

**UNIVERSITÉ DE LILLE**  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

**THÈSE DE DOCTORAT**

Présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Discipline : Bactériologie

Par *Rémi LE GUERN*

***Colonisation digestive par entérobactéries productrices  
de carbapénémase dans un modèle murin : aggravation  
de la pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa*.***

Soutenue publiquement le 03/12/2019 devant le jury composé de :

**Pr Éric KIPNIS**

**Pr Geneviève HÉRY-ARNAUD**

**Pr Jean-Christophe LUCET**

**Pr Benoit FOLIGNÉ**

**Dr Rozenn LE BERRE**

**Dr Rodrigue DESSEIN**

**Président du jury**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Examineur**

**Directeur de thèse**

Recherche translationnelle : relations hôte-pathogènes, F-59000 Lille, France  
EA 7366, Univ. Lille, CHU Lille

## Remerciements

Je remercie le Professeur **Geneviève Héry-Arnaud** ainsi que le Professeur **Jean-Christophe Lucet** de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie le Professeur **Benoit Foligné** et le Docteur **Rozenn Le Berre** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de prendre part au jury.

Je remercie le Professeur **Éric Kipnis** de m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que le Docteur **Rodrigue Dessein** d'avoir encadré et dirigé cette thèse.

Je remercie l'ensemble du laboratoire de l'**EA 7366**, Teddy Grandjean, Marvin Bauduin, Perrine Bortolotti, Emmanuel Faure ainsi que le Professeur Karine Faure pour leur soutien et l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je remercie également l'**équipe 12 du CIIL**, en particulier le Docteur Philippe Gosset pour son aide pour la partie immunologique et en cytométrie en flux.

Merci au Docteur Martin Figeac et à Shéhérazade Sebda **du plateau de Génomique fonctionnelle et structurale (Université de Lille)** pour leur expertise en métagénomique.

Merci au **laboratoire de Toxicologie (CHU de Lille)** pour leur expertise en métabolomique, notamment le Docteur Marie Lenski, le Docteur Benjamin Hennart, et le Professeur Delphine Allorge.

Merci à l'ensemble du **laboratoire de Bactériologie (CHU de Lille)**, notamment les Docteurs Frédéric Wallet, Caroline Loïez et Marie Titécat.

Merci au Professeur **Benoit Guéry** et au Docteur **Bruno Grandbastien** pour leurs remarques et leurs idées au moment de l'initiation de ce travail.

Merci aux membres du comité de suivi de thèse, le Professeur **Jean-Philippe Lavigne** et le Professeur **Philippe Berthelot**, pour leurs conseils au long de ce travail.

Enfin, merci à ma famille et à mes amis.

## Résumé

L'altération du microbiote digestif provoquée par une antibiothérapie augmente le risque de colonisation par des bactéries multirésistantes. Dans un modèle murin, nous avons étudié l'impact d'une colonisation digestive par entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) sur la sévérité d'une pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa*. Les souris colonisées par EPC présentaient une pneumopathie plus sévère (score clinique et perméabilité alvéolo-capillaire), ainsi qu'une mortalité plus élevée par rapport aux groupes contrôles ou ayant simplement reçu une injection de clindamycine. Une transplantation de microbiote fécal restaurait le pronostic. Les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4 étaient diminués au niveau pulmonaire dans le groupe colonisé par EPC. Au niveau du microbiote digestif, on observait une quasi-extinction des *Muribaculaceae* associée à une expansion du genre *Hungatella* chez les souris colonisées par EPC. Certains métabolites du tryptophane potentiellement impliqués dans la réponse immunitaire étaient modifiés dans le groupe colonisé par EPC. Une colonisation digestive asymptomatique peut ainsi entraîner des effets délétères sur la réponse de l'hôte.

Mots clés : *Muribaculum*, *Muribaculaceae*, S24-7, *Hungatella*, métagénomique, métabolomique, tryptophane, sérotonine, clindamycine, *Klebsiella pneumoniae* NDM-1

## Abstract

Antibiotics disrupt the gut microbiota, and are considered a risk factor of colonization by multidrug-resistant bacteria. In a murine model, we studied the impact of digestive colonization with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) on the severity of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Mice colonized by CPE presented a more severe pneumonia (clinical score and alveolocapillary permeability) and a higher mortality compared to controls or mice that received only clindamycin. Fecal microbiota transplant was associated with better outcomes. After infection by *P. aeruginosa*, lung dendritic cells and CD4 T lymphocytes were decreased in mice colonized by CPE. Gut microbiota was specifically altered in mice colonized by CPE: *Muribaculaceae* relative abundance was greatly reduced, associated with an expansion of the *Hungatella* genus. Tryptophan metabolites were modified by CPE colonization. Asymptomatic digestive colonization with CPE had a detrimental effect on the host response to *P. aeruginosa* pneumonia.

Keywords: *Muribaculum*, *Muribaculaceae*, S24-7, *Hungatella*, metagenomic, metabolomic, tryptophan, serotonin, clindamycin, *Klebsiella pneumoniae* NDM-1

## Table des matières

<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2. Revue de la littérature</b>	<b>2</b>
2.1. Microbiote digestif	2
2.1.1. Fonction et diversité	2
2.1.2. Techniques d'étude du microbiote	9
2.1.3. Effet d'une antibiothérapie	23
2.1.4. Résilience du microbiote	26
2.2. Acteurs de la réponse immunitaire	31
2.2.1. Cellules épithéliales	31
2.2.2. Cellules de l'immunité innée	33
2.2.3. Lymphocytes B	36
2.2.4. Lymphocytes T	38
2.2.5. Métabolites digestifs	43
2.2.6. Ligands bactériens	50
2.3. Axe Intestin Poumon	52
2.3.1. Interactions entre intestin et poumons	52
2.3.2. Infection pulmonaire et microbiote digestif	54
2.3.3. Microbiote pulmonaire	55
2.4. Colonisation digestive par des bactéries résistantes aux antibiotiques	58
2.4.1. Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC)	58
2.4.2. Modèles animaux de colonisation	60
2.4.3. Colonisation par des bactéries multi-résistantes chez l'Homme	64
2.5. Stratégies de restauration du microbiote digestif	67
2.5.1. Probiotiques	67
2.5.2. Transplantation de Microbiote Fécal (FMT)	69
2.5.3. Transplantation de filtrats stériles de microbiote fécal	72
2.6. Objectifs de la thèse	73
<b>3. Matériel et Méthodes</b>	<b>74</b>
3.1. Souches bactériennes et animaux	74
3.1.1. Souches bactériennes	74
3.1.2. Modèle murin	75
3.2. Procédures	76
3.2.1. Colonisation digestive	76
3.2.2. Infection pulmonaire et sacrifice	79
3.2.3. Colite au DSS	80
3.3. Méthodes d'analyse	81
3.3.1. Bactériologie	81
3.3.2. Perméabilité pulmonaire	81
3.3.3. Cytométrie en flux	81
3.3.4. Métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S	83
3.3.5. Mise au point d'une qPCR <i>Muribaculaceae</i>	84

3.3.6.	Métabolomique	85
3.3.7.	Métabolites du tryptophane	87
3.3.8.	Inférence fonctionnelle à partir de métagénomique ciblée	88
3.3.9.	Analyse statistique	89
<b>4.</b>	<b>Résultats</b>	<b>90</b>
4.1.	Caractérisation des souches cliniques d'EPC utilisées	90
4.1.1.	Souche KPL0.1	91
4.1.2.	Souche KPL0.2	94
4.2.	Modèle murin de colonisation à EPC	98
4.2.1.	Résistance à la colonisation par EPC liée au microbiote digestif	99
4.2.2.	Localisation de la colonisation à EPC le long du tube digestif	101
4.2.3.	Altération du microbiote digestif associée à l'antibiothérapie et à la colonisation par EPC	103
4.2.4.	Existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC encadrant l'administration de clindamycine	106
4.2.5.	Vérification de l'absence d'effet délétère d'une colonisation par EPC	110
4.3.	Impact de la colonisation à EPC sur la pneumopathie à <i>P. aeruginosa</i>	116
4.3.1.	Impact de la colonisation à EPC sur la sévérité de la pneumopathie	116
4.3.2.	Effet de la transplantation de microbiote fécal	120
4.3.3.	Effet de la transplantation de filtrats stériles de selles	128
4.3.4.	Analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires pulmonaires et spléniques	131
4.3.5.	Analyse métagénomique de la composition du microbiote digestif	139
4.3.6.	Analyse métabolomique	169
4.3.7.	Métabolites du tryptophane	176
4.3.8.	Inférence fonctionnelle à partir de métagénomique ciblée	183
<b>5.</b>	<b>Discussion et perspectives</b>	<b>188</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>198</b>
<b>7.</b>	<b>Annexes</b>	<b>226</b>
7.1.	Annexe 1 : Analyse réalisée avec Qiime 2, phyloseq et PICRUSt2	226
7.1.1.	Analyse avec Qiime 2	226
7.1.2.	Analyse avec le package phyloseq de R	230
7.1.3.	Analyse avec PICRUSt2	232
7.2.	Annexe 2 : Dépôt des séquences sur SRA	233
7.3.	Annexe 3 : Article Microbiology Resource Announcements	234
7.4.	Annexe 4 : Article Antimicrobial Agents Chemotherapy	238

## Table des abréviations

AhR	: récepteur aux hydrocarbures aromatiques
AM	: macrophages alvéolaires
ANCOM	: <i>analysis of composition of microbiomes</i> (méthode statistique)
ASV	: <i>amplicon sequence variant</i>
ATCA	: acide trichloracétique
BLSE	: $\beta$ -lactamase à spectre étendu
CNR	: centre national de référence
cDC1 ou 2	: cellules dendritiques conventionnelles de type 1 ou 2
Cq	: <i>cycle quantification</i>
dNTP	: désoxyribonucléotide
DSS	: dextran sodium sulfate
EPC	: entérobactéries productrices de carbapénémase
ERG	: <i>Enterococcus faecium</i> résistant aux glycopeptides
GF	: <i>germ free</i>
IDO-1	: indolamine 2,3-dioxygénase-1
IFN	: interféron
IL	: interleukine
ILC	: cellules lymphoïdes de l'immunité innée
IV	: intraveineuse
FITC	: isothiocyanate de fluorescéine
FMT	: transplantation de microbiote fécal
LBA	: liquide broncho-alvéolaire
NK	: lymphocytes <i>natural killer</i>
NKT	: lymphocytes <i>natural killer T</i>
NLR	: NOD-like récepteurs
OTU	: <i>operational taxonomic unit</i>
PAMP	: motifs moléculaires associés aux pathogènes
PRR	: récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PSA	: polysaccharide A
QC	: contrôle de qualité
SCFA	: acides gras à courtes chaînes
SFB	: <i>segmented filamentous bacteria</i>
SPF	: <i>specific pathogen free</i>
ST	: <i>sequence type</i>
SVF	: sérum de veau fœtal
TLR	: Toll-like récepteurs
TNBS	: acide sulfonique trinitrobenzoïque
TpH	: tryptophane hydroxylase
Treg	: lymphocytes T régulateurs

# 1. Introduction

Le microbiote digestif est un ensemble complexe de micro-organismes. A l'état de base, il confère une résistance à la colonisation par des bactéries entéro-pathogènes (1) ou multi-résistantes aux antibiotiques (2). L'administration d'antibiotiques modifie la composition du microbiote intestinal, et représente un facteur de risque de colonisation par des bactéries résistantes aux antibiotiques, telles que les Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC). La prescription de beta-lactamines présentant une forte activité anti-anaérobie est un facteur de risque de colonisation par EPC (3). Il existe une résilience du microbiote après antibiothérapie, avec une tendance vers un retour à l'état de base (4). Le délai entre l'administration d'antibiotique et l'exposition à l'EPC semble donc être un facteur important pour expliquer la survenue d'une colonisation. Cependant, ce délai est difficile à étudier précisément dans les études épidémiologiques chez l'Homme, la date d'exposition à l'EPC étant habituellement imprécise.

Le microbiote joue également un rôle dans la réponse immunitaire : localement en supportant l'immunité muqueuse, mais aussi à distance en modulant l'immunité systémique (5). Le microbiote digestif semble jouer un rôle dans la réponse de l'hôte suite à une pneumopathie. Une antibiothérapie préalable aggravait la pneumopathie à *Streptococcus pneumoniae*, mais une transplantation de microbiote fécal améliorait le pronostic (6). Par ailleurs, la présence de certains taxons bactériens comme les SFB (Segmented Filamentous Bacteria) au niveau digestif a été associée à un bon pronostic chez des souris ayant subi une instillation intra-nasale de *Staphylococcus aureus* (7).

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de : (i) mettre au point un modèle murin de colonisation digestive par EPC, (ii) déterminer l'existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC encadrant l'administration d'antibiotiques, (iii) évaluer la réponse de l'hôte suite à une infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* en cas de colonisation digestive par EPC.

## 2. Revue de la littérature

### 2.1. Microbiote digestif

#### 2.1.1. Fonction et diversité

##### Chez l'homme

Le microbiote digestif humain est composé de bactéries, champignons et virus. Le développement de techniques de métagénomique ciblées sur l'ADNr 16S a permis de mieux décrire le microbiote bactérien humain. En effet, un grand nombre d'espèces sont non cultivables ou difficilement cultivables.

La composition du microbiote varie le long du tube digestif. Dans l'estomac, la concentration en bactéries est très faible, de l'ordre de  $10^3$  UFC/mL de liquide gastrique, pour un volume de 250 mL (8). En effet, l'acidité gastrique (pH = 1,5) inhibe la croissance de la plupart des espèces bactériennes. Cependant, certaines bactéries peuvent résister dans un milieu acide, comme *Helicobacter pylori* qui est responsable de gastrites chroniques. La plupart des autres bactéries mises en évidence par des techniques de séquençage nouvelle génération appartiennent à la sphère oropharyngée : *Bacteroidetes* (*Porphyromonas*, *Prevotella*), *Firmicutes* (*Streptococcus*), et *Fusobacteria* (*Fusobacterium*) (9). Le temps de transit dans l'estomac d'un système de traceur magnétique chez des sujets sains a été estimé à 1 heure (10).

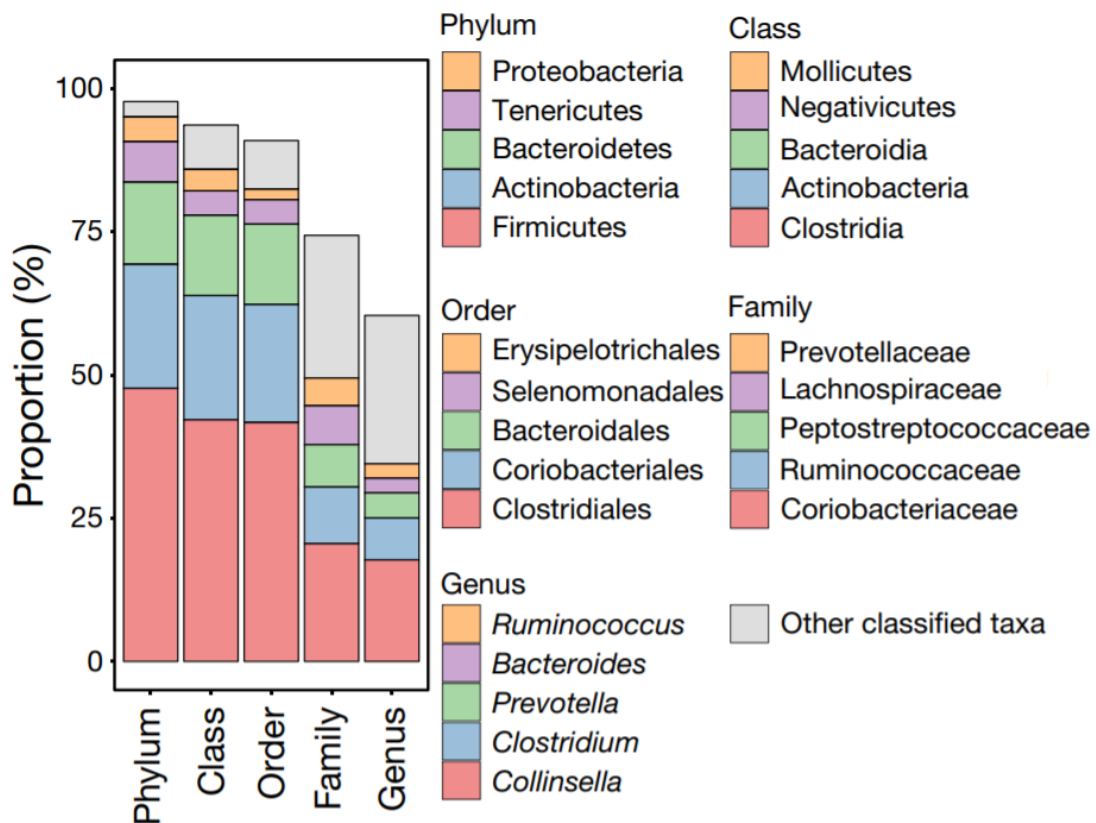
Dans l'intestin grêle, la concentration en bactéries augmente progressivement, partant de  $10^4$  UFC/mL dans le duodénum jusqu'à  $10^8$  UFC/mL au niveau de l'iléon terminal, pour un volume total de 800 mL (8). On retrouve principalement des bactéries appartenant aux *Firmicutes* (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*), et aux *Bacteroidetes* (*Porphyromonas*, *Prevotella*) (11). Le temps de transit dans l'intestin grêle a été estimé à 4 heures (10).

Dans le côlon, la concentration en bactéries est la plus importante, partant de  $10^8$  UFC/mL au niveau du cæcum jusqu'à  $10^{11}$  UFC/mL au niveau du côlon distal, pour un volume total de 400 mL (8). La composition du microbiote colique est très diverse, au



moins 160 espèces bactériennes différentes étant présentes chez chaque individu (12). Au total, dans une cohorte de 124 Européens, plus de 1000 espèces bactériennes différentes ont été identifiées comme faisant partie du microbiote colique (12). Les espèces bactériennes retrouvées appartenaient principalement aux *Firmicutes* (*Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*), aux *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Parabacteroides*), aux *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*, *Atopobium*) et en moindre quantité aux *Proteobacteria* (*Escherichia* et autres entérobactéries) (12). Le temps de transit dans le côlon a été estimé à 35h (13), et cette durée plus élevée induit une plus grande stabilité du microbiote colique au cours du temps.

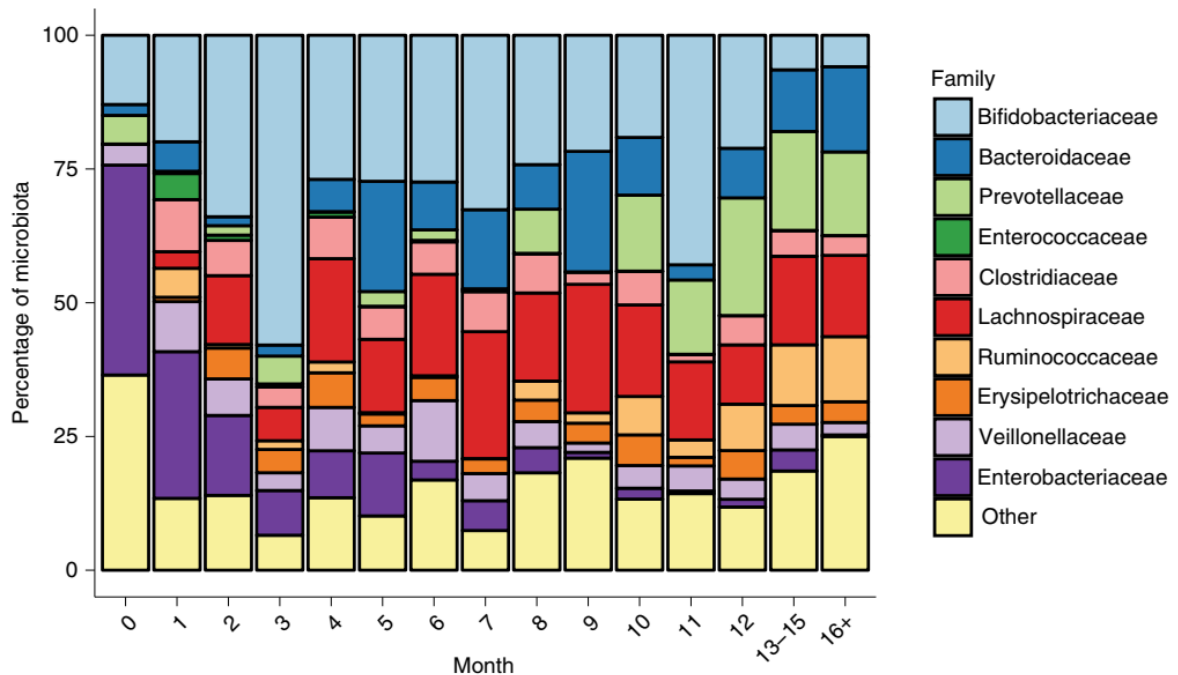
Le microbiote digestif varie également en fonction de l'origine géographique et de facteurs environnementaux. En étudiant 11 850 microbiomes digestifs humains provenant de 75 études différentes, Almeida et coll. ont identifié 1962 génomes qui correspondaient à des espèces bactériennes non décrites (Figure 1) (14). Il s'agissait principalement de bactéries appartenant à l'ordre des *Clostridiales*. La plupart de ces espèces non décrites provenait d'individus résidant en Afrique ou en Amérique du Sud. Le microbiote digestif d'individus vivant en Europe, en Amérique du Nord ou en Asie est mieux connu, reflétant un biais géographique dans les études actuelles. Ces différences de microbiote en termes d'origine géographique pourraient également être liées aux modes de vie différents selon les pays.



**Figure 1. Composition taxonomique de 1962 métagénomes correspondant à de nouvelles espèces bactériennes, d'après Almeida et coll. (14)**

Le microbiote digestif varie en fonction de l'âge. Des modifications majeures se produisent durant les premiers mois de vie, puis la composition du microbiote digestif tend à se stabiliser. Dans l'étude TEDDY, des prélèvements de selles de 903 enfants étaient réalisés entre 3 mois et 46 mois d'âge (15). L'alpha-diversité (une mesure du nombre d'espèces différentes co-existant dans un milieu donné) augmentait rapidement entre 3 mois et 20 mois. Durant les 20 premiers de mois de vie les phyla *Actinobacteria* et *Proteobacteria* diminuaient progressivement, ce qui était compensé par une augmentation des *Firmicutes*. Le facteur principal modifiant le microbiote était l'allaitement, associé à une augmentation des espèces de *Bifidobacterium*. Le mode d'accouchement intervenait également, avec plus de *Bacteroides* chez les enfants nés par voie basse par rapport à la césarienne. Les facteurs environnementaux (présence de frères et sœurs, présence d'animaux à domicile) intervenaient dans l'accélération de la maturation du microbiote.

