lyser.
- Qui donne d'excellents rendements d'ADN hautement pur.
- Qui isole l'ADN de haut poids moléculaire (taille du pic généralement ≥ 50 kb).
- Qui utilise l'ADN directement dans les applications en aval.
- Qui a un temps de manipulation minimal.

Avant de commencer la manipulation de l'extraction il faut :

1. Stocker la RNase et la protéinase K à -20°C .
2. Décongeler les échantillons conservés en les mettant à 4°C la veille de l'extraction
3. Ajouter 45 ml de l'éthanol ($\geq 95\%$) au concentré de tampon de lavage Monarch gDNA comme indiqué sur l'étiquette du flacon.
4. Préchauffer le volume approprié de tampon d'élution à 60°C (35 à 100 μl par échantillon).
5. Centrifugation des échantillons (1min ; 1500 rpm)

- La lyse des échantillons :

On a utilisé un protocole hybride issu du sang total nucléé et du tissu animal protocoles.

Pour obtenir des étapes de lyse adéquate à nos échantillons comme suit (figure 20) :

1. Transférer 100 μl du surnageant (PBS +selles) dans un tube d'ependorf.
2. Ajouter 10 μl de protéinase k (Pour le clivage des protéines) + 100 μl de Tampon de lyse tissulaire (Pour la lyse des membranes nucléaires et cellulaires, pour maintenir le Ph qui protège l'ADN et pour la séparation de l'ADN des débris cellulaires.) puis vortexer.
3. Incubation à 56°C dans un mixer thermal à pleine vitesse (~ 1400 rpm) pendant 3h
4. Ajouter 3 μl d'ARNase au lysat (pour éliminer les ARNs) puis vortexer.

5. Incuber à 56°C dans un mixer thermal à pleine vitesse (~1400 rpm) pendant 5 min.

○ Purification de l'ADN :

Les étapes étaient les même pour tous les types d'échantillons, donc on n'a pas trouvé de difficulté dans ce niveau et on a suivi le protocole de purification à la lettre (figure 5).

1. Ajouter 400 µl de tampon de liaison à l'échantillon Lysé (pour faciliter la liaison et la récupération efficaces de l'ADN à partir de réactions enzymatiques et d'échantillons d'ADN impurs).
2. Vortexer pendant 5 à 10 s.
3. Transférer 600 µl du mélange lysat / tampon de liaison dans la colonne de purification
4. Centrifuger pendant 3min à 1000g puis une centrifuger une deuxième fois pendant 1 min à 12000g, pour nettoyer la colonne.

Lavage :

5. Jeter le tube de collection
6. Mettre la colonne dans un nouveau tube de collection
7. Ajouter 500 µl de tampon de lavage et mélanger par retournement plusieurs fois (Lavage 1 : W1).
8. Centrifuger pendant 1 minute à vitesse maximale.
9. Jeter le tube de collection.
10. Mettre la colonne dans un nouveau tube de collection.
11. Refaire le lavage une autrefois.

Élution de L'ADN :

1. Transférer la colonne de purification dans un tube de 1,5 ml.
2. Ajouter 50µl de tampon d'élution préchauffé à 60 °C.
3. Fermer le tube et incuber le dans la température de la salle pendant 1 minute.
4. Centrifuger à une vitesse > 12 000 x g pendant 1 minute.
5. Jeter la colonne.
6. Conserver le tube d'éluat à 4°C pendant une semaine ou à – 20 °C après une semaine.

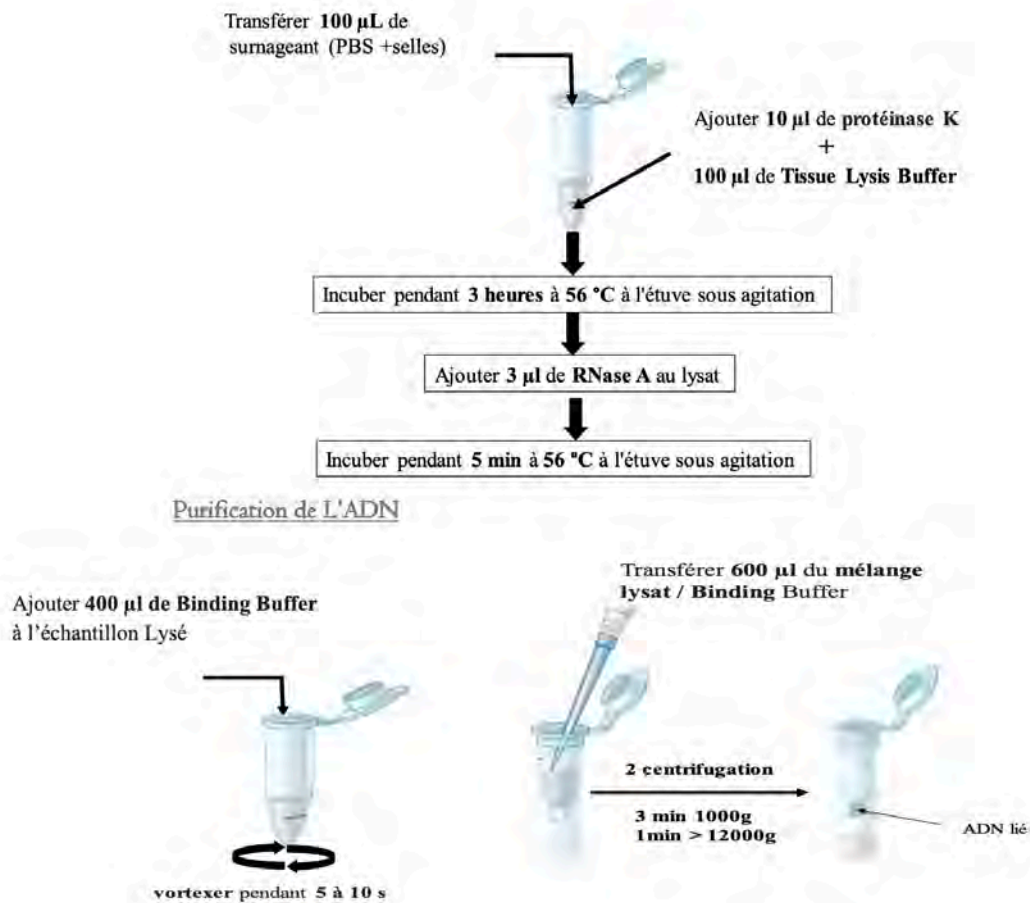


Figure 20 : Protocole de l'extraction.

7. Quantification de l'ADN issu de l'extraction :

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet). Parallèlement on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm, 230 nm et 320 nm(78).

Il existe plusieurs spectromètres pour la quantification de l'ADN, le spectrophotomètre à cuve qui était la seule option disponible pour quantifier la concentration d'ADN par des mesures d'absorbance. Cependant, son application était très limitée en raison du grand volume d'échantillon requis et du petit volume d'échantillon disponible en biologie moléculaire. Après il a eu l'introduction du spectrophotomètre à microvolume (nanodrop), qui permet de mesurer de minuscules gouttes de l'échantillon (généralement 1 µL)(79).

La quantification de l'ADN avec un spectrophotomètre à microvolume (figure 21) est simple et directe, mais les échantillons doivent être mesurés individuellement avec une courte

étape de nettoyage entre les échantillons, ce qui est plutôt long lorsqu'il faut quantifier un grand nombre d'échantillons. C'est pourquoi l'utilisation d'un lecteur de microplaques est recommandée pour mesurer plus d'échantillons en moins de temps.

On se qui concerne la quantification de nos extraits on a utilisé le spectrophotomètre à microvolumes qui nous a donné une idée sur la pureté et la concentration de l'ADN.

Donc il a été nécessaire de quantifier l'ADN extrait avant de commencer les études en avale.

