



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Reçu le :  
4 juillet 2011  
Accepté le :  
11 juillet 2012  
Disponible en ligne  
21 août 2012

# Implantation de la microflore intestinale et régulation de la translocation bactérienne sous l'effet d'un traitement au citrate de caféine chez le raton en période néonatale

Establishment of the intestinal microflora and regulation of bacterial translocation after caffeine citrate treatment during postnatal period in rat

W. Moumen Chentouf<sup>a,\*</sup>, A. Tir Touil Meddah<sup>a</sup>, A. Léké<sup>b</sup>, C. Mullié<sup>c</sup>,  
G. Krim<sup>b</sup>, J.-P. Canarelli<sup>b</sup>, B. Meddah<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de bioconversion, génie microbiologique et sécurité sanitaire, université de Mascara, Mascara, 29000 Algérie

<sup>b</sup> Service de chirurgie et de réanimation pédiatrique, centre hospitalier universitaire d'Amiens, Amiens, France

<sup>c</sup> Facultés de médecine et de pharmacie, université de Picardie Jules-Verne, Amiens, France

Disponible en ligne sur

**SciVerse ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

## Summary

To relieve respiratory problems such as apnea in newborns, caffeine citrate is the drug of choice because of its good tolerance and therapeutic index. However, its impact on the intestinal microbial ecosystem and on bacterial translocation in the neonatal period remains insufficiently investigated. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of caffeine citrate on the establishment of the intestinal microflora and bacterial translocation in rats from birth to the 30th day of life. Newborn Wistar rats were divided into four groups of 14 animals, each subdivided into a control group receiving a placebo (12 mL tap water/kg/day) and another treated with caffeine citrate (12 mg/kg/day). The animals were nursed by their mothers and weighed daily. A group of 14 rats was killed at birth and after 10, 20, or 30 days of life. Organs in which translocation was assessed (liver, lungs, spleen, and kidneys) and various fragments of intestine (duodenum, jejunum, ileum, and colon) were surgically removed. The bacteriological analysis performed involved enumeration of the total microflora, staphylococci, enterobacteria, and lactobacilli. From the 10th day, caffeine was shown to significantly decrease the weight of treated animals as compared with controls ( $P < 0.05$ ). However, caffeine treatment did not drastically alter the kinetics of establishment of the intestinal microflora as only enterobacteria were found to be significantly

## Résumé

Le citrate de caféine est, par son pouvoir stimulant et son bon index thérapeutique, le traitement de choix des troubles respiratoires du nouveau-né. Son effet sur l'implantation de l'écosystème microbien intestinal en période néonatale et les conséquences sur la translocation bactérienne chez le nouveau-né restent peu explorés. L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets du citrate de caféine sur ces phénomènes chez des ratons nouveau-nés. Quatre groupes de ratons ont été formés pour un suivi cinétique de croissance de l'animal à la naissance, 10 j, 20 j et 30 j de vie. Chaque groupe a été subdivisé en un lot témoin recevant par gavage un placebo et un lot recevant du citrate de caféine. Les animaux étaient allaités par leur mère et pesés quotidiennement. À la fin de la période de suivi, ils ont été sacrifiés et les organes de translocation (foie, poumons, rate et reins) ainsi que différents fragments d'intestins (duodénum, jéjunum, iléon et côlon) ont été prélevés. Une analyse de la microflore totale, des staphylocoques, entérobactéries et lactobacilles a été effectuée. À partir du 10<sup>e</sup> j, le citrate de caféine diminuait significativement le poids des animaux mais le traitement ne semblait guère modifier la cinétique de l'implantation de la microflore intestinale. Seul le taux des entérobactéries diminuait faiblement dans le groupe traité. Par ailleurs, l'effet répressur du citrate de caféine sur la translocation bactérienne des bactéries à