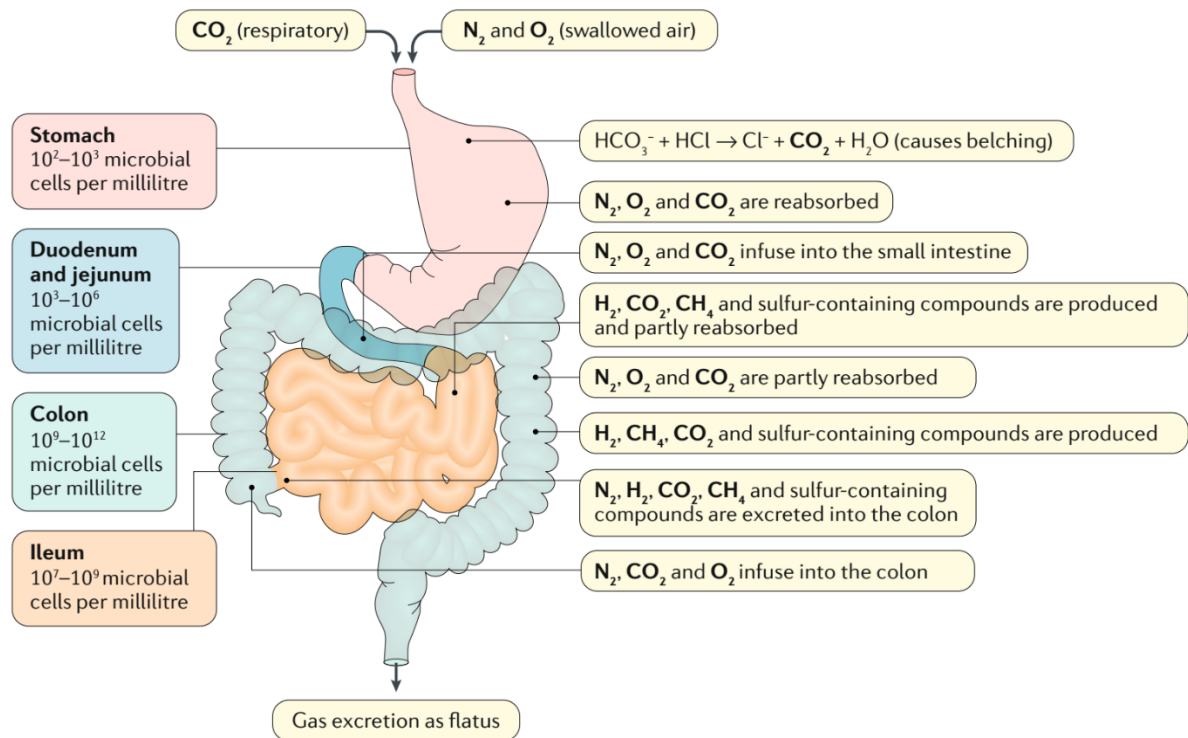
Une autre étude ayant analysé tous les mois le microbiote de 17 enfants nés à terme confirmait les résultats précédents (16). En effet, les *Enterobacteriaceae* (appartenant aux *Proteobacteria*) diminuaient rapidement dans les premiers mois de vie, alors que l'abondance relative des *Lachnospiraceae* et des *Ruminococcaceae* (appartenant aux *Firmicutes*) s'élevait (Figure 2).



**Figure 2. Évolution du microbiote digestif pendant les premiers mois de vie** (abondance relative), d'après Gasparrini et coll. (16).

Les bactéries représentent 99 % du microbiote digestif, mais on peut également noter la présence d'*Archaea* (0,8 % du microbiote) et de champignons (0,1 %) (12). Les *Archaea* sont des organismes unicellulaires. La plupart des espèces d'*Archaea* identifiées chez l'homme sont méthanogènes, comme *Methanobrevibacter smithii*. La prévalence de *M. smithii* dans la population est de 75 % (17), mais le rôle potentiel des *Archaea* en pathologie humaine est peu étudié. Les *Archaea* méthanogènes utilisent du dihydrogène ( $H_2$ ) pour réduire le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) en méthane ( $CH_4$ ), ce qui diminue la pression partielle gazeuse dans le côlon en consommant 4 moles de  $H_2$  et 1 mole de  $CO_2$  pour produire 1 mole de  $CH_4$  (18). Les *Archaea* méthanogènes sont dépendantes des espèces bactériennes productrices de  $H_2$ , telles que les *Ruminococcus* et les *Desulfovibrio*. La physiologie des gaz présents le long du tube digestif est détaillée dans la Figure 3. Auparavant, les techniques permettant l'étude de la production de gaz le long du tube

digestif étaient invasives, mais actuellement des capsules pouvant être ingérées et dotées de capteurs ont été développées (19).



**Figure 3. Physiologie des gaz retrouvés le long du tube digestif, d'après Kalantar-Zadeh et coll. (19).**

Les champignons ne représentent que 0,1 % du microbiote digestif, mais à la suite d'une antibiothérapie ce pourcentage peut être multiplié par 40 (20). Les principaux genres détectés sont *Saccharomyces* et *Candida*. La présence de levures est corrélée positivement avec la présence d'*Archaea* du genre *Methanobrevibacter* (21), probablement en lien avec les régimes alimentaires riches en carbohydrates. Des liens entre champignons et développement de maladie de Crohn, ou d'un syndrome du côlon irritable ont été évoqués (20). De plus, bactéries et champignons interagissent de multiples façons au niveau digestif, notamment en favorisant l'adhésion ou la formation de biofilm (22).

Il existe également un virome digestif : la concentration en particules pseudo-virales est de  $10^9$ /g de selles. La plupart d'entre elles correspondent à des bactériophages, des virus capables de moduler la composition en bactéries du tube digestif en les infectant. La composition du virome digestif est liée à l'alimentation et à des facteurs

environnementaux (23). Il existe un équilibre entre composition en bactéries et composition en bactériophages.

Le microbiote intestinal porte des fonctions métaboliques. Une des fonctions principales du microbiote digestif chez l'homme est d'utiliser les polysaccharides qui n'ont pas pu être digérés par les enzymes de l'hôte (amidon résistant,  $\beta$ -glucanes, pectines, cellulose, inuline). Les *Bacteroidetes* font partie des bactéries capables de dégrader des carbohydrates non digestibles. Par exemple, 18 % du génome de *Bacteroides thetaiotaomicron* est dévolu à la métabolisation des polysaccharides (24). Parmi les *Firmicutes*, les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* sont également capables de jouer un rôle dans la dégradation des polysaccharides complexes (25). De plus, la majeure partie des espèces produisant du butyrate, un acide gras à chaîne courte, font partie de ces deux familles de *Firmicutes*. D'autres acides gras à chaîne courte comme l'acétate, ou le propionate sont produits par des bactéries au niveau du côlon à partir d'une alimentation riche en fibre. Quatre-vingt-quinze pour cent (95 %) des acides gras à chaîne courte produits sont rapidement absorbés (26), et oxydés pour produire de l'énergie. En effet, 70 % de l'énergie nécessaire aux colonocytes provient du butyrate (26). Les principales bactéries capables de produire du butyrate, soit à partir du glucose soit à partir du lactate, sont les genres *Eubacterium*, *Anaerostipes*, et *Faecalibacterium* (27).

## **Chez la souris**

Le système digestif murin et celui de l'homme présentent des différences, les souris étant des herbivores exclusifs. La souris possède un préestomac, qui occupe 2/3 du volume de l'estomac et ne possède pas d'activité sécrétoire. Ce préestomac est uniquement utilisé pour stocker de la nourriture. Il est recouvert d'un biofilm de bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* (28). Le tiers inférieur de l'estomac murin est similaire à l'estomac humain, mais son pH est moins acide, de l'ordre de 3 à 4 pour l'estomac murin contre un pH proche de 1 chez l'humain (29).

L'intestin grêle est similaire chez la souris et l'humain. Cependant, des valvules conniventes (valvules de Kerckring) sont présentes chez l'homme, alors que chez la

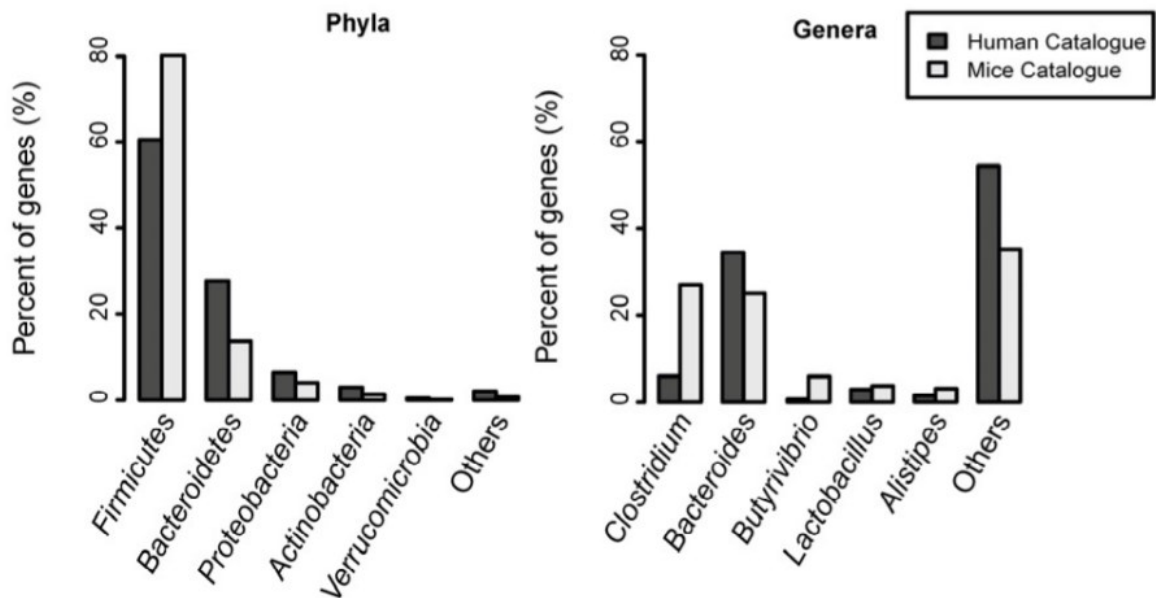
souris la paroi muqueuse est lisse. L'existence de ces anfractuosités chez l'homme permet de proposer une niche écologique à des bactéries associées au mucus. Le gros intestin comprend le cæcum et le côlon. Le cæcum murin est large, et permet la fermentation des aliments par les bactéries. Le côlon murin est lisse, tandis que le côlon humain présente des haustrations.

Le temps de transit total des aliments dans le tube digestif est de 14 à 76 heures chez l'homme, alors qu'il n'est que de 6 à 7 heures chez la souris. Chez le rongeur, des stratégies de rétention du microbiote intestinal permettent de lutter contre la perte liée au transit rapide des aliments. En effet, un sillon au niveau du côlon proximal provoque le retour vers le cæcum d'une partie du microbiote intestinal lié au mucus (28). De plus, le caractère coprophage des souris leur permet de mieux absorber certaines vitamines (30). On peut ainsi considérer que les souris recyclent leur propre microbiote (30).

La compartimentalisation du microbiote digestif murin a été étudiée récemment (31). De très fines sections du colon étaient disséquées (100 x 100 x 10 µm), à partir du colon proximal jusqu'au colon distal. Les échantillons prélevés au niveau du mucus présentaient une alpha-diversité moins importante que les échantillons luminaux. L'alpha-diversité était plus importante dans le colon distal que dans le colon proximal.

Au niveau de la composition du microbiote, une spécificité des modèles murins est la présence en grande quantité de *segmented filamentous bacteria* (SFB), également appelés *Candidatus* *Savagella*. Le terme de *Candidatus* *Arthromitus* ne doit plus être employé, car il correspond en réalité à des bactéries présentes dans le tube digestif d'insectes. Les SFB sont connus pour favoriser une polarisation Th17 des lymphocytes T CD4 au niveau de la maturation des cellules immunitaires (32). Les SFB sont généralement considérés comme absents chez l'homme. Récemment, une étude suggère que les SFB pourraient être présents en faible quantité au niveau digestif chez les enfants de moins de 36 mois (33). Cette observation demande à être confirmée par d'autres études, et la faible abondance de SFB détectée chez ces enfants contraste avec le rôle majeur observé dans les modèles murins. Des bactéries ayant un rôle analogue aux SFB pourraient exister chez l'homme. Par exemple, *Bifidobacterium adolescentis*, une bactérie isolée chez l'homme, est capable d'induire une réponse Th17 lorsqu'elle est inoculée dans un modèle murin (34).

La composition des grands phyla des métagénomés digestifs murin et humain était similaire dans une étude portant sur des selles de 184 souris (Figure 4) (35). Au niveau du genre bactérien, quelques différences étaient quand même retrouvées : *Faecalibacterium* et *Klebsiella* étaient présents principalement chez les humains.



**Figure 4. Comparaison des métagénomés digestifs murins et humains**, d'après Xiao et coll. (35).

Même si par rapport à l'humain des différences marquées au niveau de la structure du tube digestif sont retrouvées chez les souris (préestomac, temps de transit total 4x plus rapide), ainsi qu'au niveau de leur comportement (coprophagie), et de la composition de leur microbiote (présence de SFB), il n'existe pas véritablement de meilleure alternative en termes de modèle animal. Il est important de tenir compte de ces différences structurelles lors de l'interprétation des données provenant de modèles murins.

## 2.1.2. Techniques d'étude du microbiote

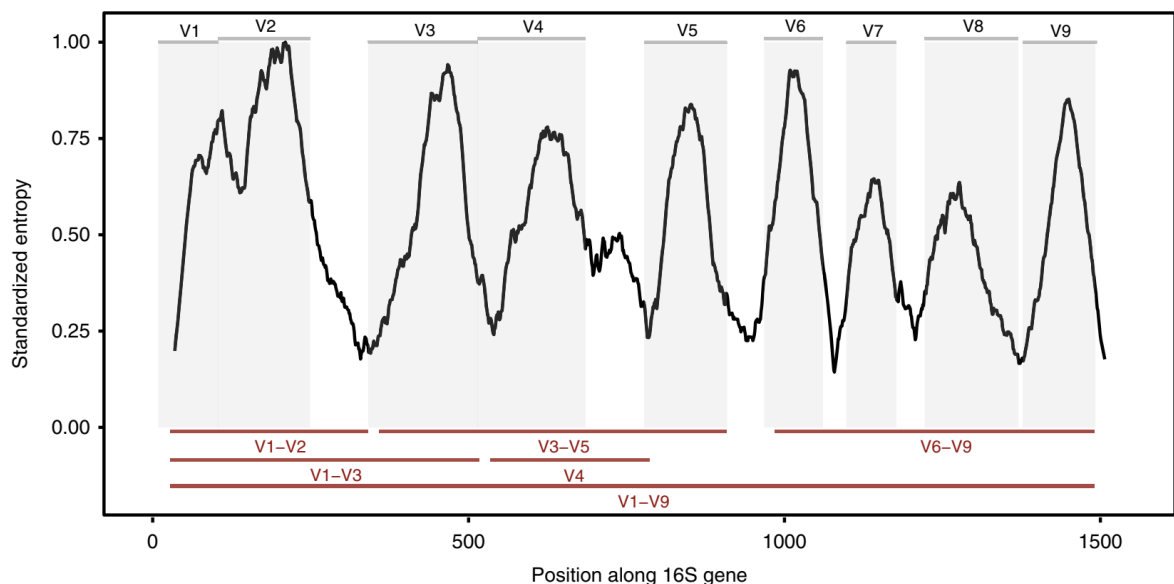
### 16S rDNA : Bacterial Community Profiling

Les gènes ADNr sont présents chez toutes les formes de vie (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*). Des régions hautement conservées sont présentes au niveau des gènes ADNr, des amorces dites « universelles » peuvent donc être utilisées pour une amplification par

PCR (Polymerase Chain Reaction), ainsi que pour le séquençage. Ainsi, les *Bacteria* et les *Archaea* peuvent être détectées en amplifiant le gène codant pour l'ADNr 16S. D'une façon similaire, l'ADNr 18S joue ce rôle pour les champignons. Ces gènes organisés en opérons sont habituellement présents en plusieurs copies dans un génome, mais ce nombre est variable selon les espèces.

Non seulement les gènes codant pour les ADNr sont ubiquitaires, mais en plus ils reflètent des changements liés à l'évolution des espèces bactériennes. En effet, les contraintes fonctionnelles au niveau de la translation des protéines limitent l'étendue de ces changements. Pour ces raisons, l'ADNr a été décrit comme étant le « chronomètre moléculaire ultime » (36). Le séquençage de l'ADNr 16S est un excellent outil pour refléter la phylogénie bactérienne.

Pour amplifier les gènes de l'ADNr 16S, les amorces doivent se fixer sur des régions conservées, et amplifier un segment hypervariable. Neuf régions hypervariables sont retrouvées au niveau de l'ADNr 16S, associées à une entropie élevée (Figure 5) (37). Les segments V4 à V6 présentent une bonne résolution phylogénétique (38).



**Figure 5. Illustration des régions hypervariables présentes au niveau de l'ADNr 16S et de l'entropie associée, d'après Johnson et coll. (37).**



Cependant, la distinction entre régions conservées et régions hypervariables n'est pas binaire. Même les régions dites conservées ne sont pas conservées à l'identique chez toutes les bactéries, il est donc inévitable que des mésappariements entre l'amorce et la matrice d'ADN se produisent pour certaines espèces bactériennes. Si ces mésappariements ne concernent pas les 3 à 5 dernières bases des amorces (l'endroit où vient se fixer la Taq polymérase), l'amplification pourrait quand même avoir lieu, mais ces espèces seraient sous-représentées au niveau des analyses métagénomiques ciblées sur l'ADNr 16S par diminution de l'efficacité de l'amplification. Ainsi, Chen et coll. ont récemment repris les séquences des amorces les plus couramment utilisées pour l'analyse du microbiote, ainsi que les variations en termes de séquences qui pouvaient exister chez certains phyla ou ordres bactériens (Figure 6).

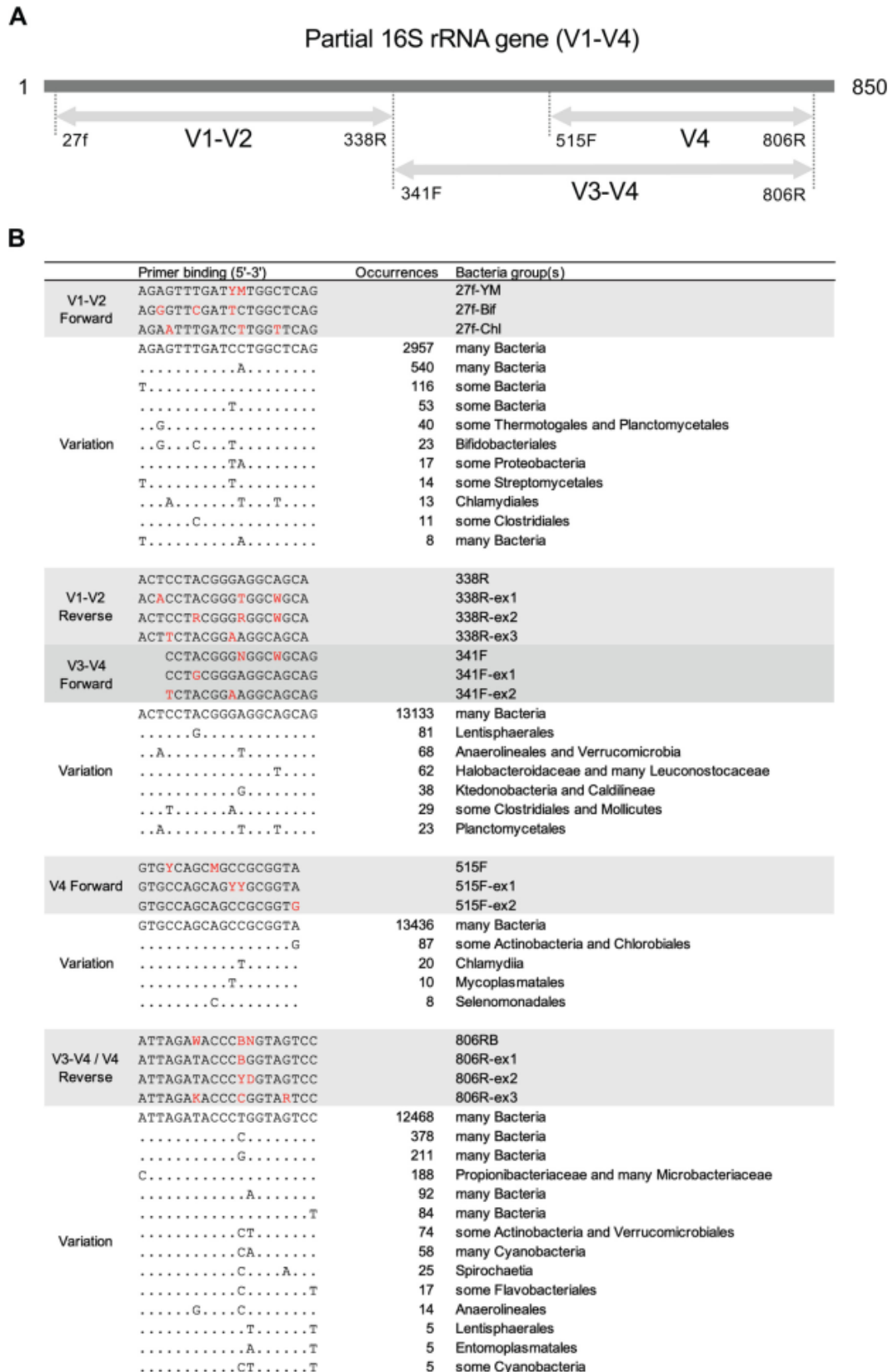
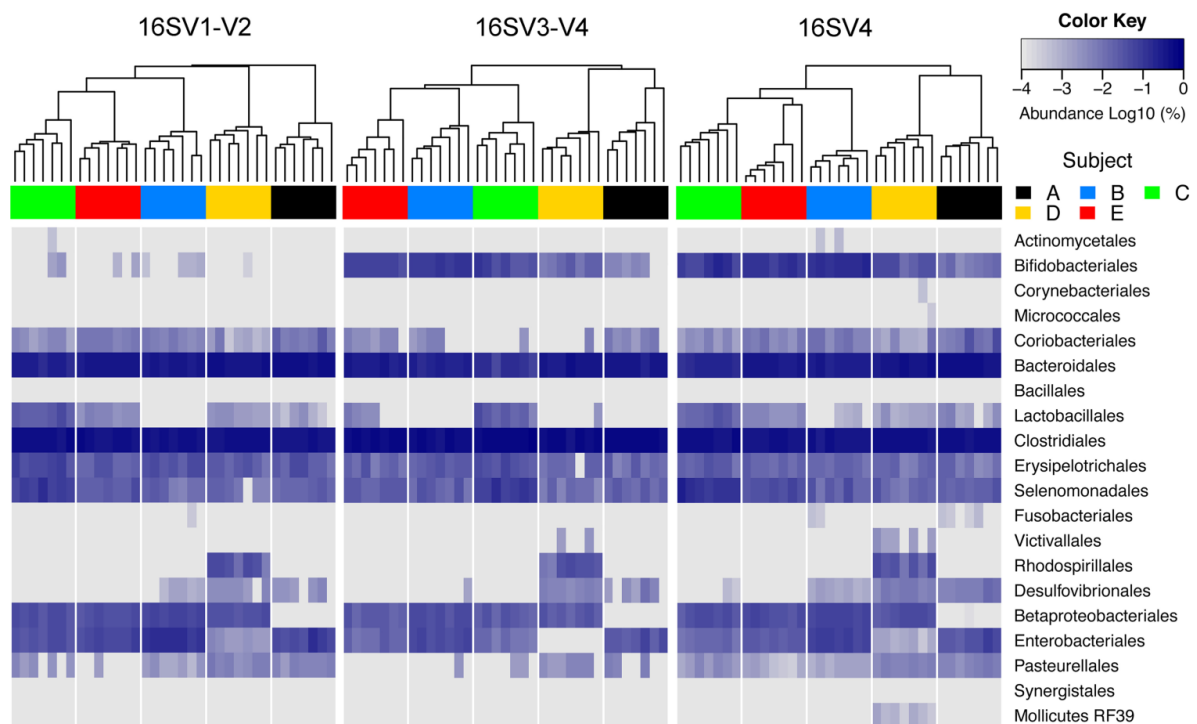


Figure 6. Variation de séquence d'ADNr 16S à l'endroit où se fixent les amorces principalement utilisées pour l'analyse de microbiote, d'après Chen et coll. (39).