Le processus pour mesurer l'ADN à partir d'une goutte d'échantillon était :

1. Programmer l'appareil « spectromètre à microvolumes » sur le menu : protocole de l'acide nucléique.
2. Modifier le nom de l'échantillon et sélectionner le type pour un calcul correct de concentration.
3. Sélectionner le bouton pour entrer les informations de la solution vierge.
4. Ouvrir le panneau de l'appareil et nettoyer soigneusement les surfaces de verre supérieure et inférieure avec un torchon de laboratoire non pelucheux.
5. Ajouter 1 μl de la solution vierge pour calibrer le spectromètre et fermer le panneau.
6. Cliquer sur commencer et attendre que l'appareil prélève la solution vierge.
7. Cliquer sur mesurer.
8. Ouvrir le panneau de l'appareil et nettoyer soigneusement les surfaces de verre supérieure et inférieure avec un torchon de laboratoire non pelucheux.
9. Ajouter 1 μl de l'extrait de l'ADN.
10. Cliquer sur commencer attendre que les mesure soit calculer puis on va obtenir les résultats.

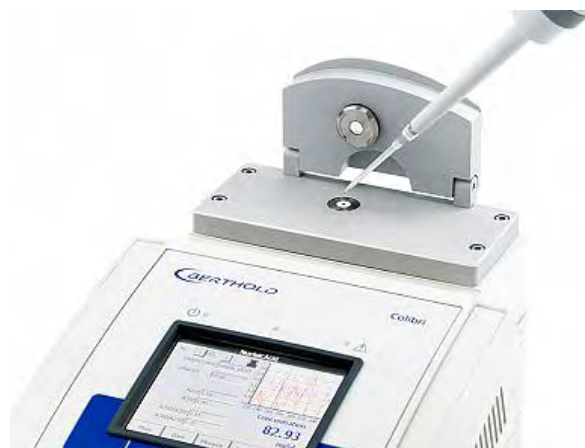


Figure 21 : Spectrophotomètre à microvolumes (nanodrop).

8. Amplification en chaîne polymérase quantitative :

Pour l'amplification par PCR en temps réel, on a utilisé le système de PCR rapide en temps réel 7500 associé au Logiciel 7500 v2.x qui offre une performance maximale en un minimum de temps (36 min (rapide) <2 h (standard)) avec des résultats de haute qualité et une possibilité d'exécuter plusieurs tests rapides sur une seule plaque de 96 puits.

Tout d'abord, on a programmé l'ICycler de l'Applied Biosystem 7500 en deux programmes, un programme pour les amplicons détectables par le SBERGreen et ceux détectables par les sondes TaqMan.

○ Cycle Programme :

Tableau 1 : Sybergreen Programme.

	Etapes du Cycle	Température	Temps
	Dénaturation Initial	95 °C	10 minutes
<i>X 40 Cycles</i>	Dénaturation	95°C	15 seconds
	Hybridation	60 °C	1 minutes
	Elongation	72 °C	2 minutes

Tableau 2 : Taqman Programme.

	Etapes Cycle	Température	Temps
	Dénaturation Initial	95 °C	10 minutes
<i>X 40 Cycles</i>	Dénaturation	95°C	15 seconds
	Hybridation	60 °C	1 minutes
	Elongation	72 °C	15 seconds

Au niveau du logiciel on remplit un programme de plaque où on entre les données de nos échantillons.

Tableau 3 : Programme de la plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1											CP
B	S2											
C												
D												
E												
F												
G												
H												CN

S1 : échantillon 1 ; PC : Control positive ; NC : Control Négative

Et pour ne pas se perdre lors du dépôt des réactifs, vu le nombre élevé de réactions, pour 350 échantillons on va vérifier la présence de 9 groupes des bactéries, ce qui fait un total de 3150, on a préparé une fiche similaire au programme de la plaque qu'on remplit.

Puis on a préparé le mixte des réactifs en utilisant deux kits (figure 22):

- Taq-polymerase kit : Luna Universal Probe qPCR Master Mix
- Sybergreen : Luna Universal q PCR Master Mix



Figure 22 : Kits du master mix de la PCR quantitative.

Pour préparer le mixte il faut :

1. Décongeler Luna Universal qPCR Master Mix et les autres composants de la réaction à température ambiante.
2. Diluer les amorces de 100 μ M à 10 μ M.
3. Diluer les sondes de 100 μ M à 10 μ M (pour le cas des réactions qui utilise les sondes TaqMan pour la détection).
4. Déterminer le volume total pour le nombre approprié de réactions :

Tableau 4 : Taq-polymerase kit: Luna Universal Probe qPCR Master Mix.

Components	20 μ l (1 reaction)	X reaction
Luna universal Probe qPCR mix	10 μ L	X * 10
Forward primer (10 μ M)	0.8 μ L	X* 0.8
Reverse primer (10 μ M)	0.8 μ L	X* 0.8
Probe (10 μ M)	0.4 μ L	X* 0.4
Template DNA	5 μ L	
Nuclease freewater	To 20 μ L	X* 10

Tableau 5 : Sybergreen : Luna Universal q PCR Master Mix.

Components	20 μ l (1 reaction)	X reaction
Luna universal qPCR master mix	10 μ L	X * 10
Forward primer (10 μ M)	0.5 μ L	X* 0.5
Reverse primer (10 μ M)	0.5 μ L	X* 0.5
Template DNA	5 μ L	
Nuclease freewater	To 20 μ L	X* 10

5. Mélanger le tout sauf l'ADN matrice.
6. Répartir le mélange dans les puits (15 μ l).
7. Ajouter l'ADN (5 μ l).
8. Fermer avec le film adhésif optique.
9. Centrifuger 1 minute à 2 500–3 000 tr/min Pour éliminer les bulles et recueillir le liquide.
10. Mettre la plaque dans l'iCycler.
11. Démarrer la PCR.

V. Résultats et discussion :

1. Résultats de la quantification de l'ADN extrait :

Après extraction de l'ADN de nos échantillons de selles, on a quantifié les extraits par le spectrophotomètre à microvolumes (le nanodrope) pour connaître les concentrations et les qualités de leurs ADN (79).

La connaissance de ces informations est une chose très importante pour l'étude de biologie moléculaire après extraction, surtout pour l'étude en aval de l'extraction. Ceci nous donne des informations sur la quantité et la pureté de l'ADN présente dans l'éluat, si elle est contaminée par des protéines, des sels ou autres.

Pour ce faire, on a déposé une goutte de nos extraits dans le nanodrope comme expliqué dans la partie matériel et méthodes. Pour obtenir des résultats comme indiquer dans la figure 23 :

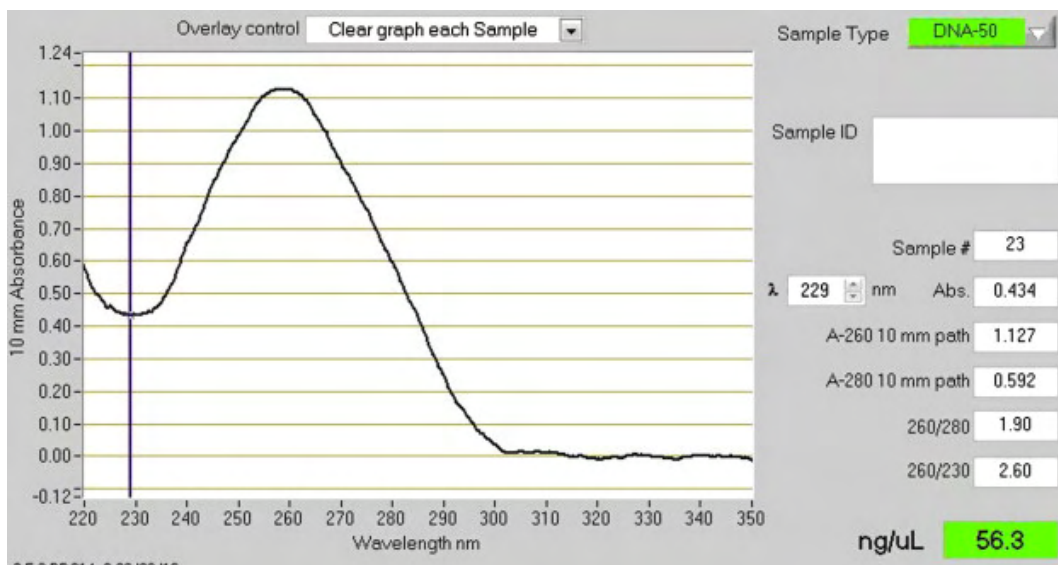


Figure 23 : Exemple de résultat du nanodrope (spectrophotomètre à microvolumes).