\* Auteur correspondant.  
e-mail : moumenw@yahoo.fr

lower in any intestinal segment of the treated group ( $P < 0.05$ ). Moreover, from the 20th day of life, caffeine citrate significantly downregulated bacterial translocation of both Gram-positive and -negative bacteria ( $P < 0.05$ ). This preliminary study on the effects of treatment with caffeine citrate may open opportunities in clinical pediatrics; the treatment will remain partially effective in preventing bacterial translocation in the neonatal period.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Des signes cliniques et des troubles respiratoires tels que l'apnée existent chez le nouveau-né au cours de sa croissance et de son évolution, encore plus fréquemment chez le prématuré du fait de l'immaturité des structures centrales de l'activité respiratoire [1]. Une analyse attentive de la situation est alors nécessaire pour proposer des traitements efficaces. Ces derniers consistent à stimuler l'enfant, à lui fournir des substances nutritionnelles manquantes (calcium, glucose ...) ou des traitements adaptés (antibiotiques) ou à administrer des substances chimiques, comme la caféine, qui stimulent les centres respiratoires afin de limiter la survenue des apnées [2]. Actuellement, le citrate de caféine est le traitement le mieux adapté de ce genre de malaise du prématuré car il offre une bonne tolérance et possède un index thérapeutique satisfaisant [3]. Les recommandations actuelles d'apport maximal de citrate de caféine sont de 12 mg/kg/j [4]. Cependant, les conséquences de la consommation prolongée de citrate de caféine sur l'implantation de la microflore intestinale et sur la translocation des bactéries intestinales vers les organes internes à une période de la vie aussi fragile restent inexplorées à ce jour. L'objectif de ce travail était d'étudier et d'évaluer les effets du citrate de caféine sur ces phénomènes en période néonatale. L'étude de l'impact de cette substance thérapeutique in situ, chez l'enfant nouveau-né, étant impossible, cette étude a été réalisée sur un modèle animal, le rat, animal monogastrique dont la physiologie est proche de celle de l'homme.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel biologique

Des rats Wistar adultes, de sexes opposés, dont le poids était compris entre 175 et 185 g, ont été accouplés. Cinquante-six rats nouveau-nés ont été répartis en quatre groupes étudiés à la naissance ( $S_1$ ), à 10 j ( $S_2$ ), à 20 j ( $S_3$ ) et à 30 j de vie ( $S_4$ ). Dans chaque groupe, un sous-groupe d'animaux témoins (T) ( $n = 7$ ) a reçu par gavage un placebo constitué de 12 mL/kg/j d'eau de robinet et l'autre une dose thérapeutique de citrate de caféine (C) ( $n = 7$ ) (Sigma, France) à raison de 12 mg/kg/j dans les mêmes conditions. Le comité régional d'éthique des

Gram positif et négatif devenait significatif à partir de 20 j de vie. Cette étude préliminaire sur les effets du traitement au citrate de caféine pourrait ouvrir des perspectives en clinique infantile, le traitement restant en partie efficace dans la prévention des translocations bactériennes en période néonatale.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

animaux a approuvé le protocole expérimental selon les directives de communauté européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

### 2.2. Méthodes

L'étude a porté sur la dynamique de croissance de la naissance  $T_0$  au 30<sup>e</sup> j de vie ( $T_{30}$ ). Les animaux étaient allaités par leur mère durant l'expérimentation et pesés quotidiennement jusqu'au sacrifice effectué à  $T_0$ ,  $T_{10}$ ,  $T_{20}$  ou  $T_{30}$ , dans des conditions aseptiques, sous anesthésie générale par chloroforme. Après laparotomie, les organes de translocation (foie, poumon, rate et reins) ainsi que différents fragments d'intestins de 2 à 3 cm de longueur (duodénum, jéjunum, iléon et côlon) ont été prélevés pour analyse bactériologique. Après broyage et dilution appropriée pour chaque organe dans du Ringer cystéiné dilué au quart, il était procédé à un ensemencement de 100  $\mu$ L sur les milieux suivants : Columbia non sélectif pour la détection de la flore totale, Hektoen ou agar glucosé à la bile (BGA) pour l'énumération des entérobactéries, Chapman pour les staphylocoques à coagulase négative et Man Rogosa et Sharpe (MRS) pour les lactobacilles [5].