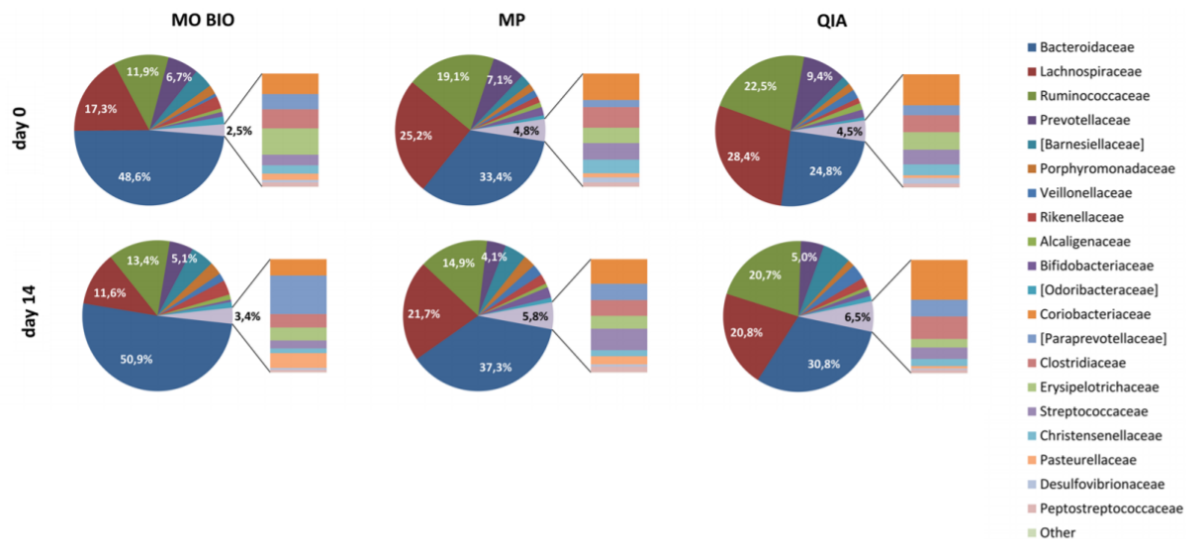
De plus, en fonction du segment hypervariable amplifié la résolution phylogénétique diffère. Cela peut également aboutir à la sous-représentation de certains taxons, même si les amorces ont permis une amplification correcte. On peut au final obtenir des différences majeures concernant des ordres d'intérêt au niveau du microbiote digestif (*Bifobacteriales*, *Fusobacteriales*, *Lactobacilliales*) en fonction du segment amplifié (Figure 7). Le segment V4 est réputé pour présenter la meilleure résolution phylogénétique.



**Figure 7. Heatmap des variations d'abondance de différents ordres concernant le microbiote digestif de 6 sujets, d'après Chen et coll. (39).**

L'étape d'extraction de l'ADN bactérien est également primordiale pour éviter de sous-représenter un genre bactérien. En analysant des mélanges microbiens prédéfinis, les bactéries à Gram positif semblent sous-représentées par rapport aux bactéries à Gram négatif (40). En effet, la paroi des Gram positifs est plus difficile à lyser, ce qui provoque un biais dont il est difficile de s'affranchir. En comparant 3 kits d'extraction classiquement utilisés dans les laboratoires de recherche ou de diagnostic, le kit Power Fecal DNA Isolation Kit (MoBIO, Qiagen, Hilden, Allemagne) présentait une moins bonne extraction de certaines familles de Gram positifs comme les *Lachnospiraceae* ou les

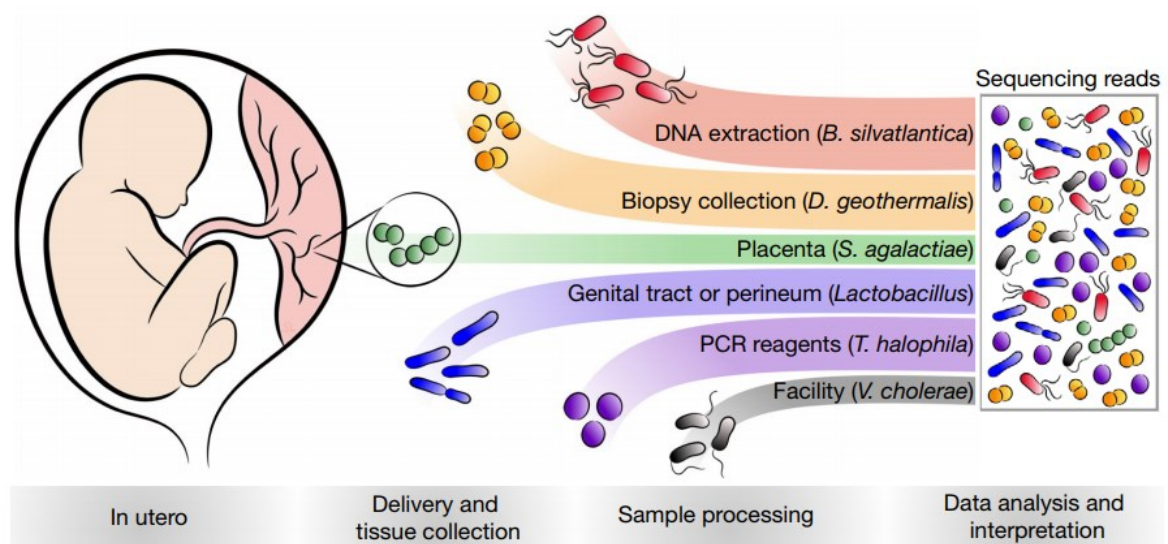
*Ruminococcaceae*, associée à une surreprésentation de l'abondance relative des *Bacteroidaceae* qui sont des bactéries à Gram négatif (Figure 8). Les kits Fast DNA SPIN Kit Feces (MP Biomedicals, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) et QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) semblaient plus appropriés dans cette étude (41).



**Figure 8. Effet du kit d'extraction utilisé, et de la durée de stockage avant extraction**, d'après Panek et coll. (41). MO BIO = Power Fecal DNA Isolation Kit (MO BIO), MP = Fast DNA SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals), QIA: QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). Day 0 = extraction réalisée à J0, Day 14 = extraction réalisée après 14 jours de stockage à -20 °C.

Les techniques d'amplification de l'ADNr 16S étant extrêmement sensibles, des contaminations liées aux réactifs utilisés peuvent se produire (réactifs d'extraction, de purification, ou de PCR). Lorsque la quantité d'ADN bactérien dans l'échantillon est faible, il est primordial de comparer les résultats à ceux des témoins négatifs. Par exemple, l'existence d'un microbiote au niveau du placenta a fait l'objet d'un débat (42). Il a récemment été montré qu'il n'existait pas de microbiote au niveau du placenta, mais qu'on pouvait néanmoins y détecter de l'ADN de certaines bactéries pathogènes telles que *Streptococcus agalactiae* (43). L'ADN bactérien amplifié au niveau du placenta pouvait avoir comme origine : (i) une contamination du placenta par des bactéries de la flore vaginale au moment de l'accouchement (*Lactobacillus*), (ii) une contamination de la biopsie quand elle était lavée avec du sérum physiologique (*Deinococcus geothermalis*), (iii) une contamination par de l'ADN bactérien présent dans les kits d'extraction

(*Burkholderia silvatlantica*), (iv) une contamination par de l'ADN bactérien présent dans les réactifs d'amplification (*Thiohalocapsa halophila*), (v) une contamination par de l'ADN bactérien présent dans l'équipement utilisé pour le séquençage (*Vibrio cholerae*) (Figure 9).



**Figure 9. Sources de l'ADN bactérien détecté dans le placenta humain, d'après de Goffau et coll. (43).**

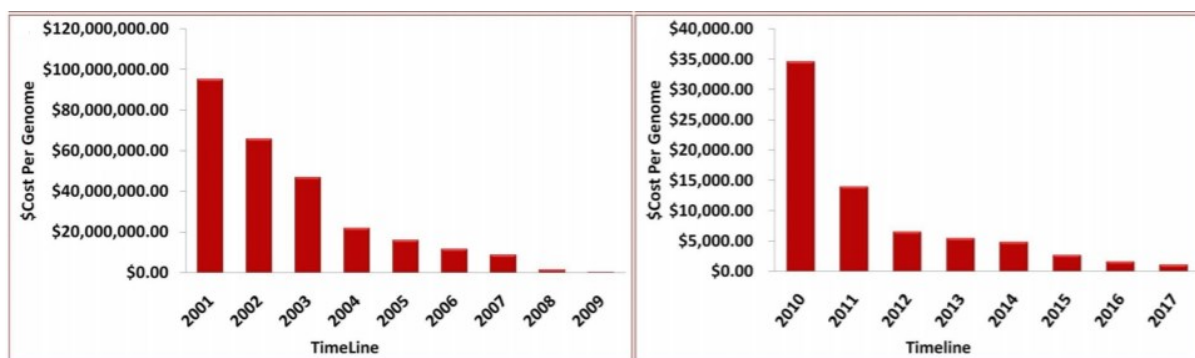
Le package R *decontam* permet d'éliminer les séquences contaminantes assez facilement, à partir de contrôles d'extraction également séquencés. Ce package utilise des tests statistiques basés sur la prévalence et l'abondance de différentes séquences dans les contrôles négatifs par rapport aux échantillons. Cette approche a récemment été utilisée avec succès pour analyser des échantillons de faible biomasse (31).

Ce problème se pose moins pour l'étude d'échantillons où la quantité d'ADN bactérien est importante, comme au niveau digestif. En effet, la concentration en ADN bactérien au niveau digestif est très supérieure à celle retrouvée dans les réactifs d'extraction ou de séquençage.

## Technologies disponibles

### Séquençage de *read* courts (200 à 400 paires de bases)

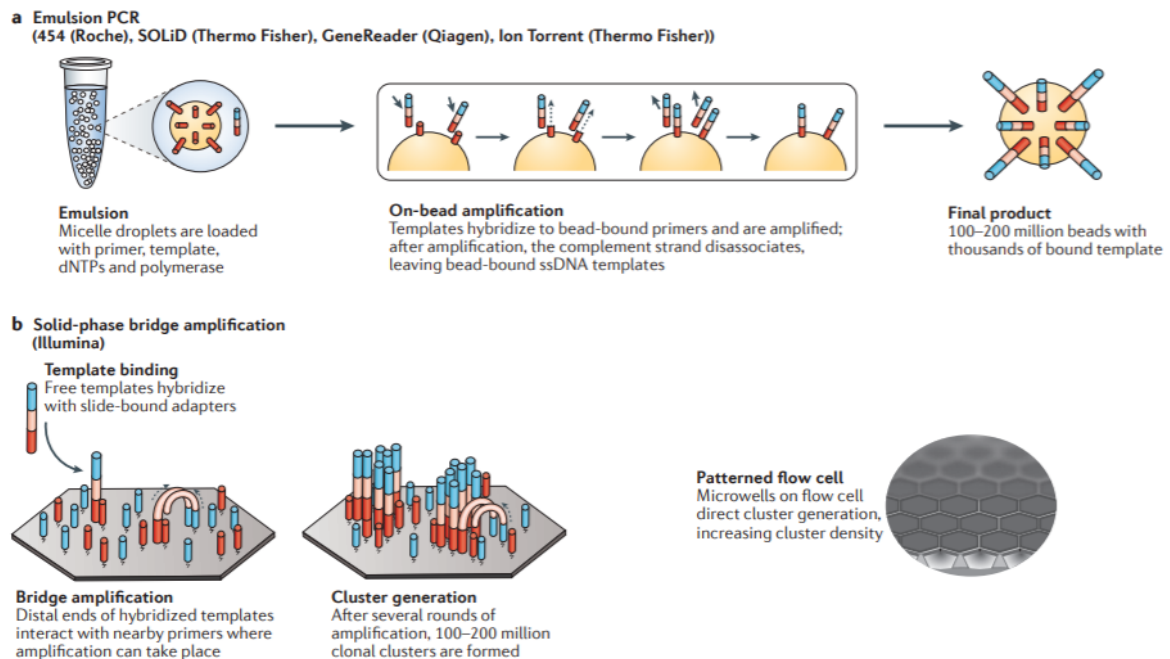
Avant l'arrivée du séquençage nouvelle génération (NGS), l'analyse du microbiote bactérien était superficielle. La plupart des études faisaient appel uniquement à la culture. Cependant, ces études ne mettaient en évidence qu'une petite part de l'ensemble du microbiote. Le développement du NGS a réellement rendu possible l'étude précise des microbiotes et de leur dynamique, y compris des fractions non cultivables. Le coût de ces technologies diminue progressivement, et elles sont devenues abordables pour de nombreux laboratoires de recherche (Figure 10). À titre d'exemple, le séquençage d'un génome bactérien avec une profondeur supérieure à 600 était de 250 \$ en 2018. Il est aujourd'hui facile d'obtenir des devis de sociétés privées ou de partenaires académiques provenant de différents pays en quelques jours.



**Figure 10. Coût du séquençage d'un génome bactérien entre 2001 et 2017, d'après Malla et coll. (44).**

Dans le cadre de l'étude du microbiote bactérien, il est habituellement nécessaire d'amplifier et de séquencer certaines régions hypervariables du gène ADNr 16S. Les régions hypervariables peuvent être amplifiées par plusieurs couples d'amorces pour le kit Ion 16S™ Metagenomics Kit (régions V2, V3, V4, V6, V7, V8, et V9), mais il est également possible de n'amplifier qu'une ou deux régions hypervariables d'intérêt, comme V3 et V4. Les fragments d'ADNr 16S amplifiés seront liés à un adaptateur commun pour être de nouveau amplifiés et recouvrir la surface d'une bille avec un même clone de séquences d'ADN par bille grâce à une PCR en émulsion dans le cadre de la technologie Ion Torrent (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis), ou former un cluster

grâce à une amplification en pont dans le cadre de la technologie Illumina (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) (Figure 11).

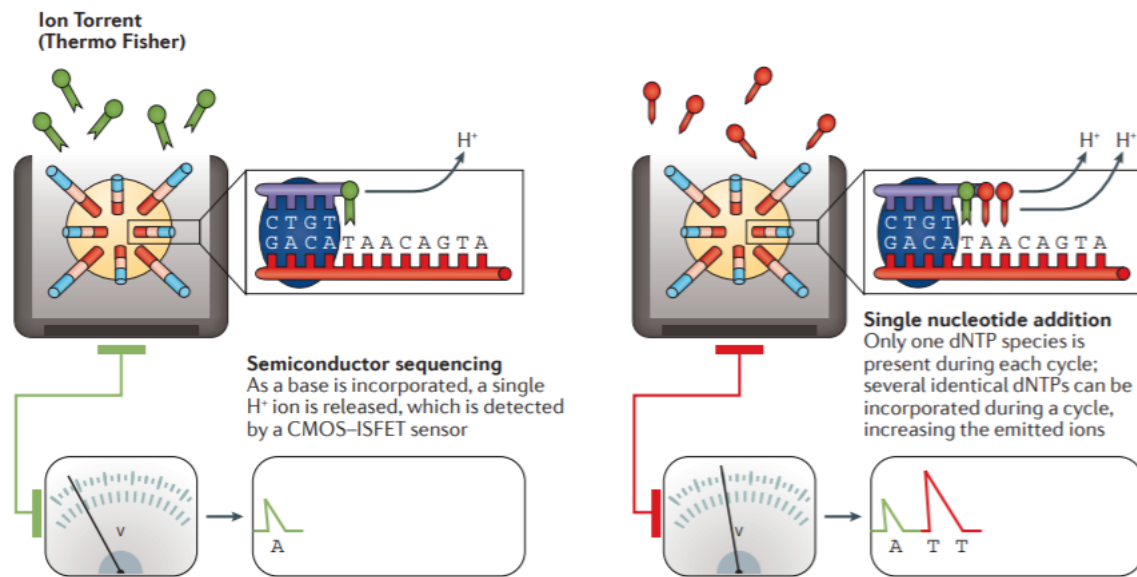


**Figure 11. Technologies d'amplification préalables au séquençage**, d'après Goodwin et coll. (45). PCR en émulsion (Ion Torrent), PCR en pont (Illumina).

Le séquençage nouvelle génération permet ensuite de séquencer en parallèle des centaines de milliers de fragments d'ADN. Il a principalement lieu par synthèse : soit les nucléotides sont ajoutés un par un (Ion Torrent), soit ils sont bloqués en utilisant des molécules terminatrices similaires au séquençage de type Sanger pour empêcher l'élongation (Illumina).

Pour Ion Torrent, chacun des 4 nucléotides est ajouté un à un, sans nécessité de bloquer l'élongation. Cela pose toutefois un problème en cas d'homopolymères d'une base d'acide nucléique, car pour déterminer la séquence, le système recherche une augmentation proportionnelle du signal détecté en cas d'incorporation de plusieurs nucléotides en une seule fois. La technologie Ion Torrent détecte la production d'ions H<sup>+</sup> qui sont générés à chaque fois qu'un désoxyribonucléotide (dNTP) est incorporé, ce qui va modifier le pH (Figure 12). Cependant, ce système présente des limites en cas

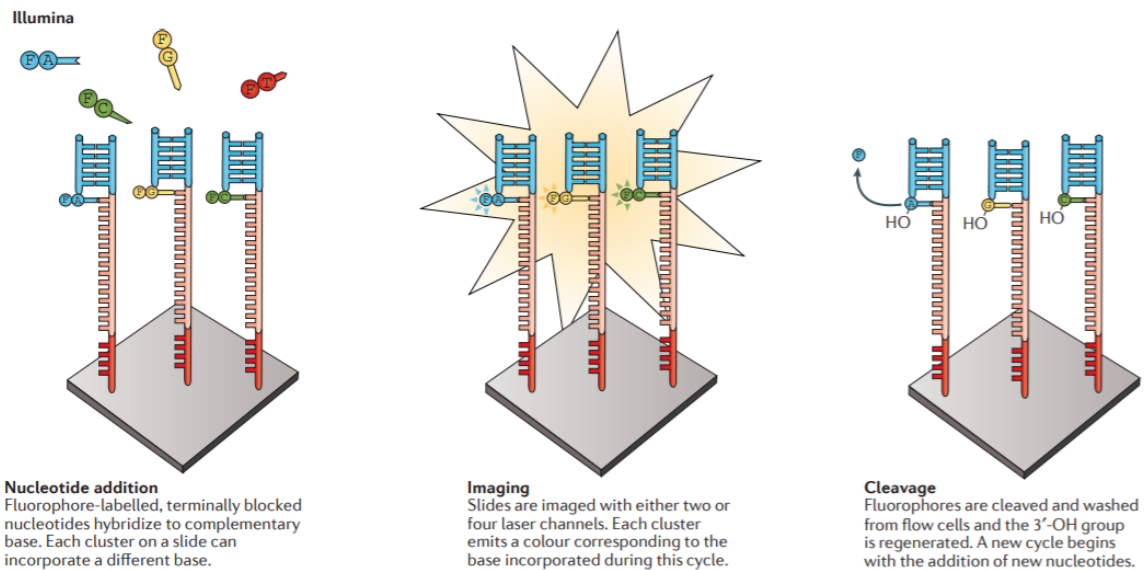
d'homopolymères de grande taille. Il est ainsi peu fiable pour discriminer une séquence avec 8 « A » d'une séquence avec 9 « A ».



**Figure 12. Ion Torrent : détection de modifications de pH associées à l'incorporation de dNTP non bloqués ajoutés un à un, d'après Goodwin et coll. (45).**

Pour Illumina, l'élongation est empêchée après incorporation d'un dNTP en utilisant des molécules où le groupe 3'-OH du ribose est bloqué (Figure 13). Ces nucléotides bloqués sont associés à un des quatre fluorophores, en fonction du nucléotide. Ce fluorophore va être détecté, puis clivé. Un nouveau cycle va pouvoir commencer après déblocage du nucléotide. Les homopolymères sont ainsi correctement séquencés. Le choix de la technologie de séquençage va conditionner l'analyse bio-informatique ultérieure pour tenir compte des homopolymères.

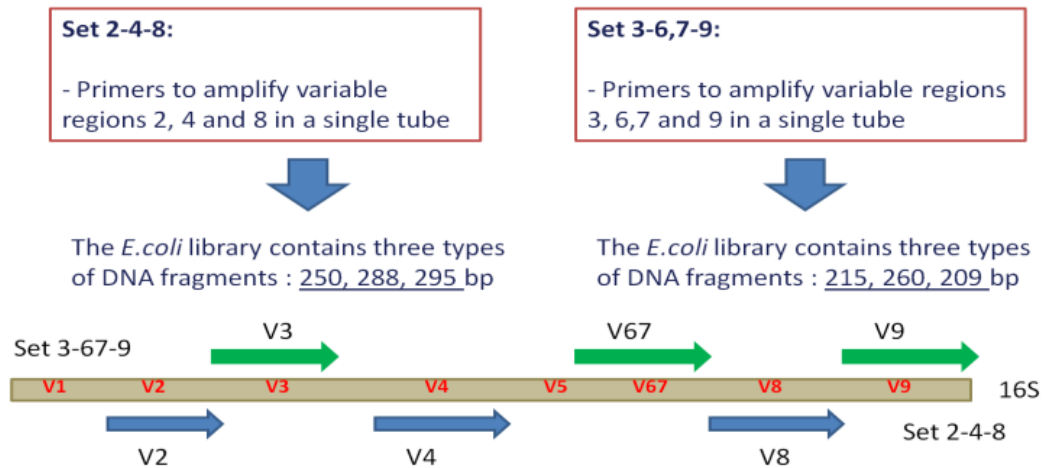




**Figure 13. Illumina : détection de fluorophores associés à des dNTP bloqués,** d'après Goodwin et coll. (45).

Ces deux méthodes permettent de séquencer des *read* relativement courts, de l'ordre de 200 à 400 paires de bases pour la technologie Ion PGM, et de 250 à 300 paires de bases pour la technologie Illumina Miseq v2 et v3. Cette longueur de *read* courte est toutefois suffisante pour séquencer une région hypervariable telle que V4, de longueur inférieure à 300 paires de bases.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le kit Ion 16S™ Metagenomics sur Ion Torrent. Six produits d'amplification permettent d'obtenir la séquence de 7 régions hypervariables grâce au kit Ion 16S™ Metagenomics (Figure 14). Séquencer 7 régions hypervariables présente un intérêt sur le plan théorique, car certaines régions seront mieux adaptées pour ne pas sous-estimer certains genres bactériens. Par exemple, en séquençant des échantillons de microbiote fécal, le genre *Faecalibacterium* représentait 0,5 % de la librairie générée uniquement par les amorces V4, contre 16 % pour l'ensemble des 7 régions amplifiées (d'après la brochure Thermo Fisher, données non publiées).

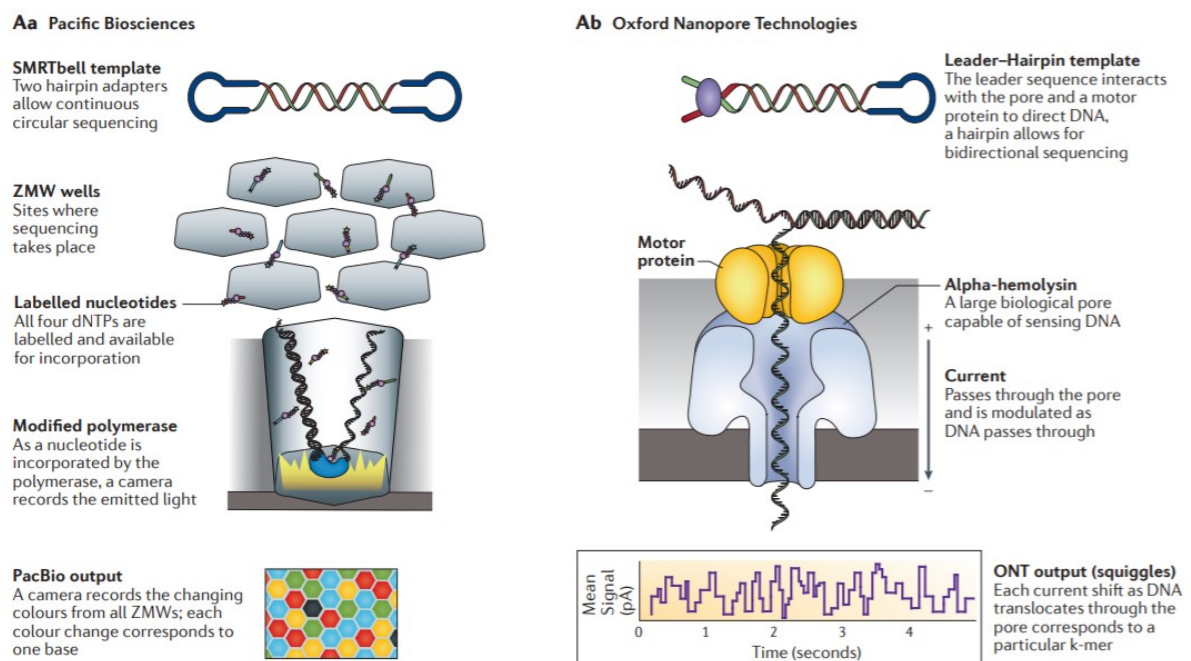


**Figure 14. Régions hypervariables de l'ADNr 16S amplifiées par le kit Ion 16S™ Metagenomics, d'après Thermo Fisher.**

Cependant, les régions amplifiées étant de taille différente (209 à 295 paires de bases), et les séquences des amorces utilisées n'étant pas publiées, cela complexifie considérablement l'analyse bio-informatique si on ne souhaite pas utiliser le logiciel propriétaire de Thermo Fisher (Ion Reporter Software). Qiime 2 est un des pipelines les plus utilisés pour l'analyse métagénomique. L'utilisation de Qiime 2 est bien adaptée à l'utilisation d'un seul couple d'amorces, avec des produits d'amplification de même taille et correspondant à la même séquence hypervariable. En effet, des algorithmes de classification basés sur un réseau bayésien naïf peuvent être utilisés. Les performances de ce réseau bayésien naïf sont en théorie augmentées après optimisation par rapport à la composition taxonomique attendue. Il est possible d'entraîner son propre réseau bayésien à partir des séquences des amorces utilisées et des amplicons d'un projet donné. Étant donné que le kit Ion 16S™ Metagenomics renvoie des séquences correspondant à 6 amplicons, et que les séquences des amorces ne sont pas connues, cela n'a pas été possible dans notre travail. Nous avons tout de même utilisé Qiime 2 pour analyser des données générées par le kit Ion 16S™ Metagenomics au moyen de quelques adaptations (Annexe 1), notamment en utilisant un réseau bayésien préentraîné sur l'intégralité de la séquence de l'ADNr 16S.