Grâce au nanodrope, on a obtenu un graphe qui représente les variations des longueurs d'onde de 220 nm jusqu'à 350 nm dans l'axe des abscisses et les valeurs d'absorbance dans l'axe des ordonnées, à côté on trouve une case soulignée en verre, c'est la concentration de l'ADN en ng/μl par exemple dans la figure c'est 56.3 ng/μl.

On trouve aussi deux cases importantes qui sont nommées 260/280 et 260/230. Ces ratios ont pour but de donner des informations sur la pureté de l'ADN. Le ratio 260/280 nous informe si l'extrait est contaminé par les protéines et le ratio 260/230 s'il est contaminé par sels ou autre

contaminant. Qui 260 nm réfère à la longueur d'onde de l'absorption maximale d'un rayon par l'ADN et l'ARN, elle est différente de la longueur d'onde de l'absorption maximale de la protéine qui est 280 nm.

Les valeurs optimales sont dans le tableau 6 (80) :

Tableau 6 : Valeurs optimales des ratios qui détermine la pureté des acides nucléiques (80).

Sample	260/230	260/280
RNA	2.00 (2.00 – 2.20)	2.00 (1.80 – 2.00)
DNA	2.00 (2.00 – 2.20)	1.80 (1.80 – 2.00)

L'allure du graphe donne aussi des informations sur la qualité de l'extrait, si l'extrait et de bonne qualité la courbe obtenue a un pic au niveau de la longueur d'onde 260 nm, sinon la courbe aura un pic élargi de la valeur 260 nm ou aura deux pics sur des longueurs différentes.

Lors de notre étude, la majorité des extraits ont été d'une bonne quantité et qualité ce qui signifie que le protocole qu'on a utilisé lors de l'extraction a donné de bons résultats, mais pour quelques éluats on a eu des exceptions comme avoir une concentration élevée et une mauvaise qualité, de l'ADN contaminé par des protéines ou autres contaminants et même des cas où la concentration de l'ADN était très basse. Ceci peut être expliqué par une erreur de manipulation ou autres, et pour ces cas nous avons refait l'extraction.

2. Résultats de la PCR en temps réel :

- a) Les deux technologies d'émission de fluorescence : la TaqMan et SYBER Green :

Les résultats obtenus à la fin de la PCR quantitative sont sous forme de graphe avec des courbes représentatives des mesures de l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle de la PCR. Le mode d'émission de cette fluorescence ne change rien au niveau des interprétations peu importe que ça soit provoqué par un agent intercalant inséré dans de l'ADN double brin ou par libération de fluorescence par des sondes (figure 24).

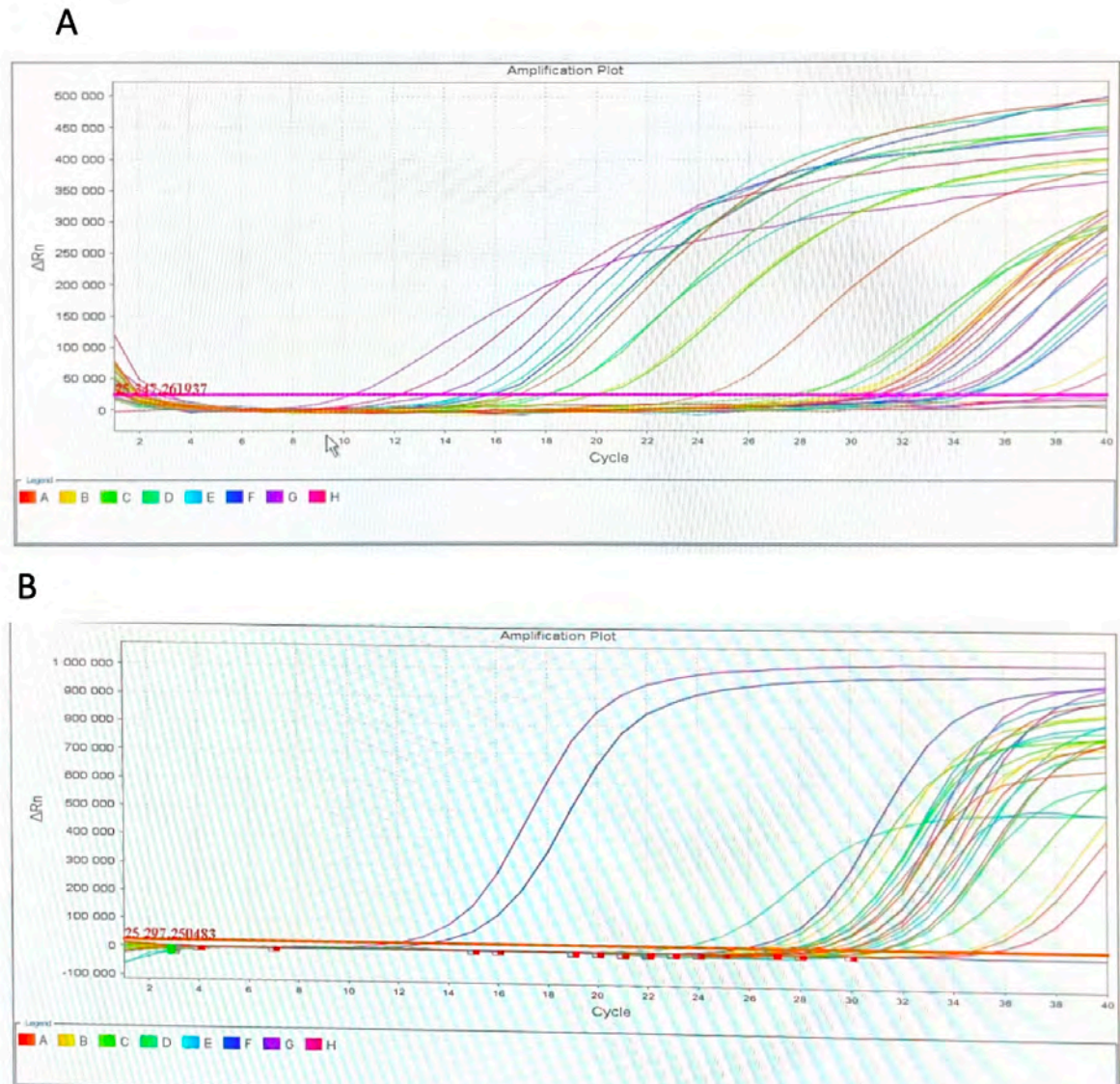


Figure 24 : résultats PCR en temps réel.

A : émission de fluorescence par SYBER Green. B : émission de fluorescence par sonde TaqMan

La différence entre les deux modes d'émission le SYBER Green et la sonde TaqMan sont aux niveaux :

- De la méthode d'émission de la fluorescence.
- De la nécessité de sonde pour la TaqMan.
- De l'analyse génétique multiplex.
- Du coût des techniques.
- De la spécificité et efficacité de la méthode.