Les boîtes d'ensemencement étaient par la suite incubées à 37 °C pendant 24 à 48 h. Le dénombrement des bactéries était effectué en comptant le nombre total de colonies présentes sur la gélose, correspondant au nombre d'unités formant colonie (UFC), et en le rapportant par gramme d'échantillon en tenant compte du facteur de la dilution opérée. Pour une meilleure interprétation, les résultats ont été exprimés en logarithmes (Log UFC/g). Les boîtes dont le nombre était compris entre 100 et 300 ont été retenues pour dénombrement et identification [6]. Enfin, pour confirmer la pureté et l'identité des bactéries recherchées, des examens macroscopiques et microscopiques (coloration de Gram) ainsi que des tests biochimiques d'orientation et d'identification de la bactériologie conventionnelle en utilisant des galeries Api-système 20E® (Biomérieux) ont été effectués [7].

### 2.3. Analyse statistique

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ( $\bar{x}$ )  $\pm$  écart-type (sem). Le test de Student non apparié a été effectué pour

comparer les résultats de chaque sous-groupes d'animaux (T) et (C). Le test de Fisher a été utilisé pour comparer les fréquences de portage des bactéries (exprimées en %) entre les deux sous-groupes. Les résultats ont été considérés comme significatifs pour  $p \leq 0,05$ .

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Évolution du poids corporel des rats

La croissance pondérale des rats a été régulière. Néanmoins, une perte significative de poids à partir de 10 j de vie a été notée chez le sous-groupe traité au citrate de caféine par rapport au groupe témoin ( $p < 0,05$ ). Cette différence de perte pondérale s'est accentuée et est devenue hautement significative au 30<sup>e</sup> j de vie ( $p < 0,01$ ) (fig. 1). Le traitement par citrate de caféine semble donc engendrer un ralentissement temporaire du gain pondéral chez les rats nouveau-nés [8,9]. Le métabolisme des lipides pourrait être à l'origine de cette diminution du poids. En effet, les méthylxanthines, dont la caféine fait partie, agissent soit directement sur les tissus adipeux, soit indirectement en stimulant la sécrétion d'adrénaline. Cette hormone agit sur les cellules adipeuses comme antagoniste des récepteurs de l'adénosine, faisant augmenter la concentration cellulaire en adénosine-monophosphate (AMP) cyclique, ce qui active les lipases responsables de la lipolyse [10]. De plus, la caféine engendre un état de satiété avec manque d'appétit, ce qui pourrait contribuer au ralentissement de la prise de poids des animaux.

#### 3.2. Évolution de l'implantation de la flore intestinale

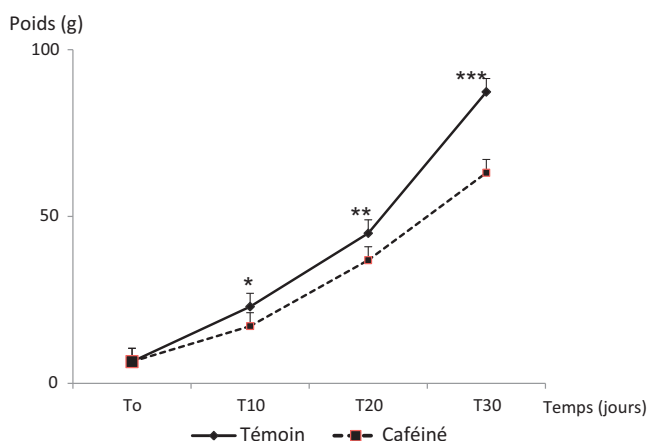
L'étude de l'implantation de la flore intestinale chez des rats ayant subi ou non un traitement par citrate de caféine a montré qu'à la naissance les taux de bactéries au niveau des

différents segments d'intestins étaient pratiquement nuls (fig. 2). Ces résultats correspondent aux données de la littérature qui confirme que le tractus intestinal est axénique à la naissance. L'implantation microbienne dans le tube digestif d'un nouveau-né est principalement fonction du mode d'accouchement et de facteurs environnementaux [11].