## Séquençage de *read* longs (plusieurs milliers de paires de bases)

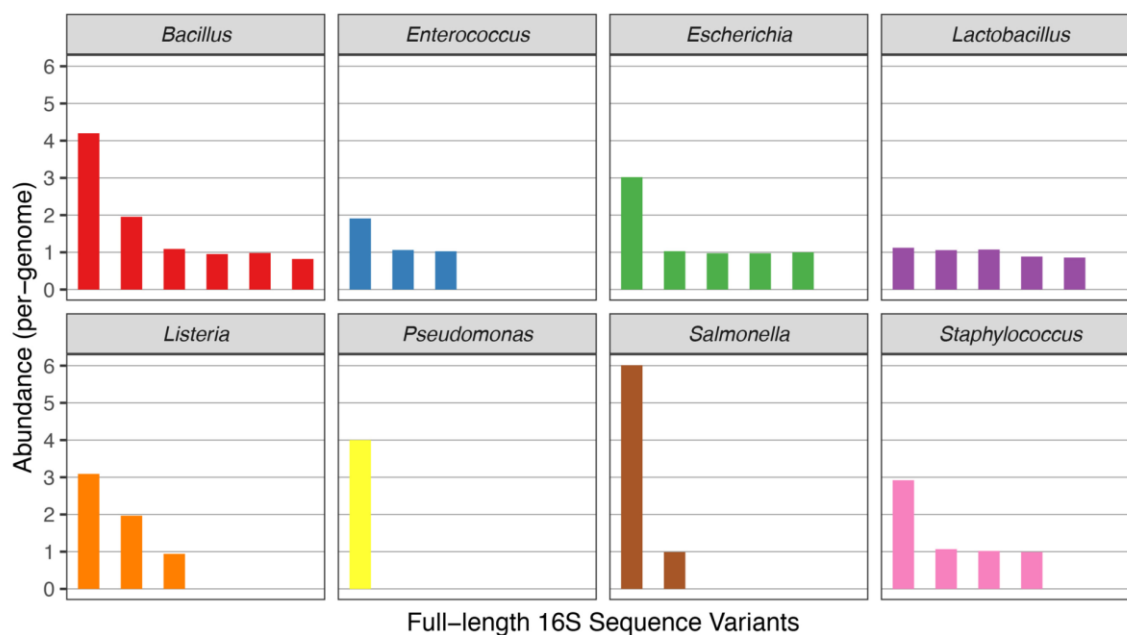
Une approche avec des *read* courts peut induire des biais, car on n'obtiendra pas exactement les mêmes résultats selon la région hypervariable séquencée, certaines étant plus discriminantes selon les espèces bactériennes. De plus, une identification au niveau de l'espèce est rarement possible avec des *read* courts. Le plus souvent, un séquençage de *read* courts permet de classer les séquences uniquement au niveau du genre bactérien. Des approches de séquençage de *read* longs ont été développées, permettant de séquencer en une seule fois l'intégralité de l'ADNr 16S (> 1500 paires de bases). Ces technologies séquencent une seule molécule d'ADN à la fois, et les plus connues sont PacBio (Pacific Biosciences, Menlo Park, Californie, États-Unis) et Oxford Nanopore (Oxford Nanopore, Oxford, Royaume-Uni) (Figure 15). Cependant, ces technologies sont encore coûteuses et associées à un taux élevé d'erreurs de séquençage, elles sont donc pour l'instant peu employées pour l'analyse de microbiote. En bactériologie, elles sont actuellement principalement utilisées en association avec une technologie de type *read* court pour obtenir un séquençage de génome bactérien complet et pas seulement plusieurs dizaines de *contigs* séparés.



**Figure 15. Principe des technologies PacBio et Oxford Nanopore permettant de séquencer des *read* longs (plusieurs dizaines de milliers de bases), d'après Goodwin et coll. (45).**

Que ce soit pour du séquençage de *read* courts ou longs, les *amplicon sequence variants* (ASV) générés par *dada2* pourraient remplacer les *operational taxonomic unit* (OTU) générés par des algorithmes comme *mothur*. Les OTU sont générés en rassemblant les *read* qui présentent une similarité supérieure à 97 %, une valeur arbitraire qui est également utilisée dans la définition d'espèce bactérienne. Récemment, des méthodes ont été développées pour résoudre en ASV les séquences générées. Les ASV permettent de distinguer ce qui est une réalité biologique (différents variants de séquences d'ADNr 16S) de ce qui n'en est pas (erreur de séquençage, erreur d'amplification). La résolution en ASV est basée sur le fait que des séquences correspondant à une réalité biologique seront répétées un plus grand nombre de fois que des séquences correspondant à des erreurs introduites artificiellement. Aucune valeur arbitraire de dissimilarité n'est imposée. Ces différences sont bien expliquées dans un article écrit par Callahan et coll., mais étant donné qu'il s'agit des développeurs de *dada2* (utilisant les ASV), un biais en faveur des ASV existe dans cet article (46).

Dans un article récent également écrit par Callahan et coll. (47), une technologie de séquençage de *read* longs (PacBio) a été appliquée avec d'excellents résultats sur une communauté bactérienne artificiellement construite. Huit espèces bactériennes étaient mélangées en proportions équimolaires. Le nombre de copies d'ADNr 16S par génome était compris entre 4 copies pour *Pseudomonas aeruginosa* et 10 copies pour *Bacillus subtilis*. La quasi-totalité des 1 500 paires de bases de l'ADNr 16S était séquencée, après une amplification par le couple d'amorces 27F et 1492R. Le taux d'erreurs de séquençage élevé inhérent aux techniques de *read* longs (10 % d'erreurs) a pu être réduit en utilisant une technique de séquences consensus circulaires. Cette technique consiste à créer une boucle à partir d'une séquence amplifiée, et à la lire plusieurs fois pour lui associer une séquence consensus (48). Au final, le taux d'erreur de séquençage était de 0,04 %, une valeur inférieure aux techniques de séquençage de *read* courts (0,5 %). Les résultats sont assez impressionnants, car sur les 8 souches du mélange bactérien, 29 ASV ont pu être identifiés, correspondant à des variants alléliques du gène de l'ADNr 16S (Figure 16). L'abondance de chacun de ces ASV par génome est très proche d'un nombre entier, comme c'est censé être le cas si ce séquençage correspond à une réalité biologique. En effet une souche donnée peut posséder plusieurs variants alléliques du gène ADNr 16S, mais il s'agit forcément d'un nombre entier.



**Figure 16. Abondance par génome des *amplicon sequence variants* (ASV) dans une communauté microbienne artificiellement construite, d'après Callahan et coll. (47).**

Une autre communauté bactérienne a été étudiée dans le même article, et l'algorithme *dada2* (basé sur des ASV) permettait de discriminer *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus epidermidis*, alors que *mother* et *uparse* (basés sur des OTU) regroupaient ces séquences dans un même OTU. Ces résultats ont l'air très convaincants, mais étant donné que l'article est signé à la fois par les développeurs de *dada2* ainsi que par des employés de PacBio, des biais importants existent. Si des auteurs indépendants confirment ces résultats, il pourrait s'agir d'une méthode de métagénomique ciblée extrêmement précise, permettant une discrimination au niveau de l'espèce pouvant se révéler très utile pour certaines applications.

### 2.1.3. Effet d'une antibiothérapie

La plupart des antibiotiques utilisés en pratique clinique ont un spectre d'action assez large, et agissent non seulement sur la bactérie pathogène que l'on souhaite traiter, mais aussi sur le microbiote intestinal. Ainsi, l'effet principal des antibiotiques sur l'intestin est médié par les modifications du microbiote qu'ils entraînent.

Chaque antibiotique possède des caractéristiques qui lui sont propres : spectre d'action, pharmacocinétique, pharmacodynamique. La plupart des antibiotiques hydrophiles ( $\beta$ -lactamines, aminoglycosides, glycopeptides) ont une élimination urinaire. La plupart des antibiotiques lipophiles (clindamycine, macrolides, fluoroquinolones, tétracyclines, métronidazole) ont une élimination hépatique. L'absorption intestinale joue aussi un rôle : par exemple le métronidazole est presque entièrement absorbé au niveau de l'intestin grêle (49), la concentration en métronidazole est donc faible une fois arrivé au niveau du côlon. Au total, cela aboutit à des effets différents sur le microbiote digestif (Tableau 1).

**Tableau 1. Effet de différentes classes d'antibiotiques sur le microbiote digestif.**

Classe d'ATB	Excrétion	Effet sur le microbiote digestif			
		Anaérobies		Aérobies	
		Gram -	Gram +	Gram -	Gram +
Clindamycine	Biliaire +++	↓	↓	↑	↓
B-lactamines	Urinaire +++	↑	↓	↑	↓
Fluoroquinolones	Biliaire ++	-	-	↓	↑
Glycopeptides	Administration orale	↑	↓	↑	↓

Adapté de Ianiro et coll. (50).

Les antibiotiques altérant le plus le microbiote digestif ont un spectre d'action dirigé contre les bactéries anaérobies, et une élimination principalement biliaire.

La clindamycine est éliminée principalement par voie biliaire, après passage par le foie, sous forme de métabolites possédant une activité antibactérienne variable. Sa demi-vie est de 3 heures. Après une injection de 600 mg de clindamycine, la concentration de clindamycine au niveau des voies biliaires est trois fois plus élevée que dans le sérum

(51). Le spectre d'action de la clindamycine est dirigé contre les anaérobies ainsi que les bactéries à Gram positif. Toutes les *Enterobacteriaceae* sont naturellement résistantes à la clindamycine. Dans un modèle murin, une seule injection de clindamycine induisait une altération profonde du microbiote, associée à une augmentation des *Enterobacteriaceae* au niveau iléal et cæcal (52).

La famille des  $\beta$ -lactamines est très vaste, pouvant présenter une forte activité anti-anaérobie lorsqu'elles sont associées à un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (amoxicilline + acide clavulanique, pipéracilline + Tazobactam). Les carbapénèmes présentent également une activité anti-anaérobie importante. L'élimination des  $\beta$ -lactamines est principalement urinaire. Le Tazobactam, un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase, est aussi éliminé par voie urinaire et seulement 0,6 % de la dose est retrouvée dans les fèces (53). Le méropénème est également éliminé à 98 % dans l'urine et seulement 2 % de la dose initiale est retrouvée dans les fèces (54).

Les fluoroquinolones sont éliminées à la fois par voie biliaire et par voie urinaire. La demi-vie de la ciprofloxacine est de 3 heures. Quinze pour cent (15 %) de la dose de ciprofloxacine administrée est retrouvée au niveau des selles. Cependant, moins de 1 % de la ciprofloxacine est éliminée par voie biliaire (55). Cette différence s'explique par une excrétion directe de la ciprofloxacine à travers la barrière intestinale. La ciprofloxacine possède une activité anti-anaérobie médiocre, mais certaines quinolones plus récentes comme la moxifloxacine ont une bonne activité anti-anaérobie (56).

La vancomycine n'est pas absorbée par voie orale, mais elle peut être administrée *per os* pour traiter des infections à *Clostridioides difficile*. La concentration en vancomycine dans les fèces est alors élevée, la posologie recommandée pour le traitement des infections à *C. difficile* étant de 125 mg x 4/jour (57). Par contre si la vancomycine est injectée par voie IV, elle est alors éliminée quasi exclusivement par voie urinaire. Les concentrations retrouvées au niveau des selles après injection IV sont très faibles (58). Le spectre d'action de la vancomycine est limité aux bactéries à Gram positif. Certaines bactéries anaérobies à Gram négatif comme les *Porphyromonas* peuvent apparaître sensibles à la vancomycine *in vitro* (59).

## 2.1.4. Résilience du microbiote

L'utilisation d'antibiotiques modifie la composition du microbiote digestif, à plus ou moins long terme. Globalement, le microbiote présente une résilience, avec une tendance à un retour à l'état initial après altération par une antibiothérapie. L'efficacité de cette résilience dépend en grande partie de la nature de l'antibiothérapie reçue.

Chez des volontaires humains ayant reçu de la ciprofloxacine (fluoroquinolone) pendant 5 jours, la composition du microbiote était altérée. La diversité chutait rapidement 3 jours après le début de l'antibiothérapie, mais remontait également rapidement 2 jours après la fin de l'antibiothérapie (60). La ciprofloxacine est réputée avoir peu d'effet sur les anaérobies par rapport à d'autres antibiotiques. Pourtant, pendant toute la période d'antibiothérapie par ciprofloxacine les *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* étaient très diminués. Dès l'arrêt de l'antibiothérapie, une restauration de l'abondance de ces taxons au niveau digestif était observée. À l'inverse, certains taxons moins abondants initialement n'étaient toujours pas restaurés 6 mois après, tels que *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila* et des espèces de *Roseburia* productrices de butyrate. Ces données sont en faveur d'une stabilisation vers un état altéré (perte de certains taxons) après une antibiothérapie par ciprofloxacine, malgré une restauration globale de la diversité.

Dans une autre étude s'intéressant à l'effet de la clindamycine, la diversité au sein du genre *Bacteroides* était diminuée après 7 jours de clindamycine, et cet effet persistait même 2 ans après l'arrêt du traitement (61). Cependant cette étude utilisait des techniques de rep-PCR pour mettre en évidence une diminution de la diversité clonale, il ne s'agissait donc pas d'analyse métagénomique.

Plus récemment l'effet d'une antibiothérapie à large spectre (méropénème, gentamicine et vancomycine administrés pendant 4 jours) a été analysé par métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S (4). Immédiatement après le début de l'antibiothérapie, les *Bifidobacterium* et les espèces productrices de butyrate diminuaient, ce qui était compensé par une expansion des *Enterobacteriaceae*. Un mois et demi après l'arrêt de l'antibiothérapie, la composition du microbiote digestif était



quasiment revenue à l'état de base. Une perte complète de 9 taxons était toutefois observée, comprenant différentes espèces de *Bifidobacterium*, *Coprococcus*, *Eubacterium* et *Methanobacter*. Certains de ces taxons sont impliqués dans la production de butyrate ou de méthane.

Après administration de vancomycine *per os* pendant 14 jours chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, le microbiote digestif était modifié de façon majeure à court terme (62). Tous les patients inclus dans l'étude avaient reçu du méthotrexate (dans le groupe vancomycine et dans le groupe contrôle). Le méthotrexate ne modifiait pas le microbiote dans cette étude d'après les résultats du groupe contrôle. Après 2 semaines de vancomycine *per os* le phylum *Bacteroidetes* était effondré (genres *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Barnesiella*), ce qui était en partie compensé par une expansion des *Proteobacteria* (*Enterobacteriaceae*). Pour les *Firmicutes*, cela dépendait des genres bactériens : certains étaient augmentés (*Lactobacillus*) mais d'autres étaient diminués (*Clostridium*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*). Par contre, 22 semaines après l'arrêt de la vancomycine, le microbiote digestif était quasiment revenu à l'état de base à l'exception de deux OTUs, dont la nature n'était pas précisée dans l'article.

Dans l'étude MORDOR, de l'azithromycine était distribuée en masse tous les 6 mois chez des enfants du Niger dans le but de diminuer la mortalité infantile (63). Des prélèvements de selles ont été réalisés chez ces enfants ayant reçu soit de l'azithromycine, soit un placebo. Deux ans après le traitement par azithromycine, les modifications de la composition du microbiote étaient assez mineures, à l'exception d'une diminution de l'abondance de *Campylobacter upsaliensis* par rapport au groupe contrôle. La diversité était inférieure dans le groupe azithromycine mais cette différence n'était pas significative ( $p = 0,08$ ). Il s'agissait de la gamma-diversité (marqueur de la richesse du microbiote digestif des enfants au niveau d'un village), et non pas de l'alpha-diversité. La résistance aux macrolides était sélectionnée par l'administration d'azithromycine : deux ans après le début de l'étude, la prévalence de gènes de résistance aux macrolides était de 2,7 % dans le groupe placebo contre 16,7 % dans le groupe azithromycine.

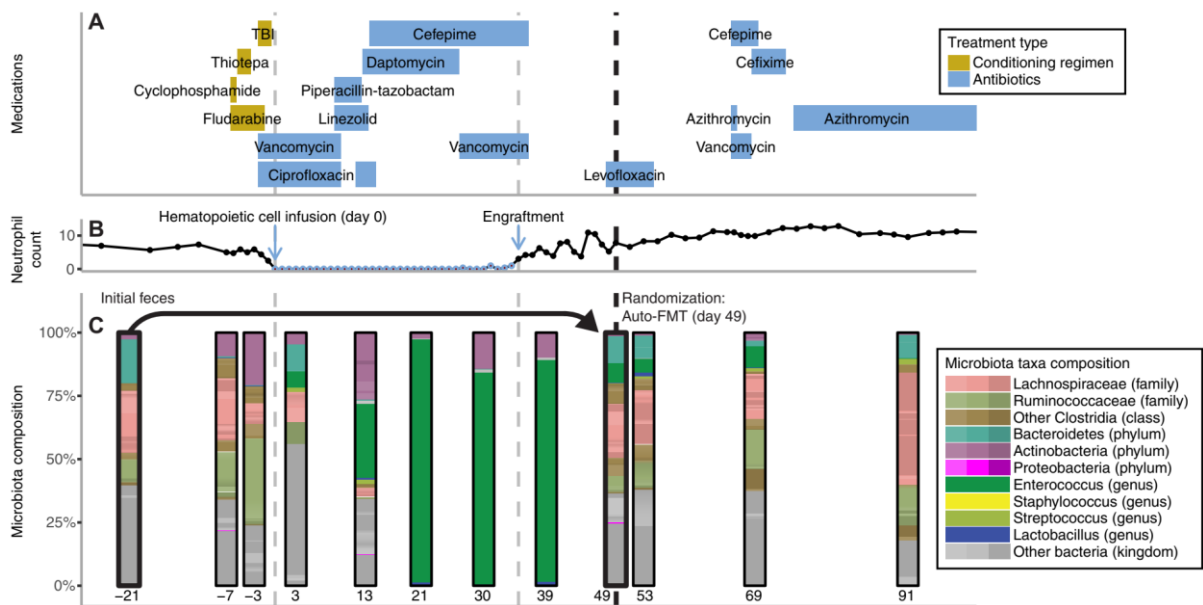
En essayant d'expliquer la résilience du microbiote post-antibiothérapie (retour à l'état initial) par un modèle bayésien, des résultats différents étaient obtenus selon

l'antibiotique utilisé (64). Une dizaine d'individus par groupe étaient suivis pendant un an après avoir reçu soit de l'amoxicilline, de la minocycline, de la clindamycine ou de la ciprofloxacine. Des prélèvements de selles étaient analysés avant antibiothérapie, immédiatement après antibiothérapie, 1 mois, 2 mois, 4 mois et 12 mois après antibiothérapie. Après une antibiothérapie par amoxicilline ou par minocycline, le microbiote digestif avait tendance à retourner à l'état de base dans le mois suivant. Par contre, après une antibiothérapie par clindamycine ou ciprofloxacine, le modèle le plus adapté était un modèle de stabilisation vers un état altéré.

En plus de la nature de l'antibiothérapie, la durée de l'antibiothérapie semble liée à la capacité du microbiote à revenir à son état de base. Chez des nouveau-nés ayant été exposés à des antibiotiques, chaque jour supplémentaire d'antibiothérapie reçue était associé à une richesse en anaérobies diminuée 7 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie (risque relatif = 0,84 [IC 95 % = 0,73 – 0,95]) et à une richesse en « bactéries productrices de butyrate » diminuée (risque relatif = 0,82 [IC 95 % = 0,67 – 0,97]) (65). Leur définition des bactéries productrices de butyrate est très critiquable, car elle incluait les *Bacteroidaceae*. Les bactéries productrices de butyrate appartiennent en fait quasi exclusivement aux Firmicutes (*Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*), et à de rares espèces de *Bacteroidetes* (certaines espèces de *Porphyromonadaceae* et de *Rikenellaceae*) (66, 67). Les *Bacteroidaceae* sont très fréquemment retrouvées au niveau digestif et ne produisent pas de butyrate, ce qui rend les résultats de cette étude difficilement interprétables. Cependant si on s'intéresse uniquement à la richesse diminuée en bactéries anaérobies, chaque jour d'antibiothérapie supplémentaire diminue la richesse en anaérobies de 16 % à 7 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie. Il s'agit d'un effet majeur, il est rare d'obtenir des risques relatifs si bas lorsque l'unité statistique est une seule journée de traitement.

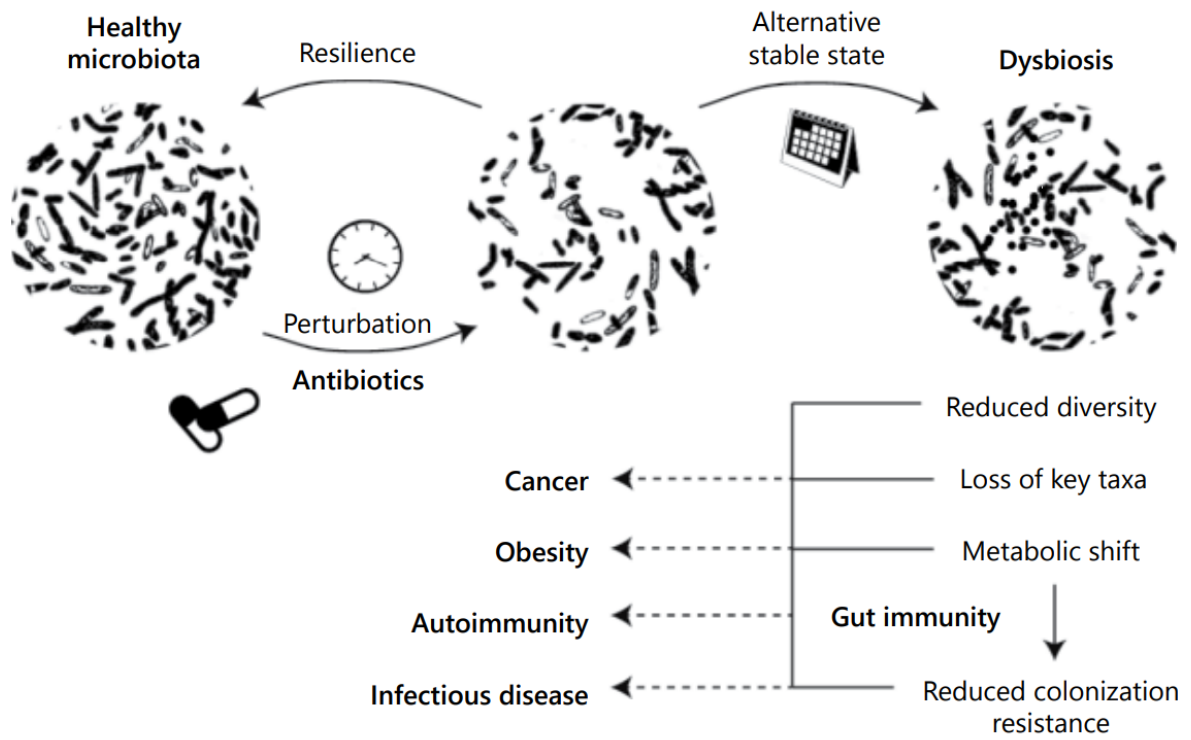
L'effet d'une antibiothérapie à large spectre sur la composition du microbiote digestif a été le mieux étudié chez les patients bénéficiant d'une allogreffe de cellules souches, notamment grâce aux travaux de Pamer. Ces patients reçoivent plusieurs lignes d'antibiothérapie à large spectre, présentant une activité anti-anaérobie. La Figure 17 montre la complexité des antibiothérapies administrés chez ces patients, et leur effet sur le microbiote (68). En règle générale, une antibiothérapie à large spectre a tendance à

sélectionner les bactéries appartenant au phylum *Proteobacteria* (dont les entérobactéries) ainsi que le genre *Enterococcus*, de par leur résistance fréquente à de nombreux antibiotiques.