Tableau 7 : les différences entre le SYBERGreen et la TaqMan en anglais (81).

SYBR Green vs Taqman	
SYBR Green is based on DNA binding dye.	Taqman depend on hybridization probes and 5' to 3' exonuclease activity of Taq polymerase.
Fluorescently Labeled Probes	
No fluorescently labeled probes are not required.	Dual-labeled probes are required.
Multiplex Gene Analysis	
It can not be used for multiplex gene targets.	It can be used for multiplex gene targets.
Cost	
This is less expensive.	This is more expensive.
Specificity	
This is less specific and binds with any double strand DNA	These are highly specific since probes detect the specific amplification products.
Effectiveness	
This is less effective.	This is highly effective.
Application	
This is used in real-time PCR, agarose gel visualization, DNA labeling etc.	This is used in real time PCR, quantification of gene expression, detection of genetic polymorphisms, etc.

En résumé, travailler avec la méthode SYBR Green est moins cher et plus facile que TaqMan car il n'est pas nécessaire de faire la conception et la synthèse de la sonde, sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (64). Mais dans de nombreux cas, les scientifiques préfèrent la méthode TaqMan. Car la puissance de la méthode TaqMan repose sur sa spécificité en raison de sa conception unique basée sur la sonde oligonucléotidique à double marquage et l'activité exonucléase de l'enzyme Taq polymérase, tandis que la conception SYBR Green est basée sur la liaison du colorant fluorescent à l'ADN double brin. Il est clair que la méthode SYBR Green n'est pas spécifique qui peut donner des résultats faussement positifs et des données incorrectes et décalées qui peuvent conduire à une diminution des performances (82). Mais aussi la technologie TaqMan est moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques.

On ce qui concerne notre étude, on a essayé de notre mieux de travailler la détection de la fluorescence avec les sondes TaqMan, travailler avec la TaqMan et en même temps

rechercher les bactéries dans un domaine plus large, le genre, non pas l'espèce et remonter toujours au phylum, était difficile à réaliser. Car les sondes TaqMan visent majoritairement l'espèce. Pour cela lors de notre étude on a analysé 5 groupes de bactérie avec la sonde TaqMan en essayant de trouver des sondes qui vise le genre et 4 avec la détection de la fluorescence par SYBER Green.

On pouvait aussi travailler avec d'autres méthodes d'émission de fluorescence comme la balise moléculaire, HybProbes ou Scorpion mais dans l'analyse quantitative de l'expression génique, la TaqMan et le SYBR Green restent les deux méthodes les plus populaires(82), il est vrai que la balise moléculaire a l'avantage d'être intacte et réutilisable lors des cycles de PCR suivant, seulement il ne faut pas oublier l'inconvénient majeur associé à l'utilisation des balises moléculaires, qui est le design des sondes d'hybridation. Avec un design non adéquat de son tronc, ceci pourrait adopter une conformation différente qui éloignerait le fluorochrome émetteur de l'environnement immédiat du suppresseur résultant ainsi en une population de sondes mal supprimées et un bruit de fond important, même si la balise moléculaire a l'avantage d'être intacte et réutilisable lors des cycles de PCR suivant. On se qui concerne la technique HybProbes, au niveau de notre étude elle n'est pas adéquate car c'est une technique qui repose sur l'utilisation de deux sondes linéaires complémentaires à une séquence cible pour maximiser la spécificité du signal et ce qui va obligatoirement limiter notre étude à l'espèce(65). La détection par Scorpion est généralement plus efficace que les technologies Taqman et balises moléculaires, mais dans un programme de PCR possédant des cycles très courts.

b) L'interprétation de la PCR :

Les résultats de la PCR en temps réel sont affichés dans les tracés d'amplification. La fluorescence est tracée sur l'axe Y, tandis que le nombre de cycles de PCR est tracé sur l'axe X. Les courbes d'amplification comprennent une phase initiale qui produit une fluorescence inférieure au niveau détecté par le thermocycleur, une deuxième phase d'augmentation de la fluorescence et une troisième phase appelée « plateau » où la réaction se termine et la fluorescence se stabilise plus, à cause de la saturation des réactifs ou que le taux de détection de fluorescence est à son maximum et n'est plus détectable. Dans la deuxième phase, un seuil peut être défini, qui représente la zone d'augmentation exponentielle. Cette valeur est représentée par une ligne horizontale dans le graphique (Threshold) (figure 25). L'intersection de la courbe d'amplification avec la ligne de seuil est appelée Ct (Threshold Cycle). Le point

qui représente le cycle au cours duquel la fluorescence atteint la valeur seuil (Threshold). Plus la quantité initiale d'ADN est élevée, moins il faut de cycles pour atteindre le seuil (figure 26).

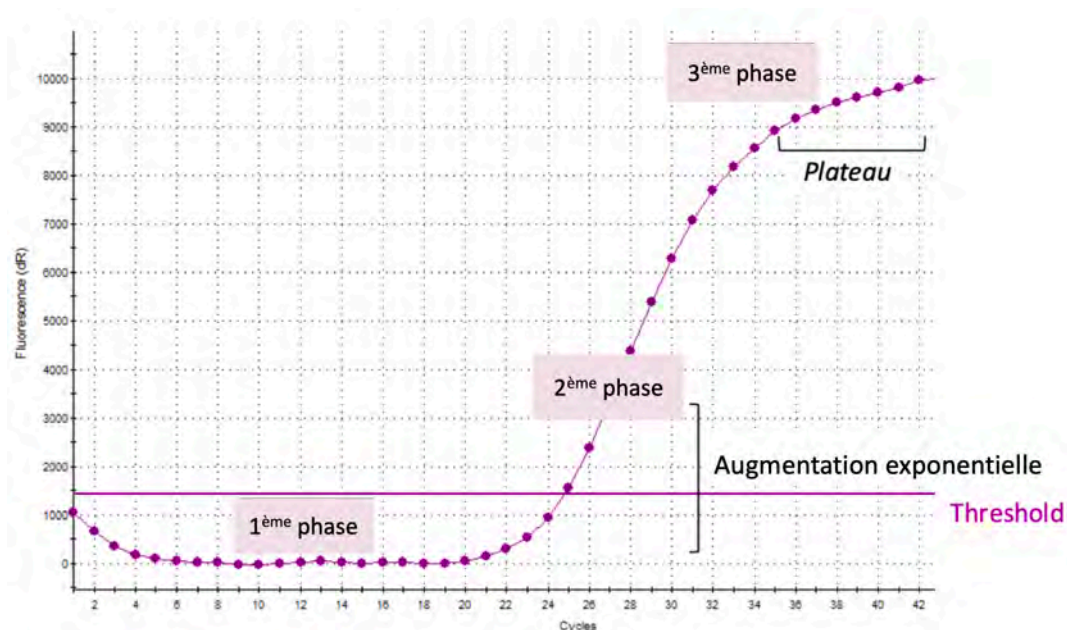


Figure 25 : Tracé d'amplification PCR en temps réel montrant les trois phases(83).