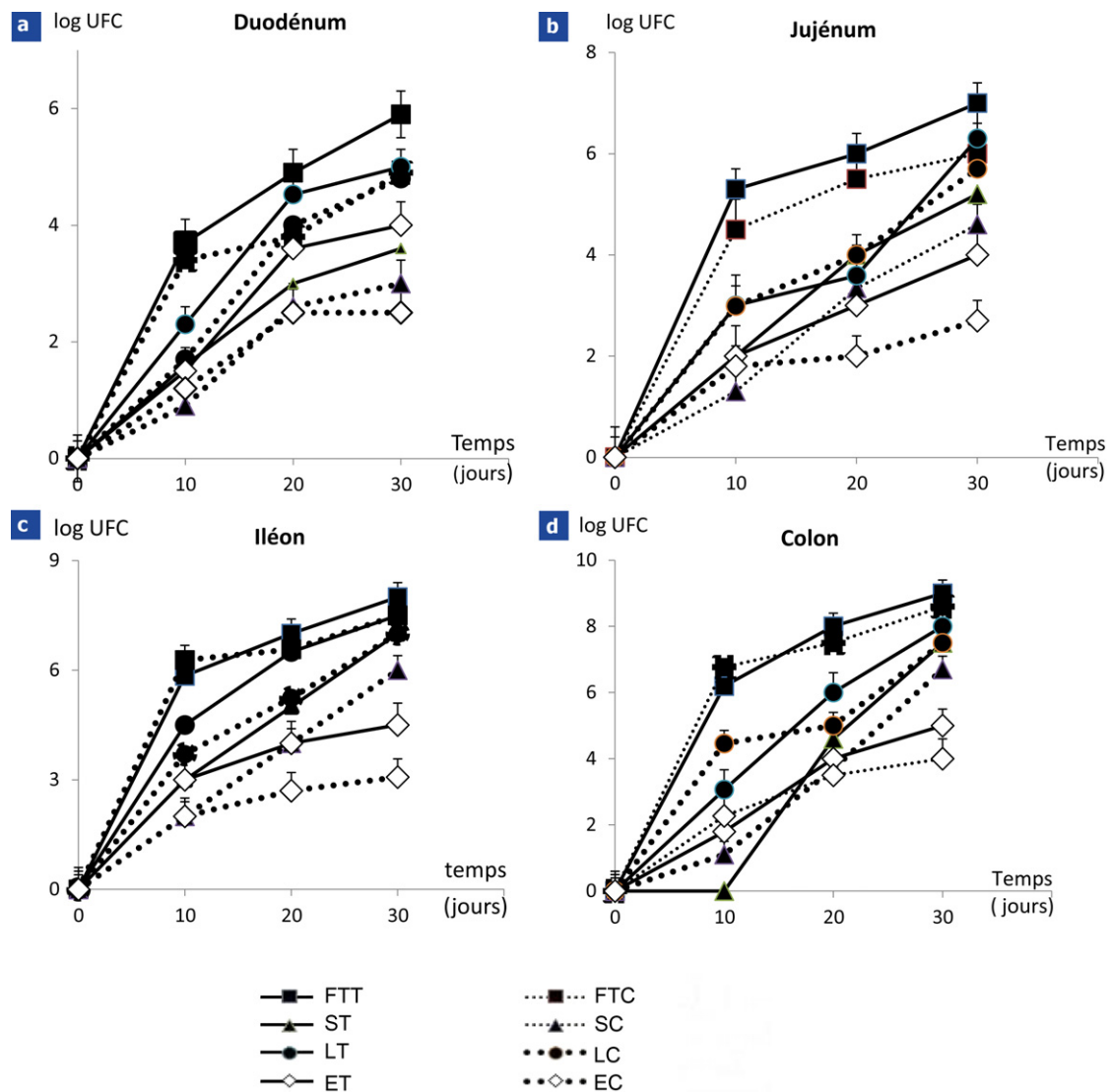
À 10 j de vie, l'implantation de la flore intestinale est effective et celle-ci commence à se diversifier en fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les rats. Dans notre expérimentation, la flore totale était significativement élevée, avec des taux compris entre 5 et 7 Log UFC/g pour les deux sous-groupes d'animaux (T) et (C), et cela dans l'ensemble des segments intestinaux (fig. 2). L'absence presque totale des staphylocoques et d'entérobactéries était également notable dans les deux sous-groupes, quel que soit le segment d'intestin considéré. En revanche, les taux de lactobacilles étaient plus élevés mais de manière non significative dans les différents segments intestinaux des deux sous-groupes, en particulier dans le côlon où le taux et la fréquence des lactobacilles étaient élevés (fig. 2). Il semblerait donc qu'à ce stade le traitement par citrate de caféine n'ait aucun effet sur l'implantation microbienne.