**Figure 17. Effet de multiples antibiothérapies à large spectre chez un patient bénéficiant d'une allogreffe de cellules souches, d'après Taur et coll. (68). Ce patient a bénéficié d'une auto-transplantation de microbiote fécal à J49.**

Au final, le microbiote digestif est résilient suite à l'administration de certains antibiotiques à spectre étroit comme l'amoxicilline. Par contre, en cas d'antibiothérapie à plus large spectre (clindamycine, ciprofloxacine, méropénème...), il semblerait que pour certains individus le microbiote revienne à l'état de base, mais que pour d'autres il se stabilise vers un état altéré (pouvant correspondre à un état de dysbiose) (Figure 18).

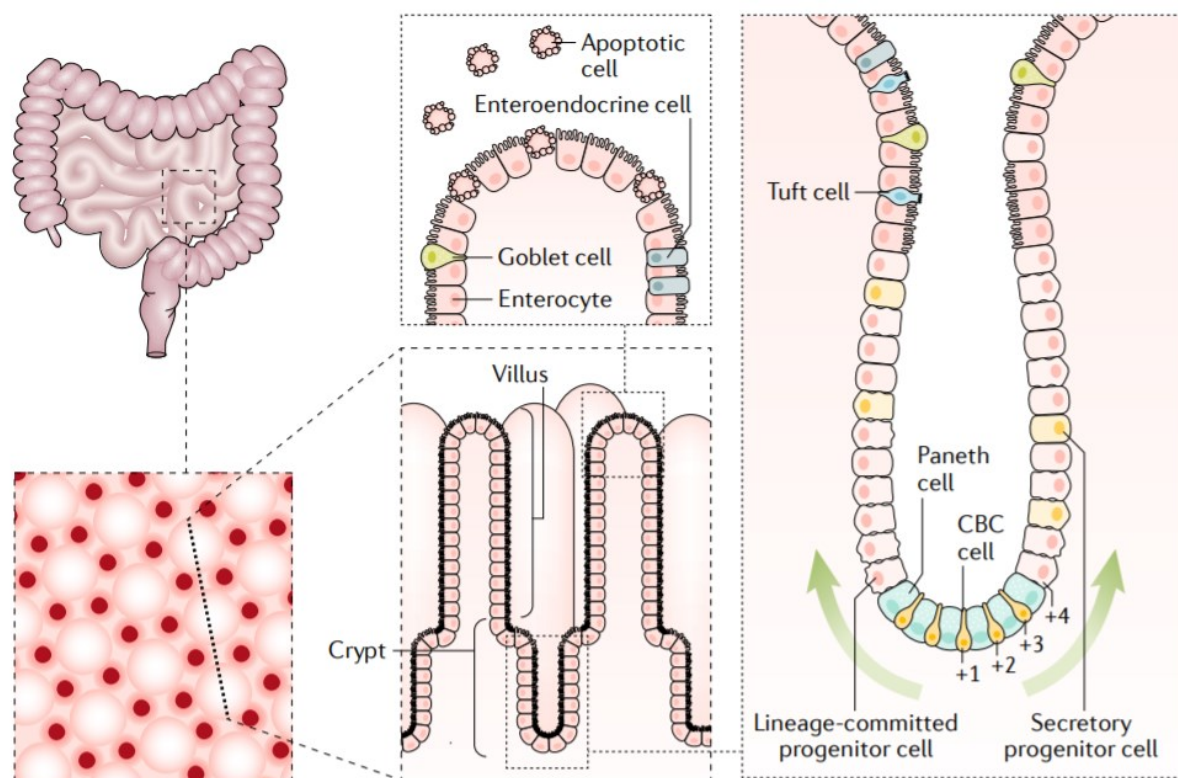


**Figure 18. Résilience du microbiote suite à une antibiothérapie, d'après Lange et coll. (69).**

## 2.2. Acteurs de la réponse immunitaire

### 2.2.1. Cellules épithéliales

Les cellules de l'épithélium intestinal jouent un rôle de barrière physique vis-à-vis des micro-organismes pathogènes. L'épithélium intestinal est un épithélium unistratifié capable de se renouveler très rapidement : chez l'homme les cellules de l'épithélium intestinal sont renouvelées tous les cinq jours (70). Pour améliorer l'absorption des nutriments, l'intestin grêle est replié pour former des cryptes et des villosités. Ces anfractuosités permettent de maximiser la surface d'échange de l'intestin grêle. Chaque villosité est entourée par des cryptes (Figure 19). La crypte génère un flux continu de nouvelles cellules qui vont se différencier et remonter en direction de la villosité. Les cellules de Paneth sont retrouvées au fond des cryptes.



**Figure 19. Structure de l'épithélium intestinal, d'après Gehart et coll. (71).**

Certaines cellules épithéliales intestinales sont plus particulièrement impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire. C'est le cas des cellules M, présentes au niveau des

plaques de Peyer de l'intestin grêle et des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Leur fonction principale est l'endocytose d'antigènes microbiens et leur transport vers des macrophages. Les macrophages vont ensuite migrer vers des ganglions lymphatiques et permettre d'initier une réponse immunitaire (72).

Les cellules caliciformes, ou aussi appelées cellules en gobelet, sont impliquées dans la synthèse du mucus. Elles sont présentes en grand nombre au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon, mais également au niveau des voies respiratoires supérieures. Le mucus ainsi produit permet de limiter la surface de contact entre les bactéries présentes dans le tube digestif et les cellules épithéliales intestinales (73). Les mucines sont des molécules de haut poids moléculaire, composées d'une partie protéique associée à de nombreuses chaînes latérales oligosaccharidiques (74). Dans un modèle de souris knockout pour le gène *muc2*, l'apparition spontanée de signes de colite était observée dès cinq semaines de vie (75). Ce modèle montre l'importance de conserver une zone tampon entre l'épithélium intestinal et les bactéries luminales grâce aux mucines, pour ne pas conduire à de l'inflammation non contrôlée. L'espace occupé par les mucines a été comparé à une « zone démilitarisée » (76).

Les cellules de Paneth vont également permettre de limiter les interactions entre les bactéries et les cellules épithéliales. Elles sont situées au fond des cryptes intestinales, principalement au niveau de l'intestin grêle. Elles sont également présentes (mais en plus faible quantité) au niveau du côlon proximal ainsi que du côlon transverse (77). Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens, tels que le lysozyme, la phospholipase A, ou des alpha-défensines (78). Les défensines présentent un spectre antimicrobien très large : antibactérien, antiviral et antifongique (79). Certaines mutations impliquant un stress au niveau du réticulum endoplasmique ont été associées à un mauvais fonctionnement des cellules de Paneth et au développement de maladies inflammatoires chroniques intestinales (80). La production de défensines par les cellules de Paneth influe sur la composition du microbiote bactérien et sur la résistance à certaines bactéries pathogènes. En utilisant un modèle de souris transgéniques HD-5 produisant la défensine humaine DEFA5, une disparition totale des *segmented filamentous bacteria* (SFB) était observée (78). Ces mêmes souris transgéniques exprimant HD-5 étaient également protégées vis-à-vis de *Salmonella* Typhimurium (81).

Les cellules tuft de l'épithélium intestinal ont été plus récemment décrites, et semblent plus particulièrement impliquées dans l'immunité antiparasitaire. Elles produisent de l'IL-25 et induisent une réponse de type Th2 (82). Elles ne semblent pas jouer un rôle important dans l'immunité antibactérienne, dans l'état actuel des connaissances.

### **2.2.2. Cellules de l'immunité innée**

Les cellules immunitaires présentes au niveau intestinal sont localisées dans différents compartiments : au niveau des cellules épithéliales, au niveau de la lamina propria, ou dans des structures organisées telles que les plaques de Peyer.

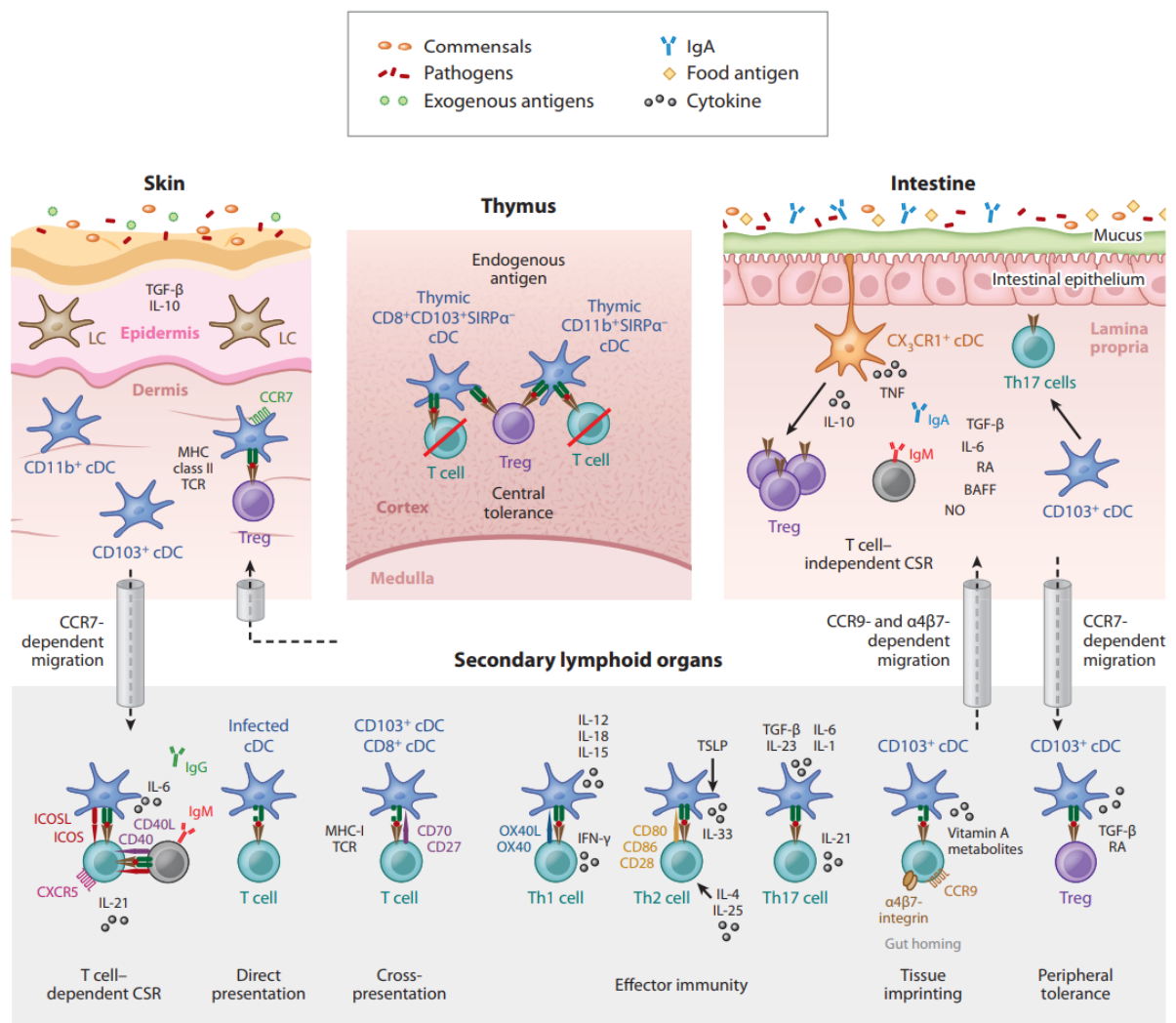
Les polynucléaires neutrophiles sont présents au niveau sanguin, et peuvent être rapidement recrutés en cas d'inflammation par la sécrétion de signaux tels que l'IL-8, l'IFN- $\gamma$  ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (83). Les neutrophiles luttent contre les micro-organismes par plusieurs méthodes : la phagocytose, la dégranulation, et par la production de pièges extracellulaires des neutrophiles (84). Les micro-organismes sont phagocytés lorsqu'ils sont recouverts d'opsonines (anticorps ou complément), puis vont être détruits par libération d'enzymes protéolytiques et de formes réactives de l'oxygène (explosion oxydative). La dégranulation consiste à relarguer plusieurs types de molécules possédant une activité antibactérienne : myéloperoxydase, défensines, cathélicidines. Les pièges extracellulaires des neutrophiles correspondent au relargage d'ADN formant des structures en forme de toile, qui vont pouvoir piéger et tuer les bactéries extracellulaires. Le microbiote digestif joue un rôle important dans le développement des neutrophiles. Dans des modèles de rats *germ-free*, les neutrophiles présentaient de moins bonnes capacités de phagocytose et généraient moins d'oxyde nitrique, par rapport aux rats contrôles *specific-pathogen-free* (85). Le nombre total de neutrophiles était également moins important chez les rats *germ-free*.

Les cellules phagocytaires mononucléées comprennent les macrophages et les cellules dendritiques. Leur rôle principal est de détecter des micro-organismes et de déclencher le relargage de cytokines à visée immunomodulatrice.

Les macrophages peuvent être retrouvés au niveau de l'épithélium intestinal, de la *lamina propria* ou des plaques de Peyer. Ce sont principalement des cellules résidentes qui ne quittent pas l'intestin, contrairement aux polynucléaires neutrophiles qui circulent au niveau sanguin. Les macrophages servent d'effecteurs de la réponse immunitaire innée. Ils sont idéalement situés pour pouvoir rapidement phagocyter les micro-organismes qui envahissent l'épithélium intestinal. Ils contribuent à une relation symbiotique avec le microbiote digestif (86). Les acides gras à courte chaîne produits par certaines familles bactériennes ont la capacité de limiter la production de cytokines proinflammatoires par les macrophages. En effet, le butyrate permet d'inhiber les histone-désacétylases des macrophages de la *lamina propria*, diminuant ainsi la synthèse de médiateurs proinflammatoires tels que l'oxyde nitrique, l'IL-6 et l'IL-12 (87). Ce mécanisme permet d'expliquer la tolérance observée vis-à-vis des bactéries commensales, et suggère que des métabolites produits par des bactéries ont un rôle majeur sur la réponse immunitaire locale.

Les cellules dendritiques possèdent des capacités de phagocytose similaires aux macrophages. Elles présentent toutefois la particularité de pouvoir migrer vers les organes lymphoïdes et de présenter l'antigène phagocyté aux lymphocytes T naïfs. Elles servent ainsi de relai entre l'immunité innée et adaptative (Figure 20) (88). Les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> sont impliquées dans l'induction de plasmocytes producteurs d'IgA, ainsi que de lymphocytes T régulateurs (Treg) (89). Les cellules dendritiques intestinales sont impliquées dans la tolérance, par leur capacité à induire une différenciation des lymphocytes T naïfs en Treg Foxp3<sup>+</sup> (90).





**Figure 20. Les cellules dendritiques servent de relai entre immunité innée et adaptative, d'après Merad et coll. (88). DC : cellule dendritique, LC : cellules de Langerhans, Treg = lymphocyte T régulateur.**

Les cellules lymphoïdes innées représentent la partie lymphoïde du système immunitaire inné. Elles peuvent être classées en cellules immunitaires cytotoxiques et non cytotoxiques.

Les cellules lymphoïdes innées cytotoxiques comprennent essentiellement les cellules NK (*Natural Killer*). Contrairement aux lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, les cellules NK appartiennent bien à l'immunité innée en raison de leurs récepteurs invariants. Elles sont capables de tuer des cellules tumorales ou infectées par des micro-organismes, de manière indépendante d'un antigène. Elles participent à la réponse vis-à-vis de bactéries intracellulaires telles que *Listeria monocytogenes* par production de granules

cytotoxiques contenant de la granulysine (91). Le microbiote digestif joue un rôle majeur dans le *priming* des cellules NK. En effet, chez des souris *germ-free*, en l'absence de stimulation des cellules dendritiques et des macrophages par le microbiote digestif, le *priming* des cellules NK ainsi que la réponse antivirale étaient sévèrement compromis (92). Ces données suggèrent un rôle du microbiote digestif non seulement dans le développement du système immunitaire local au niveau des muqueuses, mais également au niveau de l'immunité systémique par l'intermédiaire des cellules dendritiques.

Les cellules lymphoïdes innées non cytotoxiques sont considérées comme des cellules *helper-like* par analogie aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Elles participent au maintien de l'homéostasie locale par la sécrétion de différentes cytokines (dont l'IL-22), pouvant induire la production de peptides antimicrobiens et ainsi réguler la composition du microbiote digestif. Cette interaction est bidirectionnelle, le microbiote digestif ayant lui-même des effets sur les cellules lymphoïdes innées non cytotoxiques. Ainsi, dans un modèle de souris traitées par antibiotiques (ampicilline, vancomycine, et colistine), une diminution de la concentration en butyrate était observée au niveau de l'iléon terminal. Cette diminution du butyrate était associée à une diminution des cellules lymphoïdes innées non cytotoxiques NKp46<sup>+</sup>, engendrant elle-même une diminution des cellules T régulatrices ainsi qu'une augmentation des cellules T spécifiques d'un antigène (93).

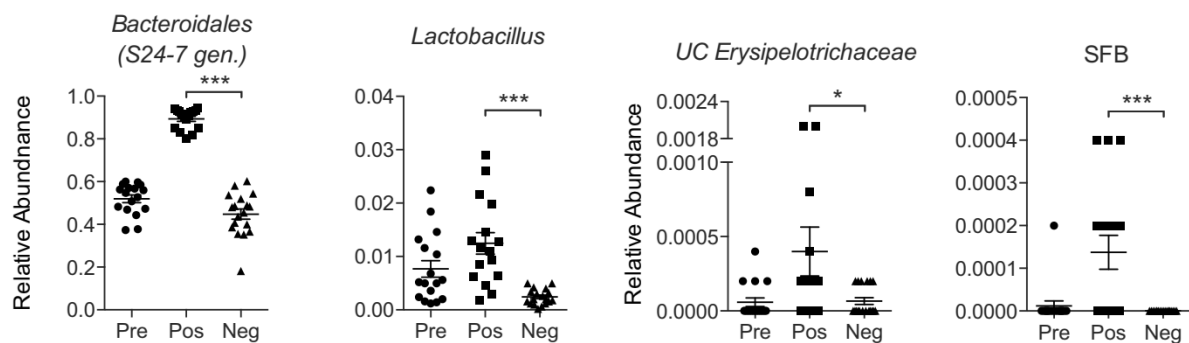
### **2.2.3. Lymphocytes B**

En plus du mucus, la muqueuse intestinale est également protégée par les immunoglobulines A produites par les plasmocytes. Au niveau digestif, les plasmocytes sont majoritairement retrouvés au niveau de la *lamina propria*. Les plasmocytes intestinaux constituent 80 % de l'ensemble des plasmocytes du corps, et produisent plusieurs grammes d'anticorps par jour (94). Des différences importantes entre le système immunitaire murin et humain sont retrouvées quant à la production d'IgA. Dans le système immunitaire murin, les IgA sont principalement polymériques. Chez les humains, deux isotypes d'IgA existent, IgA1 et IgA2.

Les IgA participent au maintien d'une homéostasie locale en limitant les interactions entre le microbiote et les cellules de l'hôte. La plupart des bactéries commensales

résidant dans l'intestin grêle seront recouvertes d'IgA, et engendrent ainsi une réponse immunitaire indépendante des lymphocytes T. Au total, 90 % des bactéries recouvertes d'IgA dans le côlon étaient également présentes à une abondance relative supérieure à 1 % dans l'intestin grêle (95). Dans cette étude, la seule exception notable était le taxon *Muribaculaceae* (une famille bactérienne appartenant aux *Bacteroidetes*) qui était retrouvé à la fois dans la fraction recouverte et non recouverte d'IgA dans le côlon, alors qu'elle était également présente dans le duodénum.

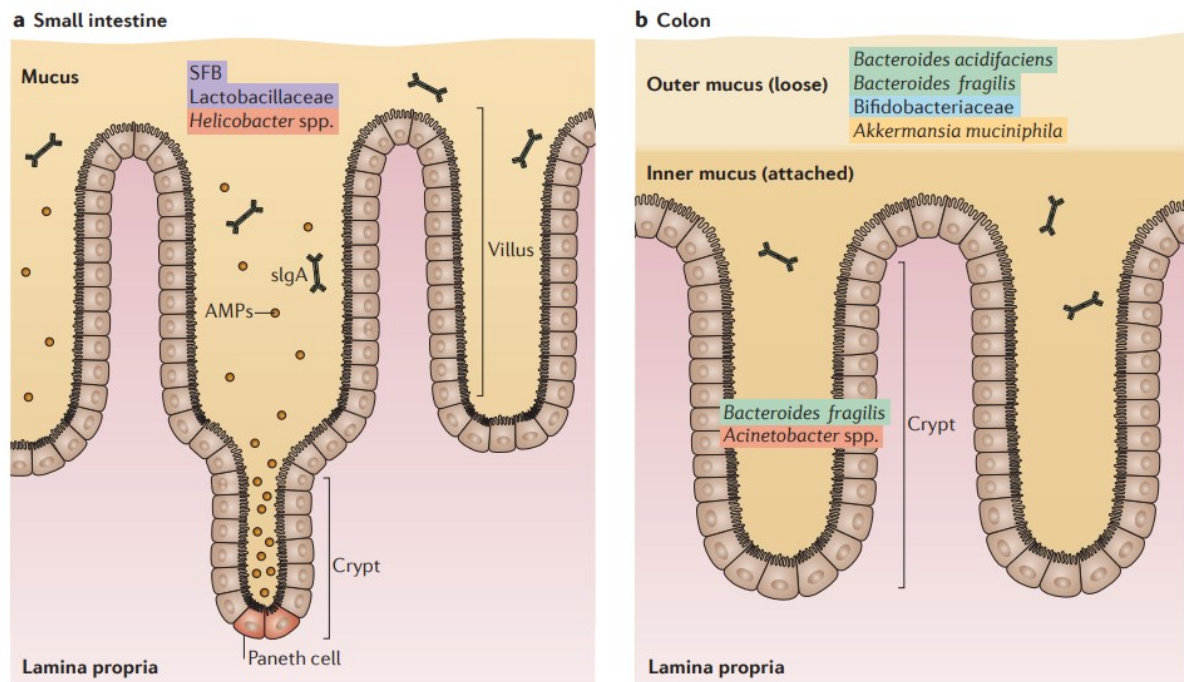
Une autre étude retrouvait quatre taxons surreprésentés dans la fraction recouverte par les IgA : la famille *Muribaculaceae* (anciennement appelée S24-7), le genre *Lactobacillus*, une espèce du genre *Erysipelotrichaceae* et les SFB (Figure 21) (96).



**Figure 21. Abondance relative du microbiote fécal de quatre taxons bactériens significativement enrichis dans la fraction recouverte d'IgA**, d'après Palm et coll. (96). La famille S24-7 est désormais appelée *Muribaculaceae*. Légende : Pre = avant triage par cytométrie de flux, Pos = Fraction recouverte d'IgA, Neg = fraction non recouverte d'IgA.