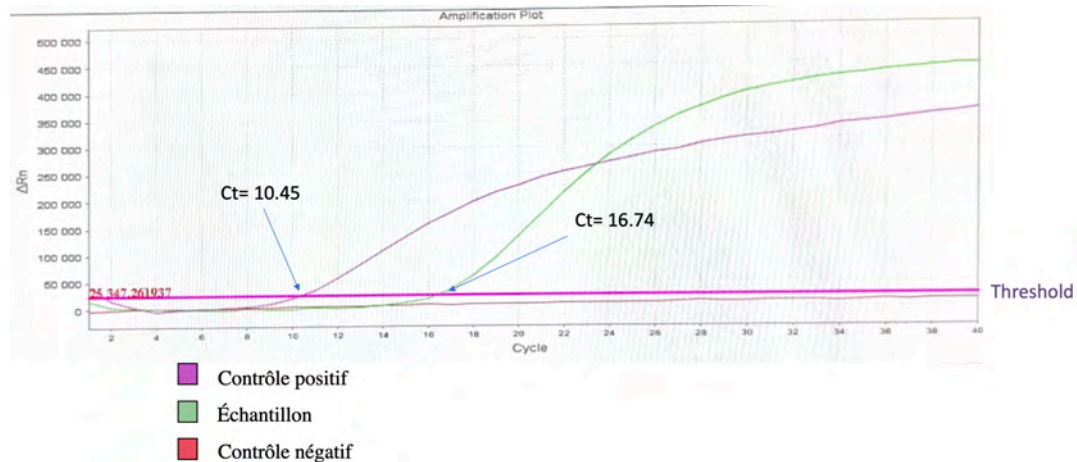


Figure 26 : Graphes d'amplification du contrôle positif, contrôle négatif et d'un échantillon dans lequel l'échantillon franchit la ligne de seuil plus tard que le contrôle positif. NB : Le contrôle négatif n'atteint pas le seuil car il ne contient pas d'ADN matrice initial à amplifier.

Les courbes d'amplification peuvent être visualisées soit avec les deux axes à l'échelle linéaire (figure 27A), soit avec l'axe Y à l'échelle logarithmique (figure 27B), étant les deux présentations appropriées pour interpréter les résultats. Le graphique semi-logarithmique peut être utile pour ajuster manuellement la valeur de seuil dans l'augmentation exponentielle de la fluorescence dans la deuxième phase, puisque cette augmentation apparaît comme une ligne droite en utilisant ce mode de visualisation (figure 27B). Plusieurs méthodes mathématiques

peuvent être utilisées pour calculer la meilleure position du seuil mais, dans tous les cas, il doit être situé dans la zone exponentielle de la deuxième phase. Aujourd'hui, tous les automates incluent dans leur logiciel un système pour calculer automatiquement la position du seuil, bien qu'il soit également possible de l'ajuster manuellement dans les paramètres recommandés(83).

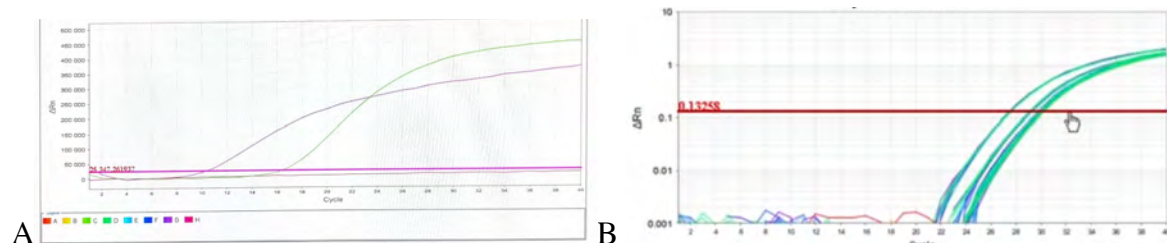


Figure 27 : (A) Graphe d'amplification en échelle linéaire. (B) Graphe d'amplification en échelle semi-logarithmique.

Lors de l'analyse des résultats PCR en temps réel, les courbes d'amplification doivent être belles et parallèles. Les Cts doivent être <35 . Si une courbe est bizarre il faut l'enlever de l'analyse. Si les Cts de certaines courbes sortent après 35, il est préférable de ne pas les utiliser. Dans ce cas, les résultats doivent être soigneusement et minutieusement analysés pour faire la distinction entre une amplification tardive détectée par PCR due à de faibles quantités d'ADN matrice et un éventuel bruit de fond à la fin du cycle. Afin de ne pas biaiser les résultats et de s'assurer que le fragment en question est amplifié, et ainsi présent dans l'échantillon(84).

c) Exemple d'interprétation de nos résultats.

On ce qui concerne les interprétations de nos études on a interprété tous nos résultats de la même façon en se basant sur le Ct, le contrôle négatif et le contrôle positif pour pouvoir contrôler nos réactions de PCR quantitative. Comme par exemple si le contrôle négatif est positif les résultats sont donc erronés soit il a une contamination ou autres, dans tous les cas il faut refaire la manipulation et ne pas prendre les résultats en considération. De même si le contrôle positif est négatif. Dans le cas normal, si le gène 16s de la bactérie recherchée est amplifiée alors la bactérie est présente dans l'échantillon, sinon elle est absente. À titre d'exemple, pour le genre *Lactobacillus* dans la figure les résultats de la PCR en temps réel pour les échantillons : 0105, 0106, 0107 (Patient numéro 10 échantillons 5, 6 et 7) (figure 28).

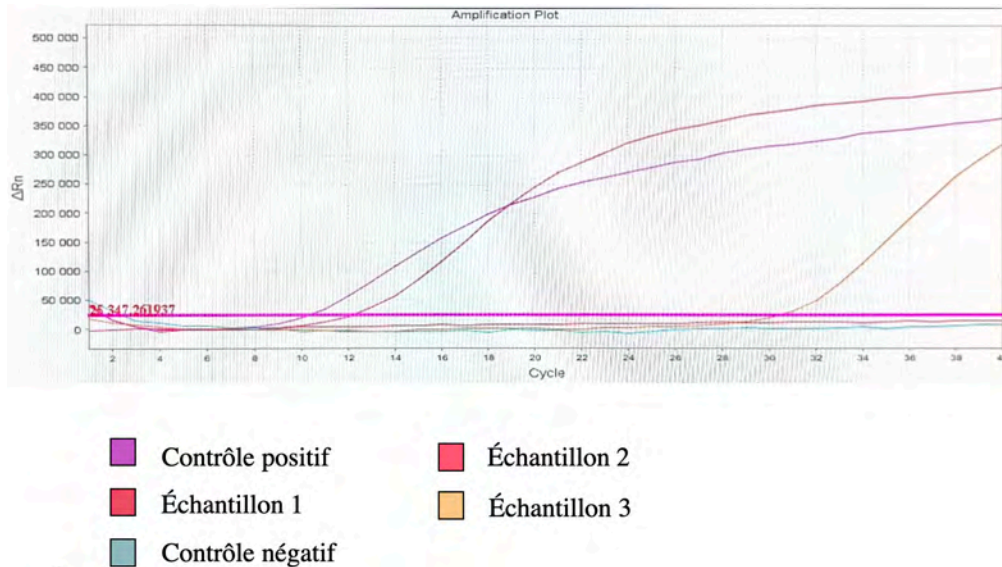


Figure 28 : Graphe d'amplification de 3 échantillons avec contrôle positif et négatif.

Comme on peut l'observer dans la figure, on a le contrôle négatif qui est négatif (pas d'amplification de l'ADN matrice), le positif qui est positif (amplification de l'ADN matrice) avec un Ct d'environ 10.2. Pour l'échantillon 0105 il est négative car la courbe d'amplification est au-dessous du seuil (Thershold) et linéaire, il n'y a pas eu d'amplification ceci signifie que la bactérie *Lactobacillus* n'est pas présente dans l'échantillon. Pour l'échantillon 0106 ça n'était pas facile de donner une conclusion puisque son Ct était d'environ 30,5 comparé au contrôle positif, le Ct est loin mais ne dépasse pas les 35, on pourrait considérer qu'il est positif et que la bactérie *Lactobacillus* est présente mais avec une faible quantité. Finalement pour l'échantillon 0107, en observant sa courbe d'amplification on remarque que le taux de fluorescence augmente au cours des cycles PCR quantitative, ceci signifie que le gène 16 s de la bactérie a été amplifier et que la *Lactobaccilus* est présente dans l'échantillon. Ce dernier résultat enlève le doute sur l'interprétation de l'échantillon 0106 qui a été douteuse. Car la durée de prélèvement de l'échantillon 0106 est une semaine avant le 0107, et puisqu'on est en train d'étudier le microbiote intestinal du nouveau-né prématuré, le prématuré est en train de développer son microbiote en grandissant, ce qui signifie que la colonisation des bactéries dans le cas normal (sans infection ou de consommation d'antibiotique...) doit augmenter au fur et à mesure. Autrement dit la concentration d'une bactérie x à $j+3$ doit être plus élevée que celle de j_0 . Il faut prendre ceci en considération ou vérifier sur le gel ou sur le bioanalyseur que l'ADN n'est pas dégradé lors de l'interprétation des résultats pour pouvoir émettre une confirmation sur les résultats douteux.