Après 20 j de vie, le taux des bactéries au niveau intestinal tend à rejoindre celui constaté chez l'adulte. Cela s'est confirmé dans notre étude par l'augmentation de la flore totale dans les deux sous-groupes d'animaux (fig. 2). La flore de transition, tels les staphylocoques, est apparue en particulier dans le sous-groupe sous caféine au niveau du duodénum, du jéjunum et l'iléon dans lesquels les taux étaient significativement plus élevés que chez les rats témoins ( $p < 0,05$ ). En revanche, au niveau du côlon, les staphylocoques étaient présents en nombre équivalents dans les deux sous-groupes (fig. 2). Cette alternance d'apparition et de disparition des staphylocoques dans certains fragments d'intestins est un phénomène naturel, puisque ces bactéries font partie de la flore transitoire et de passage qui est présente dans les premiers jours de vie et disparaît avec la maturité de l'hôte [11,12]. Cependant, les lactobacilles, qui représentent à cette période la population la plus importante des aérobies facultatifs [13] n'ont pas vu leur taux modifié par le citrate de caféine, les valeurs étant comprises entre 2,5 et 6 log UFC/g avec des profils de répartition identiques dans les différents segments intestinaux et dans les deux sous-groupes de rats (fig. 2). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui confirme que les microorganismes majoritaires chez les rats appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* [11]. À cette période, le taux des entérobactéries était faible au niveau de tous les compartiments de l'intestin et chez les deux groupes d'animaux.

Au 30<sup>e</sup> j de vie, les animaux étaient matures, l'implantation microbienne est achevée, le système immunitaire est fonctionnel et l'imperméabilité de la barrière intestinale est accrue [12]. Ainsi, la flore totale était remarquablement présente



**Figure 1.** Évolution pondérale de la naissance au 30<sup>e</sup> j de vie chez les rats témoins (T) et traités par caféine (C) ; \* $p < 0,05$  T vs C ; \*\* $p < 0,05$  T vs C ; \*\*\* $p < 0,01$  T vs C.