Actuellement aucun mécanisme n'a été clairement identifié permettant d'expliquer pourquoi certaines bactéries sont recouvertes d'IgA alors que d'autres non. Certains auteurs ont suggéré que les IgA recouvraient plus spécifiquement des bactéries commensales proinflammatoires capables d'engendrer une dysbiose ou de favoriser une colite (96). Il est en tout cas probable que la localisation anatomique des bactéries joue un rôle (présence au niveau de l'intestin grêle), comme l'ont montré Bunker et coll. (95). Il est également possible que des bactéries occupant une niche en contact étroit avec la muqueuse intestinale puissent plus facilement induire une réponse immunitaire, par rapport à des bactéries retrouvées dans la lumière intestinale. En effet, les

*Lactobacillaceae* et les SFB sont retrouvés préférentiellement au niveau des cryptes intestinales grâce à leurs capacités d'adhésion, et sont recouverts d'IgA (Figure 22) (97).



**Figure 22. Taxons bactériens principalement retrouvés à proximité de la muqueuse de l'intestin grêle et du côlon, d'après Donaldson et coll. (97).**

## 2.2.4. Lymphocytes T

Lors d'une infection touchant la muqueuse intestinale, les lymphocytes T spécifiques de l'antigène reconnu vont proliférer suite à l'action des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques et macrophages). Ces cellules de l'immunité innée produisent différentes cytokines, qui vont permettre la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en différentes cellules effectrices, par l'intermédiaire des réponses Th1, Th2 et Th17. La réponse Th2 est principalement induite dans le cas d'infections parasitaires (helminthes) et ne sera pas développée ici.

La réponse Th1 est efficace contre les micro-organismes intracellulaires, et fait intervenir les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> suite à la production d'IL-12 et par les cellules dendritiques (98). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> vont ensuite produire de l'IFN- $\gamma$  et du TNF. L'IFN- $\gamma$  promeut également lui-même la réponse Th1. Cette réponse Th1 est utile pour lutter contre des bactéries intracellulaires capables de survivre et de se répliquer

dans les macrophages. En effet, lors de la persistance de ces bactéries dans les cellules de l'hôte, les protéines bactériennes sont présentées à la surface de la cellule et vont induire une activation des lymphocytes T. La production d'IFN- $\gamma$  et de TNF par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> va activer les cellules dendritiques et les macrophages pour tuer les bactéries présentes dans le compartiment intracellulaire.

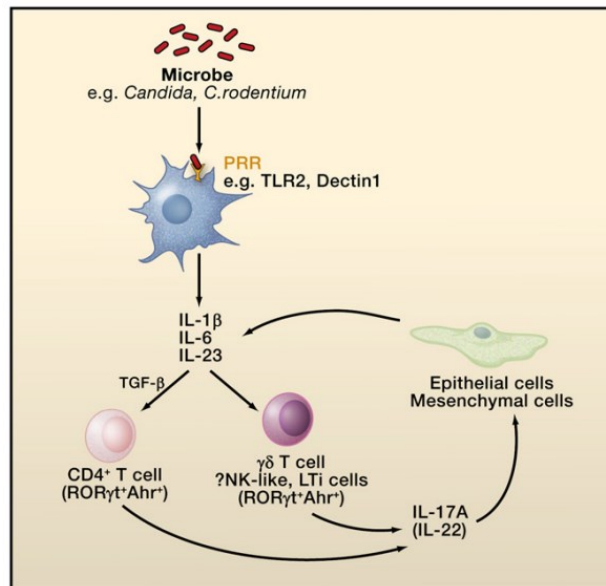
La réponse Th17 est enclenchée pour lutter contre des bactéries ou des champignons extracellulaires. Elle fait intervenir des lymphocytes qui expriment le facteur ROR- $\gamma$ <sup>+</sup> et produisent de l'IL-17, parfois en combinaison avec l'IL-22 (98). Les lymphocytes ROR- $\gamma$ <sup>+</sup> comprennent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17, et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Th17. Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée (ILC) de groupe 3 expriment également le facteur transcriptionnel ROR- $\gamma$ .

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 sont des lymphocytes *helper* très abondants au niveau des muqueuses, où ils aident à maintenir une homéostasie entre les cellules de l'hôte et le microbiote (99). Ces cellules produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 qui sont impliquées dans la production de peptides antimicrobiens et le remodelage des tissus. Le facteur principal permettant la différenciation en lymphocytes T Th17 est STAT3. L'activation de STAT3 est faite en réponse à la production des cytokines IL1- $\beta$ , IL-6, et IL-23 par les cellules de l'immunité innée. La délétion de STAT3 dans un modèle murin abrogeait la différenciation Th17, tandis que la surexpression de STAT3 par un rétrovirus engendrait une induction de la production d'IL-17 (100). Chez l'homme, le syndrome hyper-IgE autosomique dominant est associé à des mutations hétérozygotes de STAT3 dans 70 % des cas. Ce syndrome est caractérisé par des infections récurrentes (abcès cutanés, infections respiratoires, candidose cutanéomuqueuse) (101). Dans un modèle murin de pneumopathie à *Klebsiella pneumoniae*, il a été montré que le récepteur IL-17R était indispensable pour contrôler l'infection pulmonaire (102). Un autre article a permis de mettre en évidence le rôle de l'IL-23, permettant la production d'IL-17, dans la défense de l'hôte suite à une pneumopathie à *K. pneumoniae* (103).

La différenciation en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Th17 est influencée par la composition du microbiote digestif et par la présence de cellules immunitaires innées qui amplifient la réponse Th17 (99). La colonisation par des *Segmented Filamentous Bacteria* (SFB), un

commensal qui adhère fortement aux cellules épithéliales au niveau de l'iléon terminal, était associée à la présence de cellules Th17 au niveau de la *lamina propria* intestinale. Chez les souris *germ-free*, ces cellules Th17 étaient absentes. En cas de colonisation par des SFB, on observait une augmentation des cellules Th17 ainsi qu'une résistance accrue à l'infection à *Citrobacter rodentium* (32). Le polysaccharide A (PSA), un métabolite produit par la plupart des souches de *Bacteroides fragilis* présentes chez l'homme, semble diminuer les niveaux d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$ . En effet, dans un modèle murin de colite induite par *Helicobacter hepaticus*, le transfert de *B. fragilis* capable de produire du PSA protégeait les souris de cette colite (104). Par contre, le mutant *B. fragilis*  $\Delta$ PSA n'était pas protecteur. L'administration de PSA purifié diminuait la production d'IL-17 et permettait de diminuer l'inflammation et les signes de colite.

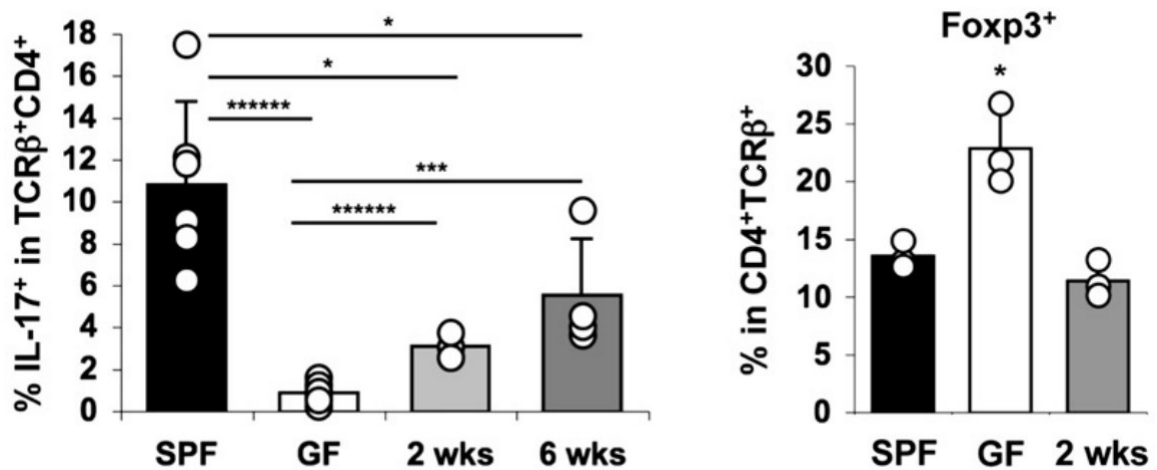
Bien que la réponse Th17 soit utile pour lutter contre les bactéries pathogènes extracellulaires, elle peut aboutir à une inflammation délétère du fait d'une boucle d'amplification positive lorsqu'elle n'est pas contrôlée (Figure 23). En condition d'homéostasie, la réponse Th17 est régulée par la production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) ainsi que par les lymphocytes T régulateurs (Treg) (105).



**Figure 23. Rôle des cellules immunitaires innées dans l'initiation de l'amplification de la réponse Th17, d'après Littmann et coll. (99).**

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont capables de limiter l'inflammation et l'auto-immunité. Ils expriment notamment le facteur transcriptionnel *Foxp3* ainsi que CD25 et sont indispensables au maintien de l'homéostasie. La perte de fonction du gène *Foxp3* dans un modèle murin était associée au développement de lésions inflammatoires. Chez l'homme, un syndrome de dérèglement immunitaire-polyendocrinopathie-entéropathie lié à l'X (IPEX) a été décrit, causé par des mutations dans le gène *Foxp3*. Ces patients présentent des endocrinopathies auto-immunes, des infections locales ou systémiques, ainsi qu'une entéropathie auto-immune sévère (106). La différenciation en Treg se fait principalement au niveau de la muqueuse, notamment grâce aux cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> capables de produire de l'acide rétinoïque favorisant la différenciation Treg. Il existe donc un équilibre délicat entre Treg et lymphocytes T Th17 au niveau de la muqueuse intestinale, en partie lié à la composition du microbiote intestinal. En effet, la diminution en Th17 était associée à une augmentation des Treg (Figure 24) (107). Dans cette étude, l'équilibre Treg/Th17 était sous-tendu par la composition du microbiote intestinal. Suite à l'administration de 4 antibiotiques (ampicilline, vancomycine, métronidazole et néomycine), le nombre de cellules intestinales Th17 était effondré

(diminution de plus de 80 %), ce qui s'accompagnait d'une augmentation du nombre de lymphocytes Treg Foxp3<sup>+</sup>.



**Figure 24. Différenciation Th17 (IL-17<sup>+</sup>) ou Treg (Foxp3<sup>+</sup>) au niveau de la lamina propria intestinale**, d'après Ivanov et coll. (107). Légende : SPF = *specific pathogen free*, GF = Souris *germ-free*, 2 wks et 6 wks = Souris *germ-free* ayant bénéficié d'une transplantation de microbiote fécal à partir des selles de souris SPF aux temps indiqués.

Si l'absence de certaines bactéries est associée à la différenciation en Treg, la présence de bactéries appartenant à la classe *Clostridia* a été à l'inverse associée à l'accumulation de Treg. La colonisation digestive de souris par un cocktail de 46 souches apparentées aux *Clostridium* appartenant aux clusters IV (*Faecalibacterium prausnitzii*, *C. viride*) et XIVa (*C. boltei*), dans un environnement riche en TGF-β (la lamina propria) favorisait la différenciation Treg, ainsi qu'une résistance à la colite provoquée par le dextran sodium sulfate (DSS) (108). Dans un autre modèle murin recevant un cocktail de 17 bactéries apparentées aux *Clostridium* (clusters IV, XIVa et XVIII) les Treg étaient également augmentés, ce qui était associé à une diminution des signes de colite induite par l'acide sulfonique trinitrobenzoïque (TNBS) (109).



## 2.2.5. Métabolites digestifs

### Tryptophane

Le tryptophane est un métabolite impliqué dans le dialogue microbiote – système immunitaire de l’hôte. Le tryptophane peut être métabolisé de façon endogène en kynurénine, sérotonine et mélatonine. Il peut également être métabolisé par certaines bactéries en indole, scatol et tryptamine. Le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) permet la régulation de l’immunité intestinale par l’intermédiaire des métabolites du tryptophane, qui peuvent servir de ligands à AhR (110). AhR est exprimé par plusieurs types de cellules immunitaires, principalement par les cellules lymphoïdes innées de groupe 3 ROR- $\gamma$ <sup>+</sup> (111).

Le métabolisme endogène du tryptophane est important, car on estime que 93 % du tryptophane absorbé est dégradé en kynurénine, 1 à 2 % en sérotonine et mélatonine. Le microbiote digestif utilise 4 à 6 % du tryptophane ingéré pour le métaboliser selon différentes voies en fonction des espèces bactériennes. Comme différentes bactéries vont posséder différentes enzymes catalytiques, le métabolisme bactérien du tryptophane est plus complexe à étudier, car les bactéries peuvent coopérer pour générer différents métabolites. Les genres bactériens intervenant dans le métabolisme du tryptophane sont repris de façon simplifiée dans le Tableau 2.

Le tryptophane est principalement dégradé par les bactéries par la voie de l’indole. De nombreux catabolites du tryptophane d’origine bactérienne sont des ligands d’AhR, comme la tryptamine, le scatol, l’indole acide acétique, l’indole acide acrylique, l’indole-3-aldéhyde et l’indole acide lactique (112).

La composition du microbiote digestif peut également avoir un effet sur les voies de la sérotonine et des kynurénines. En effet, la production de SCFA (acides gras à courtes chaînes) comme l’acétate ou le butyrate accroît l’expression de *Tph1* dans les cellules entéro-endocrines de l’épithélium intestinal (113). La tryptophane hydroxylase (Tph) est l’enzyme permettant l’entrée dans la voie de la sérotonine, en produisant du 5-OH Tryptophane à partir du tryptophane. À l’inverse, l’expression de l’indolamine 2,3-

dioxygenase-1 (IDO-1) est régulée négativement par les SCFA (butyrate) (114). L'IDO-1 est l'enzyme permettant l'entrée dans la voie des kynurénines, en produisant de la kynurénine à partir du tryptophane.

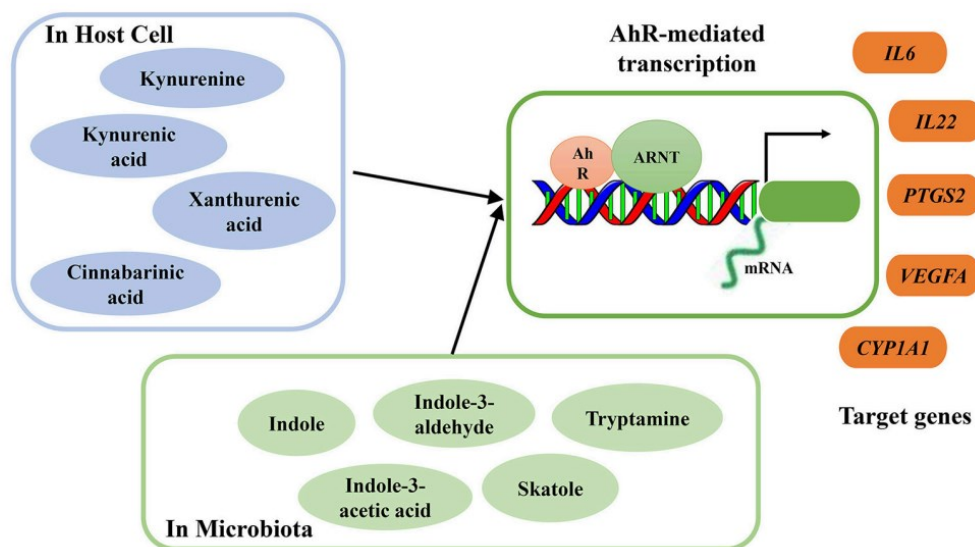
**Tableau 2. Genres bactériens intervenant dans le métabolisme du tryptophane au niveau digestif**, d'après Roager et coll. (112) et complété avec les références (113) et (114).

Voie Métabolique	Métabolite	Bactéries		
		Anaérobies		Aérobies
		Gram -	Gram +	
<b>Sérotonine</b>	Sérotonine	↑ par Bactéries productrices de SCFA (Tph1)		
<b>Tryptophane</b>	Tryptamine	<i>Clostridium</i> <i>Ruminococcus</i>		
	Indole Acide Lactique	<i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i>	<i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i>	<i>Escherichia</i> <i>Lactobacillus</i>
	Indole Acide Acétique	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Escherichia</i>
	Indole	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Escherichia</i>
<b>Kynurénine</b>	Kynurénine	↓ par Bactéries productrices de SCFA (IDO-1)		

Le principal effet des métabolites du tryptophane est médié par le récepteur AhR. AhR est un régulateur important de l'inflammation et de l'immunité au niveau digestif. Les souris délétées pour AhR présentaient une colite au DSS plus sévère et une mortalité plus importante (115). Les souris déficientes pour AhR étaient également plus sensibles à l'infection à *Citrobacter rodentium* (116). En l'absence d'AhR, les cellules lymphoïdes innées produisaient moins d'IL-22. L'IL-22 peut induire le relargage de peptides antimicrobiens par l'épithélium digestif, ce qui permet de modifier la composition du microbiote ou d'agir sur des micro-organismes pathogènes (117). Un deuxième mécanisme possible est la régulation du développement des cellules lymphoïdes innées et des lymphocytes intraépithéliaux (118). Plusieurs métabolites bactériens du

tryptophane permettent de protéger la muqueuse digestive de l'inflammation (119), en agissant sur AhR (Figure 25).

Récemment, il a été montré que la sérotonine pouvait également activer AhR au niveau des cellules épithéliales intestinales (120). L'accumulation intracellulaire de sérotonine par le transporteur de la sérotonine SERT induisait l'expression de *CYP1A1* (cytochrome P450) par l'intermédiaire d'AhR dans les cellules épithéliales intestinales.



**Figure 25. Métabolites du tryptophane d'origine endogène ou bactérienne pouvant servir de ligands à AhR, d'après Gao et coll. (110).**

La production de ligands d'AhR est sous-tendue par plusieurs facteurs : l'alimentation, la composition du microbiote et l'activité enzymatique endogène (118). Par exemple, les *Lactobacillus* peuvent produire de l'indole-3-aldéhyde à partir du tryptophane, qui peut agir ensuite sur les cellules lymphoïdes innées (117). Dans un modèle de colite au DSS, la supplémentation en tryptophane permettait de diminuer la sévérité des symptômes de colite, par un mécanisme dépendant d'AhR (121).

### Acides gras à courtes chaînes (SCFA)

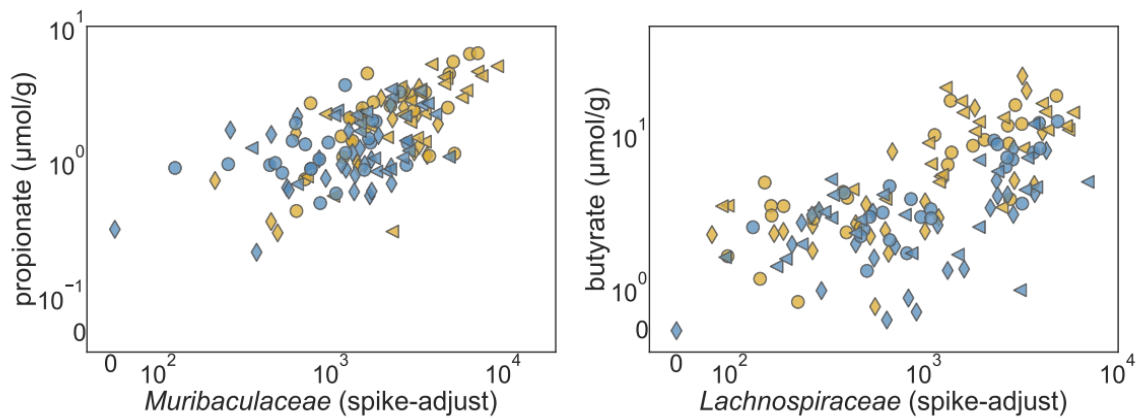
De nombreuses bactéries anaérobies peuvent convertir des glucides provenant de l'alimentation en acides organiques (lactate), ainsi qu'en acides gras à courtes chaînes (SCFA) (acétate, propionate, butyrate). Les fibres alimentaires peuvent être fermentées

dans le cæcum et le côlon par certaines bactéries pour produire des SCFA (122). Les bactéries appartenant au phylum *Bacteroidetes* produisent plutôt de l'acétate et du propionate, tandis que les bactéries appartenant au phylum *Firmicutes* produisent plutôt du butyrate (123). Les bactéries capables de produire du butyrate font habituellement partie des *Lachnospiraceae* et des *Ruminococcaceae* (124). Chez l'homme, l'acétate représente 60 % des SCFA produits, le propionate 25 % et le butyrate 15 % (125). La concentration en SCFA va dépendre de la composition du microbiote, du temps de transit intestinal, de l'utilisation des SCFA par les cellules de l'hôte et de l'apport en fibres alimentaires (119).

Le butyrate représente la source d'énergie principale pour les colonocytes et sera ainsi rapidement absorbé, mais il peut également agir sur le système immunitaire. Le butyrate a un effet anti-inflammatoire en inhibant le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B (126), ce qui induit une diminution de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-12 et le TNF $\alpha$  (127). Des concentrations élevées en butyrate induisent la synthèse de mucines en agissant sur la méthylation des histones du promoteur de MUC2 (128). Ces deux effets combinés conduisent à une diminution de la translocation bactérienne (129). Dans un essai randomisé en double aveugle incluant 40 patients atteints de shigellose, le butyrate diminuait l'inflammation (130). Un autre effet du butyrate est la réduction de l'expression et de l'activité de PPAR- $\gamma$ , ce qui favorisait l'oxydation des graisses aux dépens de la lipogenèse et s'opposerait à l'obésité induite par une alimentation riche en lipides (131). Toutefois, de rares études ont suggéré un effet inverse des SCFA, pouvant représenter jusqu'à 10 % des apports énergétiques et ainsi participer au surpoids (125).

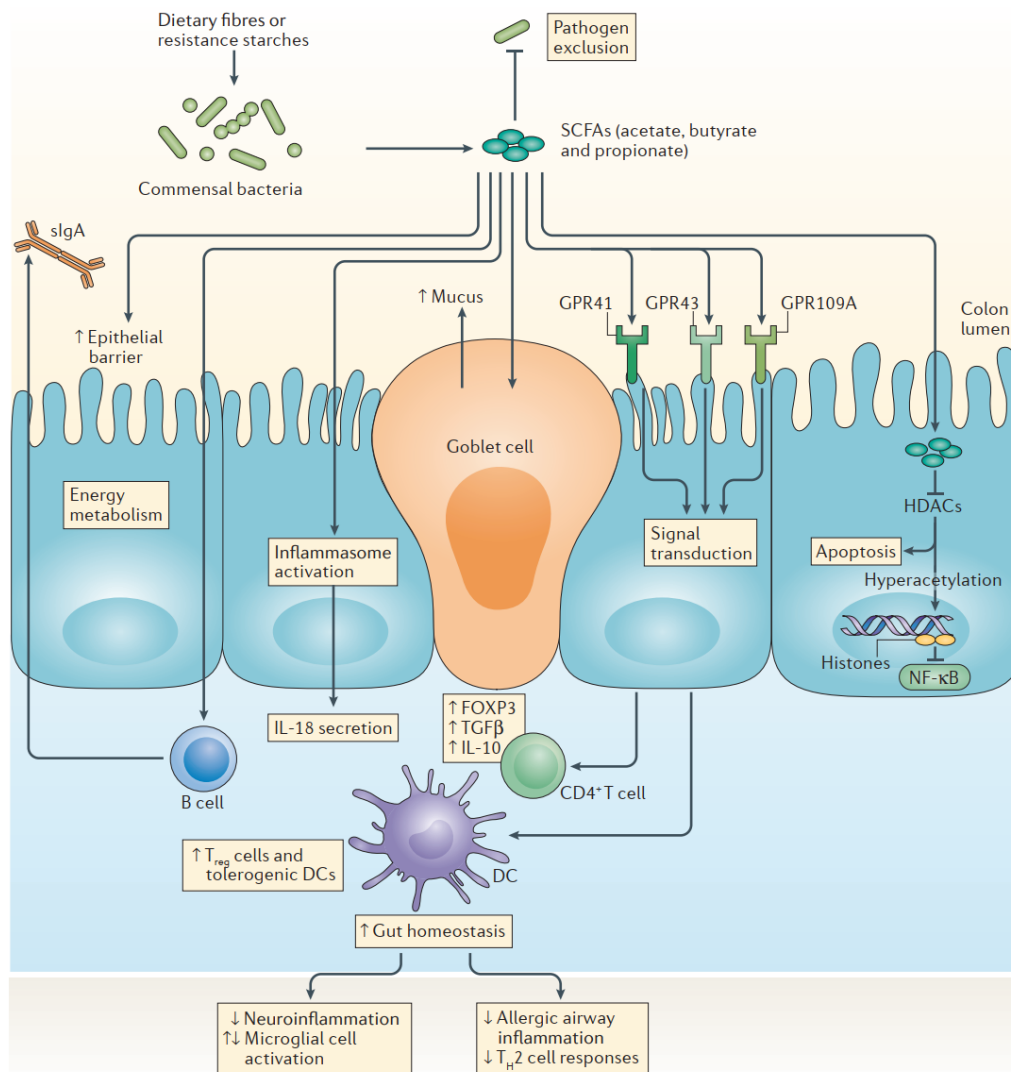
Le propionate est dérivé de la fermentation de fibres alimentaires de type fructanes, comprenant l'inuline (132). L'inuline est considérée comme un prébiotique, car elle peut stimuler la croissance de certaines espèces bactériennes, comme *Anaerostipes* et *Bifidobacterium*, et diminuer l'abondance de *Bilophila* (133). Le propionate inhibe directement la croissance de certaines bactéries entéro-pathogènes, comme *Salmonella Typhimurium* (1). L'administration de propionate permettait l'obtention d'une résistance à la colonisation par *S. Typhimurium* dans un modèle murin. L'administration de *Bacteroides* (producteur de propionate) permettait également d'améliorer la résistance à la colonisation par *S. Typhimurium* (1). Récemment, la famille

*Muribaculaceae* a été identifiée chez la souris comme fortement corrélée avec la production de propionate (134) (Figure 26).