On avait un total de 3150 courbes à interpréter, et pour être organisé et faciliter la tâche, on a réalisé une fiche ou on a regroupé pour chaque patient les résultats de ces 7 selles avec les 9 bactéries recherchées, remontant au 4 phylums qu'on a visé au départ (la présence de genre ou d'espèce de bactérie qui appartient un phylum donné, signifie la présence du phylum). En déterminant le signe « - » si les bactéries sont absentes de l'échantillon et le signe « + » si elles sont présentes (figure 29).

N° Patient	Bactérie	M	1 ère semaine		2 ème semaine		3 ème semaine	
MIP 001		0011	0012 et 0013		0014 et 0015		0016 et 0017	
	Bido Actinobacteria	-	-	-	-	-	-	-
	E.coli Proteobacteria	-	-	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	-	-	-	-	+
	BFG Bacteroidetes	-	-	-	-	-	-	-
	Entérocoque Firmicutes	-	-	+	+	+	+	+
	staph Firmicutes	-	-	-	-	-	-	+
	Lacto Firmicutes	-	-	-	-	-	-	-
Proteobacteria	entérobactériacea	-	-	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	-	-	-	-	-
MIP 002		0021	0022 et 0023		0024 et 0025		0026 et 0027	
	Bido Actinobacteria	-	-	-	-	-	-	-
	E.coli Proteobacteria	-	+	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	+	+	+	+	+
	BFG Bacteroidetes	-	-	-	-	-	-	-
	Entérocoque	-	+	+	+	+	+	+
	staph Firmicutes	-	+	+	+	+	+	+
	Lacto Firmicutes	-	-	-	-	-	-	-
Proteobacteria	entérobactériacea	-	+	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	+	+	+	+	+
MIP 003		0031	0032 et 0033		0034 et 0035		0036 et 0037	
	Bido Actinobacteria	-	-	-	-	-	-	-
	E.coli Proteobacteria	-	-	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	-	+	+	+	+
	BFG Bacteroidetes	-	-	-	-	-	-	-
	Entérocoque	-	-	+	+	+	+	+
	staph Firmicutes	-	+	+	+	+	+	+
	Lacto Firmicutes	-	-	-	-	-	-	+
Proteobacteria	entérobactériacea	-	-	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	-	-	-	-	-
MIP 004		0041	0042 et 0043		0044 et 0045		0046 et 0047	
	Bido Actinobacteria	-	-	-	-	-	-	-
	E.coli Proteobacteria	-	-	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	-	-	-	-	-
	BFG Bacteroidetes	-	-	-	-	-	-	-
	Entérocoque	-	-	+	+	+	+	+
	staph Firmicutes	-	-	+	+	+	+	+
	Lacto Firmicutes	-	-	-	-	-	-	-
Proteobacteria	entérobactériacea	+	+	+	+	+	+	+
Firmicutes	Clostridium <i>diff</i>	-	-	-	-	-	-	-

Figure 29 : Résumé des interprétations des résultats de la PCR en temps réel pour chaque patient,

+ : présence de bactérie, - : absence de bactérie.

Cette fiche nous a permis de bien visualiser et d'avoir une vue globale sur les résultats de la PCR et observer facilement les bactéries présentes dans les échantillons en observant leurs présences et absences au fur et à mesure des semaines. Connaître la semaine de l'apparition de la bactérie, savoir s'il y a tout un phylum manquant où juste un genre, cette fiche permet même de revoir et refaire des études sur les résultats de PCR en temps réel qui étaient douteux, dans certains cas même remonter jusqu'à l'extraction pour vérifier si peut-être il a eu contamination. Pour éliminer les résultats qui peuvent biaiser l'analyse.

On a eu des cas où lorsqu'on observe la présence et l'absence au fur et à mesure des semaines de certaines bactéries, on remarque que la bactérie était présente aux premières semaines puis elle ne les plus au cours des dernières semaines. Cela nous a ramené à réfléchir si le problème était technique ou autres, alors pour ces cas on a refait la manipulation dès le départ pour tous les 7 échantillons amplifiant le gène 16s de la bactérie, mais malgré cela on a retrouvé les mêmes résultats. On a pensé que peut-être ceci est dû au manque d'information des conditions des patients qu'on n'avait pas à la portée comme l'état des prématurés, leurs conditions physiques ou s'ils ont pris des antibiotiques... car ceci peut affecter leurs microbiotes. Surtout que le traitement des prématurés avec des antibiotiques au cours de la première semaine de vie est lié à une diminution des bactéries saines nécessaires à la digestion du lait et à une augmentation de la résistance aux antimicrobiens (85) et ceci est un facteur qui peut expliquer la disparition de la bactérie pour ces patients-là. Cette diminution des bactéries nécessaires à la vie des prématurés peut avoir des conséquences sur le processus naturel d'amorçage et de maturation immunitaires. Les dernières études basées sur le microbiome montrent une relation claire entre la perturbation du microbiome, en particulier au début de la vie, et les problèmes de santé liés à l'inflammation Par exemple, une diversité réduite du microbiote fécal est associée au développement de maladies allergiques et de diabète plus tard dans la vie (86–90).

Le plus important pour le laboratoire, c'est d'avoir des bons résultats, les regrouper et les donner au porteur du projet, pour une étude post analytique en ce qui concerne toutes les études qui peuvent se réaliser en aval. Étude statistique qui comporte les nombres des patients et les phylums de bactérie qui colonise leurs macrobites intestinaux, une étude comparative entre les microbiotes intestinaux des nouveaux nés et les nouveaux nés prématurés, une étude sur les effets de l'antibiotique sur le microbiote intestinal des nouveau nés, ou une étude thérapeutique, nutritive ou autres...

Tous les résultats ont été remis au porteur du projet, le professeur qui va réaliser l'étude post analytique, sous forme de fichier Excel regroupant les 3150 résultats et un tableau qui résume les nombres des phylums présents chez les patients au cours de chaque semaine. Ces tableaux sont des résultats confidentiels qu'on n'a pas pu mettre dans cette mémoire.

3. Autres techniques d'étude du microbiote :

Les méthodes de détection des microbes sont nombreuses, il n'existe pas bien sûr que les méthodes de biologie moléculaire mais aussi les méthodes classiques comme la culture dans des milieux spéciaux, la coloration, l'étude de l'activité enzymatique des bactéries ou observation de la morphologie des bactéries par microscope. Ces techniques sont des techniques anciennes standards de la microbiologie utilisées jusqu'à maintenant, mais sont des techniques qui dépendent de la culture, des connaissances et elles nécessitent du temps. Il existe aussi des méthodes immunologiques comme l'ELISA (le dosage immuno-enzymatique), MALDI-TOF (Désorption/ionisation laser assistée par matrice) ou Biosenseur qu'elles ont une grande spécificité, elles sont quantitatives et qualitatives, leurs inconvénients c'est qu'elles sont des techniques qui visent plus les microbes pathogènes, coûteuses et ont des interférences au niveau des résultats avec le risque de donner des faux positifs.