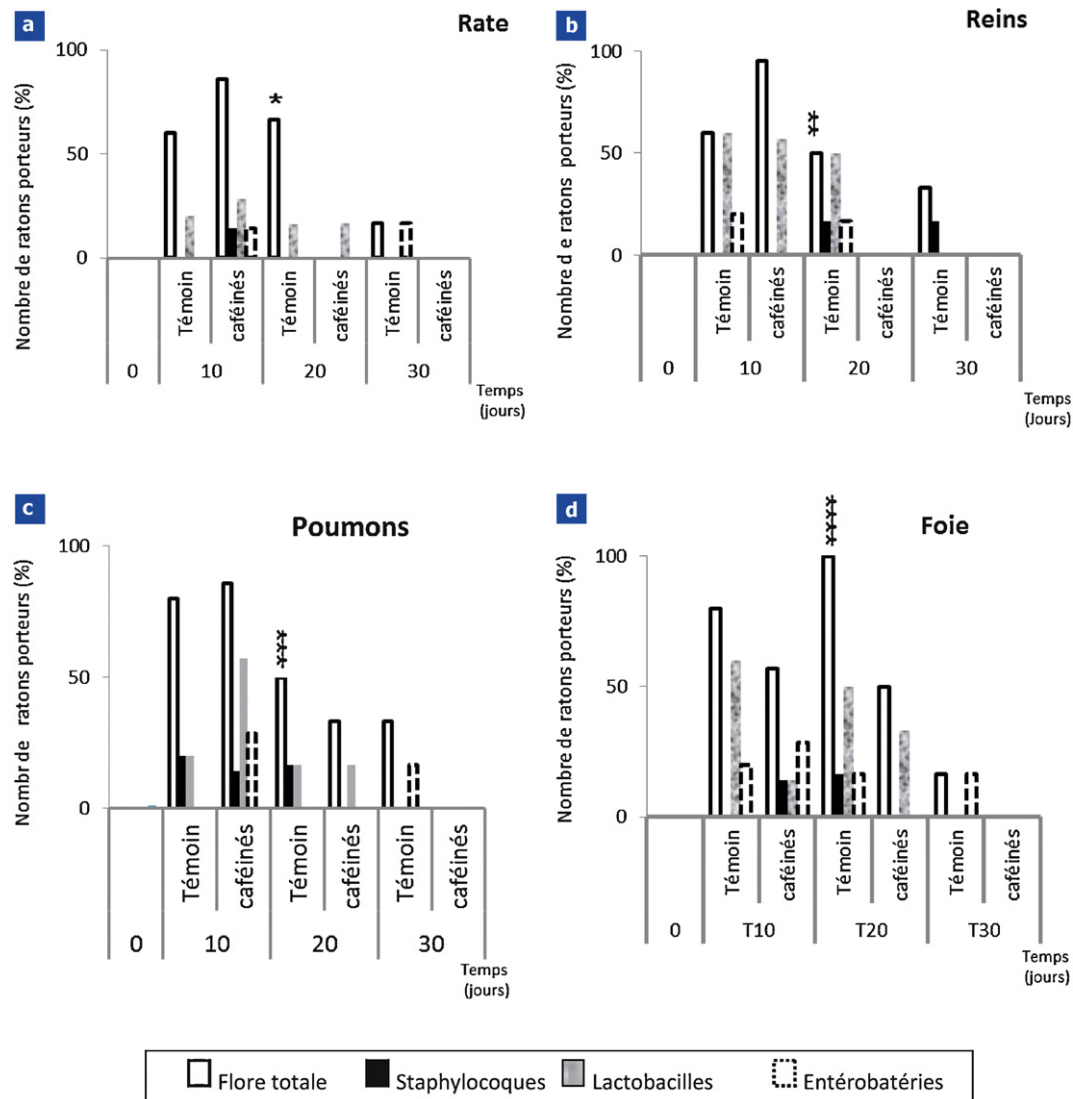
**Figure 2.** Évolution de l'implantation de la flore intestinale de la naissance au 30<sup>e</sup> j de vie chez les rats témoins et sous caféine ; **a** : duodénum ; **b** : jéjunum ; **c** : l'iléon ; **d** : colon ; FTT : flore totale témoin ; FTC : flore totale caféinée ; ST : staphylocoques témoins ; SC : staphylocoques caféinés ; LT : lactobacilles témoins ; LC : lactobacilles caféinés ; ET : entérobactéries témoins ; EC : entérobactéries caféinés.

dans tous les segments à des taux semblables dans les deux sous-groupes ; les staphylocoques et les lactobacilles étaient présents uniquement dans le c?lon où le transit est plus lent. À la lumière de ces résultats préliminaires, le traitement par caféine ne semble pas avoir perturbé la cinétique de l'implantation ainsi que l'établissement de la microflore intestinale des rats à l'exception des entérobactéries qui ont été manifestement réprimées.

### 3.3. Translocation bactérienne

L'analyse de la translocation bactérienne dans les deux sous-groupes a montré qu'à la naissance, aucune translocation n'était observée (fig. 3). À 10 j de vie, la translocation bactérienne était présente dans les quatre organes analysés

(poumon, foie, reins et rate) et persistait dans les deux sous-groupes d'animaux (fig. 3). À 20 j de vie, une baisse significative de la flore totale a été constatée dans le sous-groupe sous caféine dans les organes testés pour la translocation bactérienne ( $p < 0,05$ ), notamment une absence totale de bactéries au niveau de la rate (0 % vs 66,6 %) et des reins (0 % vs 50 %) (fig. 3). À cette période, la translocation bactérienne semble avoir été influencée et régulée par le citrate de caféine. Enfin, au 30<sup>e</sup> j de vie, les différentes flores analysées étaient manifestement absentes des organes testés pour la translocation bactérienne, notamment dans le sous-groupe traité par citrate de caféine (fig. 3). Par ailleurs, les organes internes (poumons, foie et rate) du groupe témoin étaient contaminés à taux faibles par la flore totale et les entérobactéries alors qu'une



**Figure 3.** Fréquence de contamination des organes de translocation de la naissance au 30<sup>e</sup> jour de vie chez les rats témoins (T) et traités par caféine (C) ; **a** : rate ; **b** : reins ; **c** : poumons ; **d** : foie ; \* $p < 0,05$  T vs C (rate) ; \*\* $p < 0,05$  T vs C (reins) ; \*\*\* $p < 0,05$  T vs C (poumons) ; \*\*\*\* $p < 0,05$  T vs C (foie).