**Figure 26. Corrélation entre abondance en *Muribaculaceae* et concentration en propionate, ainsi que *Lachnospiraceae* et butyrate, d'après Smith et coll. (134). Jaune = groupe de souris supplémentée en acarbose, bleu = alimentation standard.**

Le rôle des SCFA sur l'immunité et l'homéostasie intestinale est également décrit, surtout en favorisant la différenciation des lymphocytes en Treg. Dans un modèle de souris *germ-free*, la supplémentation en SCFA (acétate et/ou butyrate) permettait la restauration des populations Treg au niveau du côlon (135). Chez des souris possédant un microbiote digestif normal, la supplémentation en SCFA permettait également d'augmenter le nombre de lymphocytes Treg (135). Les effets des SCFA sur l'immunité et l'homéostasie intestinale sont récapitulés dans la Figure 27.



**Figure 27. Effet des SCFA (butyrate, propionate, acétate) sur l'immunité et l'homéostasie digestive, d'après Rooks et coll. (119).**

Des métabolites digestifs produits par le microbiote, parmi lesquels figurent les SCFA, peuvent inhiber directement la croissance de bactéries pathogènes, ou indirectement en agissant sur l'environnement et en le rendant moins favorable pour la bactérie pathogène (136).

Une diminution de la concentration digestive en SCFA est décrite comme favorable à l'implantation et à la croissance de *Salmonella Typhimurium*. Dans un modèle murin, un traitement par streptomycine engendrait une diminution des *Clostridium*, ce qui aboutissait à une diminution des concentrations en butyrate associée à une expansion de *Salmonella Typhimurium* (137). En effet, les cellules de l'épithélium colique oxydent le butyrate en CO<sub>2</sub> ce qui provoque une hypoxie de l'épithélium. Cependant, en absence de

butyrate, les cellules de l'épithélium colique fermentent le glucose en lactate pour produire de l'énergie, ce qui s'accompagne d'une tension en oxygène plus élevée dans l'épithélium. *Salmonella Typhimurium* est capable de croître préférentiellement dans ces conditions par l'intermédiaire de la cytochrome oxydase *bd-II* (137).

D'autres entérobactéries peuvent être également inhibées par les SCFA. Après injection de streptomycine, l'abondance de la classe *Clostridia* était réduite, principalement au niveau des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* qui contiennent d'importants producteurs de butyrate (138). Cette diminution de la concentration en butyrate retrouvée au niveau cœcal diminuait l'activité du récepteur PPAR- $\gamma$ , engendrant une augmentation de l'expression de *Nos2*, un gène codant pour la synthèse d'oxyde nitrique. L'augmentation de la concentration en nitrates dans la lumière colique favorisait ainsi l'expansion des *Enterobacteriaceae*, qui sont capables d'utiliser les nitrates pour leur croissance (138).

## **Polyamines**

Les polyamines sont des molécules polycationiques retrouvées dans la plupart des cellules (procaryotes et eucaryotes) et comprennent la putrescine, la cadavérine, la spermidine et la spermine (119). Certaines bactéries pathogènes dépendent des polyamines pour exprimer leur virulence (139). C'est le cas de *Shigella* qui ne produit pas de cadavérine contrairement à *Escherichia coli*, suite à des mutations dans le locus *cad*. En effet, la cadavérine protégeait la muqueuse colique des effets des entérotoxines ShET1/ShET2 (140). Pour *Shigella*, *cadA* est considéré comme un gène d'anti-virulence et sa délétion a été nécessaire pour l'évolution de cette bactérie en tant que pathogène.

Le tube digestif contient normalement de hauts niveaux de polyamines, provenant à la fois de la synthèse par le microbiote et par les cellules de l'hôte. L'administration d'arginine en combinaison avec une souche de *Bifidobacterium animalis* permettait d'augmenter la concentration en polyamines coliques, et de diminuer la production de TNF et d'IL-6 (141). Il est ainsi possible d'agir sur la concentration des polyamines en modifiant l'alimentation ou la composition du microbiote digestif.

## Polysaccharide A (PSA) et Glycosphingolipides

*Bacteroides fragilis* est une bactérie commensale du tube digestif présentant des propriétés immunomodulatrices par l'intermédiaire de la production du polysaccharide A (PSA) (142). La colonisation par *B. fragilis* de souris *germ-free* restaurait la balance Th1/Th2 en activant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cette restauration n'était pas observée en cas de colonisation par un mutant de *B. fragilis* déficient pour la production de PSA (143). *B. fragilis* est également capable d'agir sur les lymphocytes T *invariant natural killer* (iNKT) par la production de glycosphingolipides (144).

### 2.2.6. Ligands bactériens

Le système immunitaire inné reconnaît des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR). Ces récepteurs peuvent être exprimés à la fois par des cellules de l'immunité et par des cellules épithéliales.

Plusieurs types de PRR ont été décrits. Les principaux récepteurs à être activés par des PAMP bactériens sont les Toll-like récepteurs (TLR), et les NOD-like récepteurs (NLR). Les PAMP pouvant être reconnus sont divers, comprenant le lipopolysaccharide, des acides nucléiques spécifiques non présents chez l'hôte, ou des lipoprotéines. L'activation des PRR induit rapidement une réponse proinflammatoire.

La famille des TLR est la plus étudiée. Les TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 11 sont présents au niveau de la membrane et interagissent avec le milieu extérieur. Les TLR 3, 7, 8 et 9 sont situés dans des vésicules intracellulaires et interagissent avec des acides nucléiques viraux et bactériens. Les principaux TLR sont TLR4 qui interagit avec le lipopolysaccharide (constituant des Gram négatifs), TLR5 qui se lie à la flagelline et TLR9 qui se lie aux oligodéoxynucléotides CpG non méthylés (provenant fréquemment de l'ADN bactérien) (145). TLR4 active MyD88, ce qui, au final, va activer NF-κB.

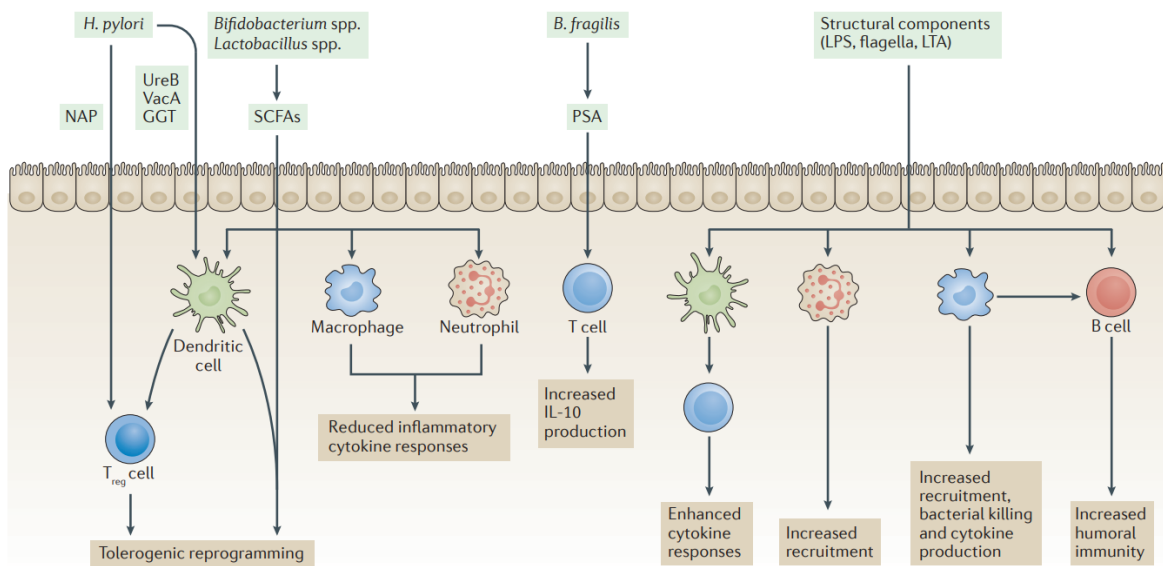
La famille des NLR est constituée de protéines cytosoliques permettant la détection de bactéries intracellulaires, et d'initier une réponse inflammatoire aboutissant à leur clairance. NOD1 et NOD2 reconnaissent le peptidoglycane ; NOD1 reconnaît en plus le



més-DAP (constituant des Gram négatifs), tandis que NOD2 reconnaît en plus le muramyl dipeptide (présent à la fois chez les Gram positifs et chez les Gram négatifs) (146). Après liaison à leur ligand, NOD1 et NOD2 vont activer NF- $\kappa$ B et la voie des MAP kinase.

## Conclusion

Les effets immunomodulateurs des métabolites présents au niveau digestif sont nombreux, les principaux métabolites impliqués étant ceux de la voie du tryptophane, les SCFA (butyrate, propionate, acétate), les polyamines (spermine, spermidine), le PSA et les glycosphingolipides. Il est possible de modifier les concentrations de tous ces métabolites bactériens en intervenant au niveau de l'alimentation (147). Un schéma récapitulatif du rôle des métabolites bactériens sur la modulation du système immunitaire est repris dans la Figure 28.



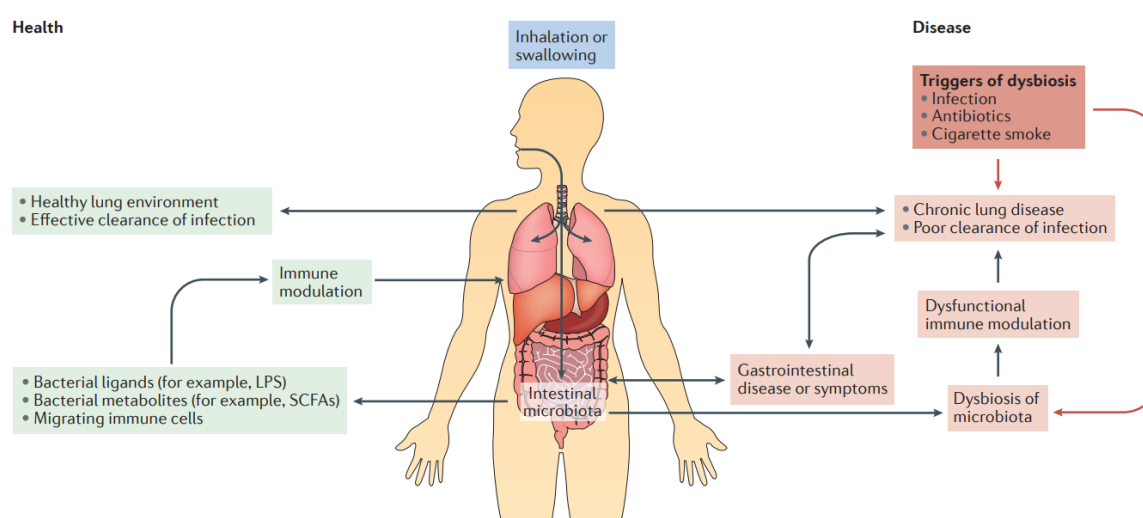
**Figure 28. Schéma récapitulatif de l'effet de la modulation du système immunitaire par le microbiote digestif, d'après Budden et coll. (148).**

## 2.3. Axe Intestin Poumon

### 2.3.1. Interactions entre intestin et poumons

Au niveau épidémiologique, il existe une forte association entre des maladies inflammatoires intestinales et des maladies chroniques pulmonaires. Chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques intestinales, une atteinte de la fonction pulmonaire était rapportée dans 44 à 50 % des cas (149).

Quand le microbiote digestif est altéré (par une antibiothérapie, une infection ou le tabac), les différents ligands et métabolites participant au maintien de l'homéostasie sont également altérés. La réponse immunitaire locale, mais également systémique, peut être modulée (Figure 29).



**Figure 29. Principes généraux de l'axe intestin-poumons, d'après Budden et coll. (148).**

Un risque accru de développer un asthme a été lié à une altération digestive chez les jeunes enfants. L'amélioration des conditions d'hygiène pourrait avoir un retentissement sur la composition du microbiote digestif, ainsi que sur le risque de développer des maladies respiratoires chroniques (150). Notamment, une faible diversité au niveau du microbiote digestif durant le premier mois de vie était associée au risque de développer un asthme, mais pas de développer une rhinoconjonctivite allergique (151). Douze mois

après la naissance, on ne retrouvait plus d'association entre diversité du microbiote digestif et risque de développer un asthme (151).

L'alimentation a également été reliée à la diminution des symptômes d'inflammation allergique des voies respiratoires dans un modèle murin (152). Dans le groupe recevant une alimentation riche en fibres, l'abondance relative des *Bacteroidetes* était augmentée. Parmi les *Bacteroidetes*, la principale famille identifiée était les *Porphyromonadaceae*, mais elle pouvait probablement correspondre aux *Muribaculaceae*. En effet, cet article a été publié en 2013, et les séquences appartenant à la famille *Muribaculaceae* sont faussement identifiées comme appartenant au genre *Barnesiella* (ou à la famille *Porphyromonadaceae*) dans plusieurs bases de données (153). Ce point est plus détaillé dans le chapitre 4.3.5 du manuscrit. Les concentrations cœcales et sériques en SCFA étaient augmentées chez les souris recevant une alimentation riche en fibres. De plus, les souris traitées avec du propionate (faisant partie des SCFA) présentaient également une inflammation pulmonaire réduite. Le propionate augmentait la production des précurseurs des cellules dendritiques dans la moelle osseuse. Par contre, aucune différence n'était observée quant au nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg).

Un lien entre alimentation riche en fibres et concentration en SCFA a été confirmé dans un autre modèle murin (154). L'abondance relative des *Bacteroidetes* augmentait dans le groupe recevant une alimentation riche en fibres. Parmi les *Bacteroidetes*, les séquences détectées étaient classées comme appartenant aux familles *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae* et à une famille inconnue appartenant aux *Bacteroidales*. Les auteurs ont mis les données de métagénomique à disposition sur MG-RAST (ID 12662). Nous avons réanalysé une partie des données de métagénomique avec Qiime 2 en utilisant la base SILVA 132, et certaines séquences correspondaient à des *Muribaculaceae* (données non montrées). Par exemple pour la souris identifiée comme « CtrlMumHF2 », 19 OTU appartenaient aux *Bacteroidetes*. Parmi ceux-ci, en réanalysant les données, 8 appartenaient aux *Muribaculaceae*, 8 aux *Rikenellaceae*, 1 aux *Bacteroidaceae*, et 2 à des familles non classées. Lorsque des souris gestantes recevaient une alimentation riche en fibre ou une supplémentation en acétate (faisant partie des SCFA) pendant toute la grossesse, il n'y avait pas de développement de maladies allergiques des voies aériennes chez leur progéniture. Par contre cet effet protecteur n'était pas retrouvé lorsque

l'alimentation riche en fibre ou la supplémentation en acétate était débutée à partir la naissance, ce qui suggérait une absence d'effet médié par la lactation.

Chez les fumeurs, les microbiotes pulmonaires et digestifs sont altérés. Au niveau digestif, on observe une abondance des genres *Bacteroides* et *Prevotella* augmentée chez les fumeurs présentant une maladie de Crohn, mais également chez les fumeurs faisant partie du groupe contrôle, comparé aux non-fumeurs (155). Des liens entre microbiote pulmonaire ou digestif et bronchopneumopathie chronique obstructive ont été mis en évidence. Cependant, les modifications du microbiote sont-elles la cause ou bien la conséquence de cette maladie ? Ces deux hypothèses sont probablement toutes les deux vraies, avec un modèle d'interactions bidirectionnelles (148).

### **2.3.2. Infection pulmonaire et microbiote digestif**

Plusieurs études ont montré un impact du microbiote sur la réponse à l'infection pulmonaire. Dans un modèle murin, la pneumopathie provoquée par instillation intranasale de *Streptococcus pneumoniae* était plus sévère dans le groupe ayant reçu des antibiotiques pendant les 3 semaines précédentes (ampicilline, néomycine, métronidazole, vancomycine) (6). La mortalité était également plus importante dans le groupe traité par antibiotique. La transplantation de microbiote fécal (FMT) engendrait une normalisation de la charge pulmonaire en *S. pneumoniae* et des niveaux d'IL-10 et de TNF-alpha. Cependant, l'impact éventuel de la FMT sur la sévérité de la pneumopathie ou la survie n'était pas mentionné. Il est difficile de savoir si l'effet de la FMT sur la mortalité n'a pas été testé par les auteurs, ou si ça n'a pas été inclus dans l'article par absence de différence. De plus, les données de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S sont très concises, seule une diminution modérée de l'alpha-diversité est décrite dans le groupe traité par antibiotiques (indice de Shannon à 5.2 vs 6.1 pour les contrôles), sans détailler l'altération de la composition du microbiote associée.

Un autre modèle murin a été décrit, s'intéressant à la pneumopathie à *Staphylococcus aureus* et au lien éventuel avec les *segmented filamentous bacteria* (SFB) présentes dans le microbiote digestif (7). Chez des souris C57BL/6 provenant de deux fournisseurs différents (Jackson et Taconic), des différences au niveau de la sévérité de la

pneumopathie à *S. aureus* étaient observées. Ces différences étaient moins marquées lorsque les souris des différents fournisseurs étaient hébergées en *co-housing* (cages communes), laissant suggérer un rôle du microbiote intestinal. Après *co-housing*, on retrouvait la présence de SFB chez les souris du fournisseur Jackson, alors que ce taxon était initialement absent. Cette diminution de sévérité était également retrouvée lorsque les souris du fournisseur Jackson (SFB-négatives) recevaient une transplantation de microbiote fécal des selles de souris initialement *germ-free* mono-colonisées par SFB pendant 2 semaines. La présence de SFB a été confirmée dans ces selles par PCR, mais aucun contrôle de l'absence d'autres bactéries n'a été effectué. Au total, cette étude montre que le microbiote digestif jouait un rôle dans la réponse de l'hôte à une pneumopathie par *S. aureus*, possiblement par l'intermédiaire des SFB.

Le rôle des ligands présents au niveau digestif dans la réponse à l'infection a également été mis en évidence. Dans un modèle murin de pneumopathie à *Klebsiella pneumoniae*, la réponse de l'hôte à l'infection était altérée lorsqu'une antibiothérapie (ampicilline, néomycine, métronidazole, vancomycine) était conduite pendant les 14 jours précédents (156). Par contre, si des ligands bactériens des Nod-like récepteurs (NLR) étaient en plus administrés, la charge bactérienne était diminuée. Les ligands des NLR utilisés étaient le MurNAcTri<sub>DAP</sub> (NOD1) et le muramyl dipeptide (ligand de NOD2). Les ligands des Toll-like récepteurs (TLR) n'avaient pas d'effet. Les ligands des TLR utilisés étaient du LPS de *Haemophilus influenzae* (ligand de TLR4), de l'ADN bactérien CpG non méthylé (ligand de TLR9), du muramyl dipeptide. Ce travail a été réalisé par une seule personne (156).

### **2.3.3. Microbiote pulmonaire**

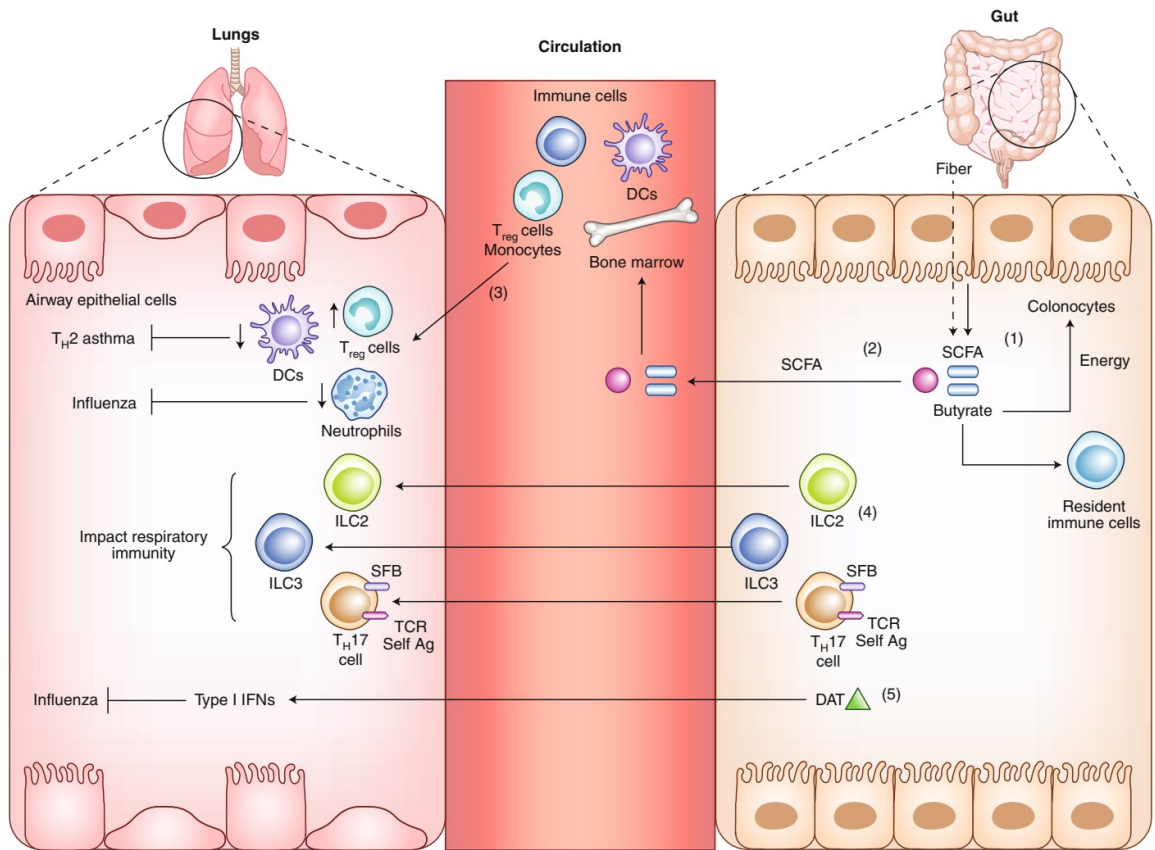
Depuis l'essor des techniques de métagénomique, l'existence d'un microbiote pulmonaire a pu être mise en évidence. Comme pour le microbiote digestif, les techniques de culture conventionnelle ne permettaient pas de mettre en évidence l'intégralité de sa composition. Auparavant, l'existence d'un microbiote pulmonaire était controversée car l'ADN bactérien retrouvé aurait pu correspondre à une contamination du prélèvement par des bactéries oropharyngées. Un des meilleurs arguments allant à l'encontre de l'hypothèse de la contamination est que lors de la réalisation de prélèvements successifs avec le même bronchoscope, on n'observe pas de dilution de la quantité bactérienne

(157). La concentration en ADN bactérien étant évidemment beaucoup plus faible au niveau du poumon qu'au niveau digestif, il est donc d'autant plus important d'utiliser des contrôles négatifs pour faire la part des séquences contaminantes présentes dans les réactifs d'extraction et de séquençage. À titre de comparaison, dans le poumon la concentration bactérienne est comprise entre  $10^3$  et  $10^5$  UFC/g (158) contre  $10^{12}$  UFC/g dans le côlon.