Il existe également des méthodes spectroscopiques comme NIR (Spectroscopie infrarouge proche), RAMAN ou Hyperspectral Imaging qui sont très spécifiques non destructives et culture indépendante, leurs inconvénients sont la saturation du signal et la préparation d'échantillons qui est compliquée.

Lors de l'étude du microbiote les méthodes de biologie moléculaire restent les plus utilisées car malgré leurs prix élevés, ils sont les méthodes les plus faisables et adéquates qui visent l'objectif d'étudier la majorité des microorganismes présents dans le microbiote intestinal chez le nouveau-né prématuré. On a utilisé dans notre étude la PCR quantitative et on pouvait également utiliser la PCR conventionnelle classique sauf que la qPCR fournit la précision et la puissance nécessaires à l'analyse de la recherche en aval. L'utilisation de la PCR numérique (dPCR) est aussi possible. La réaction en chaîne par polymérase numérique est un raffinement biotechnologique des méthodes conventionnelles de réaction en chaîne par polymérase qui peut être utilisée pour quantifier directement et amplifier par clonage les brins d'acides nucléiques. La dPCR effectue également une seule réaction dans un échantillon, mais l'échantillon est séparé en un grand nombre de partitions et la réaction est effectuée dans chaque partition individuellement. Cette séparation permet une collecte plus fiable et une mesure sensible des quantités d'acide nucléique. Cette méthode peut également être utilisée lors de la détection des

microbes mais elle est génialement utile pour étudier les variations dans les séquences de gènes (telles que les variantes du nombre de copies et les mutations ponctuelles) et elle est couramment utilisée pour l'amplification clonale d'échantillons pour le séquençage de nouvelle génération. La différence entre la qPCR et la dPCR c'est au niveau de la quantification, la dPCR fournit une quantification absolue, car elle mesure la fraction positive des échantillons, qui est le nombre de gouttelettes fluorescentes en raison d'une amplification appropriée. Cette fraction positive indique avec précision la quantité initiale d'acide nucléique matrice.

Il est vrai que ces techniques peuvent être utilisées d'une manière ou d'une autre pour la détection des microbes mais la meilleure technique utilisée jusqu'à maintenant pour l'étude des microbiotes est la métagénomique. C'est une technique qui est coûteuse, laborieuse et nécessite une analyse complexe des données bio-informatiques mais reste la technique qui vise tous les microorganismes (cultivables et non cultivables) dans un environnement spécifique. Elle fournit des informations supplémentaires génétiques sur des biocatalyseurs ou des enzymes potentiellement nouveaux, des liens génomiques entre la fonction et la phylogénie pour les organismes non cultivés, et des profils évolutifs de la fonction et de la structure de la communauté. Elle peut également être complétée par des approches métatranscriptomiques ou métaprotéomiques pour décrire les activités exprimées (91,92). La métagénomique est également un outil puissant pour générer de nouvelles hypothèses sur la fonction microbienne ; les découvertes remarquables de la photo-hétérotrophie à base de protéorhodopsine ou d'Archaea oxydant l'ammoniac en attestent(93,94). À l'avenir, la métagénomique sera utilisée de la même manière que les méthodes d'Amplification de l'ARNr 16S pour décrire les profils des communautés microbiennes. Il deviendra donc un outil standard pour de nombreux laboratoires et scientifiques travaillant dans le domaine de l'écologie microbienne(53).

VI. Conclusion :

Pour conclure, on a étudié les 350 selles reçues du service de néonatalogie par PCR en temps réel, en recherchant et amplifiant les gènes 16s des bactéries qui colonisent le microbiote intestinal chez le nouveau-né âgé de 0 à 6 mois, pour chercher la présence ou l'absence de ces bactéries dans nos échantillons étudiés.

Il est vrai pour ce genre d'étude il est préférable de travailler avec la méthode qui est le plus utiliser de nos jours pour l'étude globale du microbiote visant tous les microorganismes, la metagénomique, mais vue le budget de l'étude et le matériel présent dans le laboratoire, travailler avec la PCR quantitative était la méthode qui nous approche le plus de notre objectif (étudier la majorité des microorganismes présents dans les selles des 50 bébés prématurés). Cette technique a été modelé pour viser tous les phylums des bactéries qui colonisent le microbiote intestinal dès les premières semaines de la vie.

L'étude analytique a été réaliser avec succès, le laboratoire a obtenu les résultats souhaités, ils ont été remis au porteur du projet. Ce dernier qui est le professeur en médecine spécialisé en néonatalogie qui va continuer l'étude au niveau post-analytique.

Cette étude post-analytique peut être réalisée à plusieurs niveaux : études comparatives entre nouveau-nés et prématurés, études des effets d'un traitement antibiotique sur le microbiote intestinal, études thérapeutiques, neurologiques ou autres. Il est également possible pour de futurs projets de mener des études comparatives entre la détection de microorganismes par PCR en temps réel et les méthodes de métagénomique utilisant les mêmes échantillons. Pour une comparaison des deux méthodes, voir si les résultats finaux sont significativement différents.

VII. Bibliographie :

1. Chen, Kevin, and Lior Pachter. "Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities." *PLoS computational biology* 1.2 (2005): e24. [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
2. Gritz EC, Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in pediatrics*. 2015;3:17.
3. Fricke, W. Florian. "The more the merrier? Reduced fecal microbiota diversity in preterm infants treated with antibiotics." *The Journal of Pediatrics* 165.1 (2014): 8-10. [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
4. Berrington: The neonatal bowel microbiome in health... - Google Scholar [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
5. Aagaard: The placenta harbors a unique microbiome [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
6. Lobionda S, Sittipo P, Kwon HY, Lee YK. The role of gut microbiota in intestinal inflammation with respect to diet and extrinsic stressors. *Microorganisms*. 2019;7(8):271.
7. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):313–23.
8. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Apr;11(4):227–38.
9. Cani PD. Metabolism in 2013: The gut microbiota manages host metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Feb;10(2):74–6.
10. Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):121–41.
11. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):451–5.
12. Shahi SK, Zarei K, Guseva NV, Mangalam AK. Microbiota Analysis Using Two-step PCR and Next-generation 16S rRNA Gene Sequencing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019 Oct 15;(152):e59980.
13. Butler MI, Mörkl S, Sandhu KV, Cryan JF, Dinan TG. The Gut Microbiome and Mental Health: What Should We Tell Our Patients?: Le microbiote Intestinal et la Santé Mentale : que Devrions-Nous dire à nos Patients? *Can J Psychiatry*. 2019 Nov 1;64(11):747–60.
14. M4402019.pdf [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/17786/M4402019.pdf>
15. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915–20.

16. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):65–80.
17. Blacher E, Levy M, Tatirovsky E, Elinav E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J Immunol*. 2017 Jan 15;198(2):572–80.
18. Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota | *PLOS ONE* [Internet].
19. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*. 2008 Apr 1;159(3):187–93.
20. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005 Oct;51(4):270–4.
21. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 2013 Mar 19;185(5):385–94.
22. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy | *Pediatrics* | American Academy of Pediatrics [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
23. Full article: The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
24. Abramovici H, Brandes JM, Fuchs K, Timor-Tritsch I. Meconium during delivery: A sign of compensated fetal distress. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1974 Jan 15;118(2):251–5.
25. Méconium — Wikipédia [Internet]. [cited 2022 Jul 14].
26. Gilbert JA, Neufeld JD. Life in a World without Microbes. *PLOS Biology*. 2014 Dec 16;12(12):e1002020.
27. Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, Itoh K. Design of Species-Specific Primers to Identify 13 Species of *Clostridium* Harbored in Human Intestinal Tracts. *Microbiology and Immunology*. 2002;46(5):353–8.
28. Sakaguchi Y, Murata K. Studies on the beta-glucuronidase production of *Clostridia*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1983 Mar;254(1):118–22.
29. Elsdén SR, Hilton MG, Waller JM. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by *Clostridia*. *Arch Microbiol*. 1976 Apr 1;107(3):283–8.
30. Kleessen B, Bunke H, Tovar K, Noack J, Sawatzki G. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr*. 1995 Dec;84(12):1347–56.
31. Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol*. 1984;28(9):975–86.