translocation vers le rein n'a été objectivée que pour la flore totale et les staphylocoques, sans qu'une différence significative avec le sous-groupe traité par la caféine dans les fréquences de contamination ne soit mise en évidence. Ces résultats montrent que la diminution de translocation de la flore intestinale est un phénomène naturel au cours de la croissance de l'animal, lié au développement de l'imperméabilité de la barrière intestinale et à la maturation du système immunitaire [14]. Cependant, l'absence totale de translocation dans le sous-groupe traité par caféine à 20 j de vie ne fait que confirmer l'hypothèse que ce traitement accélère la maturation intestinale à cette période de la vie. Des études biochimiques réalisées sur le mucus intestinal chez les mêmes rats ont montré une accélération de la maturation reflétée par une fucosylation des mucines plus

précoce accompagnée par une activité de la phosphatase alcaline intestinale plus intense [15].

## 4. Conclusion

Le microbiote intestinal exerce des fonctions essentielles pour la santé de l'hôte, toute rupture de l'équilibre micro-écologique de cette microflore par des facteurs exogènes ou endogènes, pouvant engendrer des anomalies dans la physiologie et le métabolisme (infection intestinale grave, maladies inflammatoires chroniques). Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'innocuité de la caféine chez le rat, l'absence d'effets sur l'installation du microbiote intestinal, un bénéfice de ce traitement sur la maturation de la barrière



intestinale essentielle au contrôle des antigènes alimentaires et bactériens dont les conséquences peuvent être lourdes chez le nouveau-né, surtout prématuré. Cette étude préliminaire sur les effets du traitement au citrate de caféine pourrait ouvrir des perspectives en clinique infantile.

## Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## Références

- [1] Barrington K, Finer N. The natural history of the appearance of apnea of prematurity. *Pediatr Res* 1991;29:372–5.
- [2] Baird TM. Clinical correlates. natural history outcome of neonatal apnea. *Semin Neonatal* 2004;9:205–11.
- [3] Moriette G, Lescure S, El Ayoubi M, et al. Apnées du prématuré : données récentes. *Arch Pédiatr* 2010;17:186–90.
- [4] Cherif A, Klouz A, Zouari B, et al. Caféine monohydratée : quelle posologie efficace dans le traitement des apnées du prématuré ? *Arch Pédiatr* 2003;10:734–5.
- [5] Merck. Manuel de Microbiologie. Darmstadt: E. Merck; 1986.
- [6] Fauchère JL. Techniques en bactériologie clinique. Paris: Ellipses Edition Marketing S.A.; 1997.
- [7] Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Bactériologie clinique. Paris: Ellipses Edition Marketing F S.A.; 2000.
- [8] Bauer J, Maier K, Hellstern G, et al. Effect of caffeine on oxygen consumption and metabolic rate in very low birth weight infants with idiopathic apnea. *Pediatrics* 2001;107:660–3.
- [9] Schmidt B. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *N Engl J Med* 2006;354:2112–21.
- [10] Thong FS, Graham TE. Caffeine-induced impairment of glucose tolerance is abolished by beta-adrenergic receptor blockade in humans. *J Appl Physiol* 2002;92(Suppl. 6):2347–52.
- [11] Ducluzeau R. Installation, équilibre de la flore microbienne chez le nouveau-né. *Ann Pédiatr* 1993;40:13–22.
- [12] Raibaud P, Ducluzeau R, Dubos F, et al. Implantation of bacteria from the digestive tract of man and various animals into gnotobiotic mice. *Am J Clin Nutr* 1980;33(Suppl. 11):2440–7.
- [13] Westerbeek EA, Van den BA, Lefeber HN, et al. The intestinal bacterial colonization in preterm infants: A review of the literature. *Clin Nutr* 2006;25:361–8.
- [14] Berg RD. Bacterial translocate from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992;23:217–44.
- [15] Tir touil A, Leke A, Romond MB, et al. Effect of mesenteric ischemia on ileal colonization, intestinal integrity and bacterial translocation in newborn piglets. *Pediatr Surg Int* 2001;17(Suppl. 7):515–20.