32. Detection and Quantification of Four Species of the Genus *Clostridium* in Infant Feces - Tonooka - 2005 - Microbiology and Immunology
33. Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DL, Wenzel RP. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis*. 1996 Dec;23(6):1234–9.
34. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses .
35. Wit HCD de, Wit HCDD, Baudière A. Histoire du développement de la biologie. PPUR presses polytechniques; 1992. 664 p.
36. Manga X. La captation de la jeune clientèle en matière de mode : le cas d’H&M et ZARA [Internet] [phdthesis]. Université Paul Verlaine - Metz; 2010 [cited 2022 Jul 4].
37. Linné C von, Turton W. A general system of nature, through the three grand kingdoms of animals, vegetables, and minerals, systematically divided into their several classes, orders, genera, species, and varieties, with their habitations, manners, economy, structure and peculiarities. [Internet]. Printed for Lackington, ALlen, and Co., Temple of the Muses, Finsbury Square ; 1802 [cited 2022 Jul 4].
38. Carl von Linné. In: Wikipédia [Internet]. 2022 [cited 2022 Jul 14].
39. DARWIN C. L’ORIGINE DES ESPECES. Lulu.com; 2004. 342 p.
40. Pierre J. Systématique évolutive et cladistique : approche morphologique, spéciation et génation, application chez les *Acraea* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*. 1992;97(2):105–18.
41. Lire et exploiter un arbre phylogénétique — Site des ressources d’ACCES pour enseigner les Sciences de la Vie et de la Terre [Internet]. [cited 2022 Jul 14].
42. Barthelemy and Luong - Sur la topologie d’un arbre phylogénétique aspec.pdf [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
43. ci011056-with-cover-page-v2.pdf [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
44. Zhang ZQ. A new era in zoological nomenclature and taxonomy: ICZN accepts e-publication and launches. *Zootaxa*. 2012 Sep 4;3450(1):8–8.
45. Director IS, mailto:director.iti@anu.edu.au. International Code of Zoological Nomenclature [Internet]. International Trust for Zoological Nomenclature; 1999 [cited 2022 Jul 4].
46. Postautonomous ego development: A study of its nature and measurement - ProQuest [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
47. Lepage P. Analyses et composition du microbiote intestinal. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 2017 Jul 1;20(3):157–66.
48. Culture bactérienne | AniCura France [Internet]. [cited 2022 Jul 14].

49. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):237–64.
50. Clarridge J. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews.* 2004 Nov 1;17:840–62, table of contents.
51. Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Dec;68(4):669–85.
52. on T history of metagenomics: A incomplete summary was published, on LM. The history of metagenomics: An incomplete summary [Internet]. Meren Lab. [cited 2022 Jul 4].
53. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. 2012;12.
54. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
55. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment | Nature [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
56. Métagénomique sur amplicon ciblé/barcoding/metabarcoding - France Génomique [Internet]. [cited 2022 Jul 14].
57. (Mardis, 2008 ; - Google Scholar [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
58. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell.* 2013 Sep 26;155(1):27–38.
59. Teer JK, Mullikin JC. Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Human Molecular Genetics.* 2010 Oct 15;19(R2):R145–51.
60. Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature.* 1998 Mar;392(6671):71–5.
61. Insertional RNA editing in metazoan mitochondria: The cytochrome b gene in the nematode *Teratocephalus lirellus* | RNA | Cambridge Core [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
62. Principle of the PCR [Internet]. [cited 2022 Jul 14]. Available from: <https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
63. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences | Nature Biotechnology [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
64. Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2000 Oct 1;25(2):169–93.

65. Real-time PCR in virology | Nucleic Acids Research | Oxford Academic [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
66. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses | FEMS Microbiology Ecology | Oxford Academic [Internet].
67. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*. 2010;18(1):190–5.
68. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*. 2015 May 13;17(5):690–703.
69. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS one*. 2014;9(3):e90784.
70. Frontiers | The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review [Internet]. [cited 2022 Jul 4].
71. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*. 2007;5(7):e177.
72. Lu Y, Cai X, Zheng Y, Lyv Q, Wu J. Dominant bacteria and influencing factors of early intestinal colonization in very low birth weight infants: A prospective cohort study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022;36(3):e24290.
73. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2017;81(4):e00036-17.
74. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Chassard C. New Insights in Gut Microbiota Establishment in Healthy Breast Fed Neonates. *PLOS ONE*. 2012 Aug 30;7(8):e44595.
75. Yang YW, Chen MK, Yang BY, Huang XJ, Zhang XR, He LQ, et al. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015 Oct;81(19):6749–56.
76. Harder C, Persson S, Christensen J, Ljubic A, Nielsen E, Hoorfar J. Molecular diagnostics of Salmonella and Campylobacter in human/animal fecal samples remain feasible after long-term sample storage without specific requirements. *AIMS Microbiol*. 2021 Oct 14;7(4):399–414.
77. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria | Applied and Environmental Microbiology [Internet]. [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.70.1.167-173.2004>
78. Albert DR, Todt MA, Davis HF. A low-cost quantitative absorption spectrophotometer. *Journal of Chemical Education*. 2012;89(11):1432–5.

79. Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume protein concentration determination using the NanoDrop 2000c spectrophotometer. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2009;(33):e1610.
80. García-Alegría AM, Anduro-Corona I, Pérez-Martínez CJ, Guadalupe Corella-Madueño MA, Rascón-Durán ML, Astiazaran-García H. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA. *International journal of analytical chemistry*. 2020;2020.
81. What is the Difference Between SYBR Green and Taqman - Pediaa.Com [Internet]. [cited 2022 Jul 5].
82. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014 Feb 28;3:85.
83. qPCR02.pdf [Internet]. [cited 2022 Jul 5]. Available from: <http://www.genomica.uaslp.mx/Databases/qPCR02.pdf>
84. Comprendre_les_resultats_qPCR.pdf [Internet]. [cited 2022 Jul 5]. Available from: https://genomique.irc.ca/resources/files/Comprendre_les_resultats_qPCR.pdf
85. Fjalstad JW, Esaiassen E, Juvet LK, van den Anker JN, Klingenberg C. Antibiotic therapy in neonates and impact on gut microbiota and antibiotic resistance development: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Mar 1;73(3):569–80.
86. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Müller G, et al. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Sep;128(3):646-652.e1-5.
87. Kostic AD, Gevers D, Siljander H, Vatanen T, Hyötyläinen T, Hämäläinen AM, et al. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host Microbe*. 2015 Feb 11;17(2):260–73.
88. Vatanen T, Franzosa EA, Schwager R, Tripathi S, Arthur TD, Vehik K, et al. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):589–94.
89. Galazzo G, van Best N, Bervoets L, Dapaah IO, Savelkoul PH, Hornef MW, et al. Development of the Microbiota and Associations With Birth Mode, Diet, and Atopic Disorders in a Longitudinal Analysis of Stool Samples, Collected From Infancy Through Early Childhood. *Gastroenterology*. 2020 May;158(6):1584–96.
90. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial | *Nature Communications* [Internet]. [cited 2022 Jul 5].
91. Wilmes P, Bond PL. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol*. 2006 Feb;14(2):92–7.

92. Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, Gilna P, et al. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One*. 2008 Aug 22;3(8):e3042.
93. Bèjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, et al. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*. 2000 Sep 15;289(5486):1902–6.
94. Nicol GW, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol*. 2006 May;14(5):207–12.