Le microbiote pulmonaire est composé à plus de 50 % d'anaérobies des genres *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium* et dans une moindre mesure *Actinomyces* (159, 160). Des bactéries non strictement anaérobies sont également retrouvées, appartenant aux genres *Streptococcus* et *Haemophilus*. Il s'agit d'une balance entre l'entrée de bactéries par microaspiration à partir de l'oropharynx (salive), et la sortie par clairance grâce au système mucociliaire et aux macrophages alvéolaires (5).

## **Conclusion**

Un schéma récapitulatif de l'axe intestin-poumon est repris dans la Figure 30. On y retrouve la plupart des concepts abordés jusqu'ici. Les SCFA représentent une des voies les mieux décrites permettant la communication entre intestin et poumon, mais il peut également en exister d'autres. Le métabolite désaminotyrosine (DAT) figurant sur le schéma n'a pas été détaillé ici, car il est impliqué par la réponse antivirale.



**Figure 30. Axes de communication entre intestin et poumon, d'après Wypych et coll. (5).**

## 2.4. Colonisation digestive par des bactéries résistantes aux antibiotiques

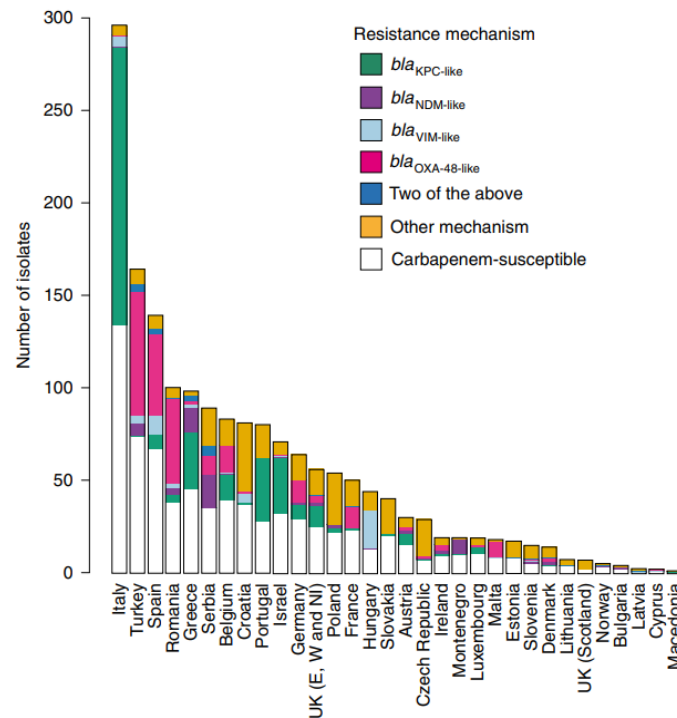
### 2.4.1. Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC)

Les entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) sont en augmentation croissante ces dernières années. Même si actuellement les décès attribuables à *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes sont inférieurs à ceux causés par *E. coli* ou *K. pneumoniae* résistants aux céphalosporines de troisième génération, la dynamique d'évolution de ces dernières années semble particulièrement préoccupante. La mortalité attribuable à une infection par *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes en Europe en 2015 était estimée à 2 094 décès, alors qu'elle n'était estimée qu'à 341 décès en 2007. Il s'agit de la plus forte hausse de mortalité entre 2007 et 2015, multipliée par un facteur 6,2. Sur la même période, la mortalité attribuée à l'ensemble des bactéries multirésistantes était augmentée d'un facteur 2,5 (161).

L'étude European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE), ayant pour objectif d'analyser les isolats de *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes isolés en Europe entre novembre 2013 et mai 2014, a été récemment publiée (162). Après analyse des 944 génomes de *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes, 684 était producteurs d'au moins une carbapénémase. Les principales carbapénémases identifiées étaient KPC (45,5 %), OXA-48 (36,3 %), NDM (11,5 %), VIM (8,2 %), IMP (0,4 %). Le total est supérieur à 100 %, 18 souches possédant 2 carbapénémases. La combinaison la plus fréquente était la coproduction de NDM et OXA-48 (10 souches). Pour la plupart des 260 souches restantes qui résistaient aux carbapénèmes mais ne produisaient pas de carbapénémase, une combinaison de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu et/ou de céphalosporinase plasmidique *ampC*, associée à des mutations au niveau des porines (impermeabilité) a été mise en évidence. Les souches françaises incluses dans cette étude étaient en nombre très limité (12 OXA-48 et 1 KPC). La forte participation de l'Italie à cette étude explique le pourcentage élevé de KPC retrouvé (Figure 31). Les auteurs concluent à une forte dissémination nosocomiale de *K.*



*pneumoniae* productrice de carbapénémase, majoritairement liée au ST-258. Cependant le ST-258 est fortement associé à la production de KPC, une carbapénémase relativement rare en France.



**Figure 31. Répartition des mécanismes de résistance des souches de *K. pneumoniae* reçues dans le cadre de l'étude EuSCAPE, d'après David et coll. (162).**

En France, la majorité des EPC reçus par le centre national de référence (CNR) de la résistance aux antibiotiques sont de type OXA-48 (72 % des souches en 2018) (163). Cette prédominance d'OXA-48 est associée à un réservoir important situé dans les pays du Maghreb avec lesquels existent de nombreux liens (voyages, migration, rapatriements sanitaires). NDM est en ordre de fréquence la deuxième carbapénémase identifiée (16 % des souches en 2018), les principaux variants retrouvés étant NDM-1 et NDM-5. Les autres carbapénémases sont plus rares (5 % de VIM, 3 % de KPC, 2 % de OXA-48+NDM, 1 % d'IMP). Les rares cas de *K. pneumoniae* KPC identifiés en France appartenaient également au ST-258.

Les infections par EPC peuvent aboutir à des situations d'impasses thérapeutiques. Si les souches productrices de carbapénémase de classe D (OXA-48) peuvent encore rester sensibles au méropénème, ce n'est pas le cas des souches productrices de carbapénémase

de classe A (KPC) ou B (NDM, VIM). Le ceftazidime-avibactam a été récemment commercialisé et il est habituellement actif sur les carbapénémases de classe A (KPC) ou D (OXA-48). Par contre, le ceftazidime-avibactam ne présente pas d'activité sur les enzymes de classe B (NDM, VIM), ces souches devant être considérées comme résistantes. La colistine reste active sur 95 % des souches productrices de carbapénémase. La résistance plasmidique à la colistine (gènes *mcr-1* à *mcr-5*) est à l'heure actuelle exceptionnelle, et concerne habituellement *E. coli* BLSE non producteur de carbapénémase (6 souches reçues par le CNR de la résistance aux antibiotiques en 2018) (163). De nouvelles molécules sont en cours de commercialisation : imipénème-relebactam, méropénème-vaborbactam, céfépime-zidébactam, céfidérol, omadacycline, éravacycline et de la plazomycine. Parmi celles-ci, le céfidérol semble particulièrement intéressant, présentant également une activité sur les souches productrices de carbapénémase de classe B (NDM, VIM).

## **2.4.2. Modèles animaux de colonisation**

Plusieurs modèles murins de colonisation par des bactéries multirésistantes ont été décrits dans la littérature.

### ***Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (ERG)**

Dans le but de coloniser des souris à *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (ERG), des souris recevaient des antibiotiques deux fois par jour pendant 5 jours, puis étaient exposées à  $10^4$  UFC d'ERG par gavage gastrique (164). Lorsque l'exposition à l'ERG avait lieu 2 ou 5 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie, une colonisation par ERG à des niveaux compris entre 5 et 8 log d'UFC/g de selles était retrouvée. Si l'exposition à l'ERG avait lieu 10 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie, une colonisation à de faibles niveaux, proches de la limite de détection estimée à 2 log d'UFC/g de selles, était mise en évidence. La colonisation à ERG semblait plus stable dans le temps et à des niveaux plus élevés lorsque les souris étaient exposées à de la pipéracilline/Tazobactam ou à de la clindamycine, plutôt qu'à de la céfoxitine. Cette étude suggère ainsi que l'exposition à des antibiotiques anti-anaérobies favorise fortement la colonisation à ERG en cas d'exposition dans les 5 jours suivant l'arrêt des antibiotiques. La céfoxitine possède une activité anti-anaérobie vis-à-vis des cocci à Gram positif anaérobies, mais de nombreux

bacilles à Gram négatif anaérobies sont résistants. Parmi les *Bacteroides* du groupe fragilis, 35 % étaient résistants à la céfoxitine entre 2006 et 2010 (165).

Dans ce même modèle murin de colonisation à ERG, la concentration en SCFA (propionate, butyrate, acétate) au niveau cæcal était 7 à 20 fois plus basse chez les souris traitées par clindamycine par rapport aux contrôles (166). Cependant les SCFA n'avaient pas de rôle direct dans l'inhibition de la réplication bactérienne. La courbe de croissance de la souche d'ERG utilisée était similaire dans un bouillon cœur cerveau avec ou sans addition de SCFA. Par contre, la croissance bactérienne de la souche d'ERG était inhibée dans des contenus caecaux de souris contrôles après incubation en anaérobiose, mais pas lorsque ces mêmes contenus caecaux avaient été autoclavés ou filtrés de manière à éliminer les bactéries du microbiote cæcal. La souche d'ERG était capable de croître dans les contenus caecaux de souris traités par clindamycine, après une phase de latence de 6 heures. Les auteurs suggéraient que la résistance à la colonisation par ERG était réalisée par des substances inhibitrices produites par le microbiote anaérobie, mais que les SCFA étaient juste un marqueur de l'altération du microbiote (166).

Dix ans plus tard, la même équipe a continué à travailler sur le modèle de colonisation à ERG mis au point. La clindamycine a été utilisée pour altérer le microbiote digestif et favoriser la colonisation à ERG. La clindamycine altérait non seulement la composition du microbiote, mais aussi les métabolites retrouvés au niveau des selles. Certains métabolites du tryptophane (indole-3-propionate, indole acide acétique, acide xanthurénique, acide kynurénique) étaient diminués suite au traitement par clindamycine (167). Toutefois leur rôle dans la résistance à la colonisation n'est pas déterminé, il pourrait également s'agir d'une simple association sans lien de causalité.

### ***Clostridioides difficile***

Dans un modèle murin de colite à *Clostridioides difficile*, une seule dose de clindamycine injectée par voie intrapéritonéale suffisait pour engendrer une infection en cas d'exposition à  $10^3$  UFC de *C. difficile* 24 heures après administration de clindamycine (52). Les souris ayant survécu à l'infection restaient colonisées pendant plus de 28 jours. Des analyses métagénomiques des contenus caecaux ont été réalisées pour les souris

ayant été exposées à la clindamycine et/ou à *C. difficile*. Les analyses métagénomiques au niveau iléal et cæcal montrent que la clindamycine diminue fortement l'abondance du genre *Barnesiella* (appartenant aux *Bacteroidetes*) et de la famille *Lachnospiraceae* (appartenant aux *Firmicutes*) pendant au moins 28 jours. De manière étonnante, le microbiote cæcal des souris 14 à 28 jours après injection de clindamycine était dominé à plus de 50 % par des *Mollicutes*. Les auteurs n'ayant pas rendu publiques leurs données de séquençage, leurs résultats ne peuvent pas être vérifiés à l'aide d'une base de données plus récente. Il est toutefois probable que les bactéries identifiées comme *Barnesiella* appartiennent en fait à la famille *Muribaculaceae* récemment décrite (168). Les souris exposées à des spores de *C. difficile* jusqu'à 10 jours après injection de clindamycine développaient une colite, mais les auteurs n'ont pas essayé d'infecter les souris à *C. difficile* plus de 10 jours après l'injection de clindamycine pour mettre en évidence une restauration du microbiote aboutissant à une résistance à l'infection.

### **Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE)**

Dans un modèle murin de colonisation à *E. coli* BLSE, 9 antibiotiques différents ont été administrés 3 jours de suite, les souris ayant reçu  $10^8$  UFC d'*E. coli* BLSE ST-131 par gavage orogastrique le premier jour (169). La clindamycine et le céfotaxime permettaient d'obtenir les concentrations en *E. coli* BLSE les plus élevées (pic à 8 log UFC/g de selles). Cependant à 14 jours, plus aucune souris n'était colonisée à *E. coli* BLSE quel que soit l'antibiotique utilisé. Les auteurs concluaient que les bacilles à Gram négatif anaérobies n'étaient pas les seules bactéries à apporter une résistance à la colonisation, car le céfotaxime était aussi efficace que la clindamycine dans leur modèle. Parmi les 9 antibiotiques testés, seule la clindamycine avait un effet notable sur la concentration en Gram négatifs anaérobies retrouvés en culture. Par rapport aux modèles décrits précédemment, la colonisation à *E. coli* BLSE semblait très limitée dans le temps. Les auteurs ne fournissent pas d'information sur l'origine de la souche d'*E. coli* utilisée. Il est possible que différentes souches soient plus ou moins aptes à coloniser le tube digestif, et puissent être rapidement éliminées même après avoir atteint des concentrations supérieures à 8 log UFC/g de selles.

Un modèle de colonisation à *K pneumoniae* BLSE a été décrit par l'équipe de Donskey en 2007, l'objectif de l'étude étant de déterminer les effets de l'administration de carbapénèmes sur la colonisation digestive. Les antibiotiques étaient administrés pendant 5 jours de suite, puis 2 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie les souris étaient exposées à  $10^4$  UFC de *K. pneumoniae* BLSE par gavage (170). L'administration d'ertapénème ou d'imipénème n'était pas associée à une colonisation par *K. pneumoniae* BLSE, alors que la ceftriaxone ou la pipéracilline/Tazobactam engendrait une colonisation supérieure à 7 log UFC/g de selles pendant au moins 6 jours. La souche de *K. pneumoniae* utilisée était sensible à l'ertapénème et à l'imipénème, et résistante à la ceftriaxone et à la pipéracilline/Tazobactam. La concentration en carbapénèmes dans les selles était sous la limite de détection à J3, les auteurs ayant administré la souche par gavage à J2. Il semblerait que l'ertapénème soit toujours présent dans les selles 48h après administration d'après Wong et coll., cette voie d'excrétion représentant 10 à 20 % de la dose injectée (171). Pour l'imipénème, l'élimination par voie biliaire est réputée négligeable (inférieure à 1 %) donc le problème se pose moins (172). La plupart des bactéries anaérobies sont sensibles à l'ertapénème, à l'exception de rares souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Les auteurs observaient une diminution de la concentration en anaérobies du genre *Bacteroides* pour les souris traitées par ertapénème, mais moins franche que dans le groupe ayant reçu pipéracilline/Tazobactam (-1 log vs -3 log UFC/g de selles, respectivement). L'imipénème n'avait pas d'effet sur la concentration en *Bacteroides*. Pour s'affranchir du problème de sensibilité de la souche de *K. pneumoniae* aux carbapénèmes, il aurait été possible d'utiliser une souche productrice de carbapénémase, *K. pneumoniae* productrice de KPC-1 ayant déjà été décrite dans la littérature 5 ans auparavant (173).

## **Entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC)**

Peu de modèles de colonisation par EPC ont été décrits. L'équipe de Donskey a publié en 2011 un modèle de colonisation par *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase de type KPC (174). Cette étude avait pour but d'évaluer l'effet de différents antibiotiques sur la colonisation par *K. pneumoniae* KPC. Les souris recevaient des antibiotiques pendant 8 jours, débutant 2 jours avant l'exposition à  $10^3$  UFC de *K. pneumoniae* KPC (J0) et se terminant 5 jours après l'exposition. Le suivi de la concentration en *K. pneumoniae* KPC

dans les selles était réalisé jusque J11, soit 6 jours après l'arrêt des antibiotiques. Les deux antibiotiques permettant d'obtenir les concentrations les plus importantes de *K. pneumoniae* KPC à J11 étaient la clindamycine et la pipéracilline/Tazobactam. Cependant, même dans le groupe clindamycine, la concentration en *K. pneumoniae* KPC dans les selles chutait fortement entre J6 et J11, passant d'un niveau supérieur à 10 log UFC/g de selles à J6 à 5,5 log UFC/g de selles à J11. La clindamycine et la pipéracilline/Tazobactam étaient les deux antibiotiques induisant la plus grande diminution de la concentration en anaérobies dans les selles à J5 (indétectables, pour une limite de détection estimée à 4 log UFC/g de selles).

### **2.4.3. Colonisation par des bactéries multi-résistantes chez l'Homme**

#### **Facteurs de risque de colonisation par EPC**

A l'hôpital, les patients ayant été en contact avec un patient porteur d'EPC pour lequel des précautions complémentaires n'ont pas été instaurées sont considérés à risque de devenir à leur tour porteur d'EPC (175). Cependant, tous les patients ayant été potentiellement exposés à une EPC ne vont pas forcément devenir colonisés. Certains facteurs vont jouer sur la susceptibilité potentielle à la colonisation.

Les facteurs de risque classiquement retrouvés dans la littérature font intervenir les comorbidités et les dispositifs invasifs pouvant accroître la charge en soins, ainsi que la notion d'antibiothérapie pouvant altérer le microbiote digestif. Dans une étude s'intéressant à la colonisation par EPC chez les enfants, les facteurs de risque étaient l'exposition à une antibiothérapie à visée anti-*Pseudomonas* dans les 3 mois précédents, une chirurgie récente, et la ventilation mécanique (176). Dans une autre étude, seule l'antibiothérapie dans les 24 heures précédentes était associée à la colonisation par EPC, mais les auteurs n'ont pas recueilli d'information sur le type d'antibiotiques utilisés (177). La pression de colonisation, l'exposition à des carbapénèmes, et un score de comorbidités (Charlson) élevé ont également été décrits comme facteurs de risque de colonisation à *K. pneumoniae* KPC (178). Une étude française retrouvait significativement associée en analyse univariée l'utilisation « récente » d'antibiotiques, définie comme une

antibiothérapie dans les 6 mois. Cette association n'était pas retrouvée en multivarié (179). Le facteur le plus significativement associé en analyse multivariée était la présence d'une infection concomitante (OR = 9,83), qui peut probablement être considérée comme un marqueur d'antibiothérapie au moment de l'exposition à l'EPC.

Nous avons participé à une étude multicentrique sur les facteurs de risque d'acquisition de *K. pneumoniae* OXA-48 chez les patients « contact », dirigée par le Pr Zahar et publiée dans *Journal of Hospital Infection* en 2018 (3). Dans cette étude rétrospective chaque cas d'acquisition nosocomiale de *K. pneumoniae* OXA-48 était associé à 3 patients contrôles hospitalisés dans le même service et choisis sur le critère de la durée d'exposition la plus similaire possible. La durée d'exposition était définie comme la durée pendant laquelle un patient était exposé au patient index avant la mise en place des précautions complémentaires. Après analyse multivariée, les variables associées à l'acquisition de *K. pneumoniae* OXA-48 chez les patients exposés étaient : la notion d'antibiothérapie durant la durée d'exposition ( $p < 0,001$ ), la réalisation d'au moins une procédure invasive (cathéter central, sonde urinaire, sonde naso-gastrique, chirurgie) ( $p = 0,04$ ), et la proximité géographique vis-à-vis du patient index ( $p = 0,03$ ). La notion d'antibiothérapie durant le mois précédent était significativement associée à la colonisation par *K. pneumoniae* OXA-48 en univarié, mais pas dans le modèle multivarié. Les antibiotiques les plus à risque durant la durée d'exposition étaient les  $\beta$ -lactamines présentant une activité anti-anaérobie (amoxicilline et acide clavulanique, pipéracilline/Tazobactam). Aucune différence n'était mise en évidence pour la clindamycine, mais les effectifs étaient très faibles et la clindamycine était regroupée dans une classe « autres anti-anaérobies » avec le métronidazole. Au total, cette étude montrait que la prescription des  $\beta$ -lactamines présentant une activité anti-anaérobie était un facteur de risque majeur d'acquisition d'EPC. De plus, elle suggérait que la prescription de ces molécules à risque durant la période d'exposition était plus prédictive du risque d'acquisition de *K. pneumoniae* OXA-48, que leur prescription durant le mois précédant l'exposition. Cela serait compatible avec l'existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation relativement courte, qui nécessiterait d'être confirmée dans d'autres études.

Le point marquant dans toutes ces études épidémiologiques, c'est que la définition d'une antibiothérapie récente est très diverse. Les valeurs extrêmes ont pour minimum

une antibiothérapie reçue dans le jour précédent l'exposition et pour maximum dans les 180 jours précédents. Si on considère les données des modèles animaux de colonisation à EPC ou à entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu, il serait logique de penser que le risque de colonisation devienne plus important lorsque le délai entre l'antibiothérapie et l'exposition à l'EPC est minimal. De la même façon, peu d'études s'intéressent aux antibiothérapies prescrites après la fin de la période d'exposition potentielle à une EPC (début des précautions complémentaires chez le cas index), mais seulement aux facteurs de risque retrouvés avant l'exposition. Une altération du microbiote ayant lieu dans les jours ou les semaines suivant une exposition à une EPC pourrait pourtant également représenter un facteur de risque important de colonisation.

### **Effet d'une antibiothérapie sur la colonisation**

Il est plus difficile d'étudier précisément l'effet d'une antibiothérapie sur la colonisation chez l'Homme, car il n'est pas possible pour des raisons éthiques évidentes d'exposer les patients à des bactéries multi-résistantes. De plus, les patients reçoivent fréquemment de plusieurs antibiothérapies successives au cours d'un même séjour. Cependant, les données observationnelles qui ont été publiées chez l'Homme présentent un intérêt particulier. En effet, le microbiote digestif de modèles animaux (principalement murins) diffère de celui de l'Homme.

Dès les années 2000, Donskey et coll. ont réalisé une étude prospective incluant 51 patients colonisés à ERG, chez qui la charge bactérienne en ERG dans les selles a été monitorée en fonction des antibiotiques reçus (180). Des charges bactériennes en ERG élevées (8 log CFU / g de selles) étaient retrouvées chez les patients ayant reçu des antibiotiques à forte activité anti-anaérobie (pipéracilline-Tazobactam, méropénème, clindamycine), mais pas pour les antibiotiques présentant une faible activité anti-anaérobie (fluoroquinolones, triméthoprime-sulfaméthoxazole). Des résultats similaires ont également été retrouvés pour des bacilles à Gram négatif multi-résistants (entérobactéries ou *P. aeruginosa*), les antibiotiques à activité anti-anaérobie augmentant leur charge bactérienne dans les selles (181). Plus récemment, le rôle des *Porphyromonadaceae* (une famille bactérienne strictement anaérobie) dans la résistance à la colonisation vis-à-vis d'ERG a été suggéré dans une cohorte de patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (182).



## 2.5. Stratégies de restauration du microbiote digestif

### 2.5.1. Probiotiques

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants présentant des effets bénéfiques lorsqu'ils sont consommés, principalement en améliorant ou en restaurant le microbiote digestif. Parmi les probiotiques, les plus étudiés sont les bactéries lactiques appartenant à l'ordre *Lactobacillales*. Ces bactéries présentent des propriétés immunomodulatrices, métaboliques, antimicrobiennes et détoxifiantes présentant un intérêt évident au niveau du maintien de l'homéostasie (183). Les différents mécanismes d'action des probiotiques sont repris dans la Figure 32.

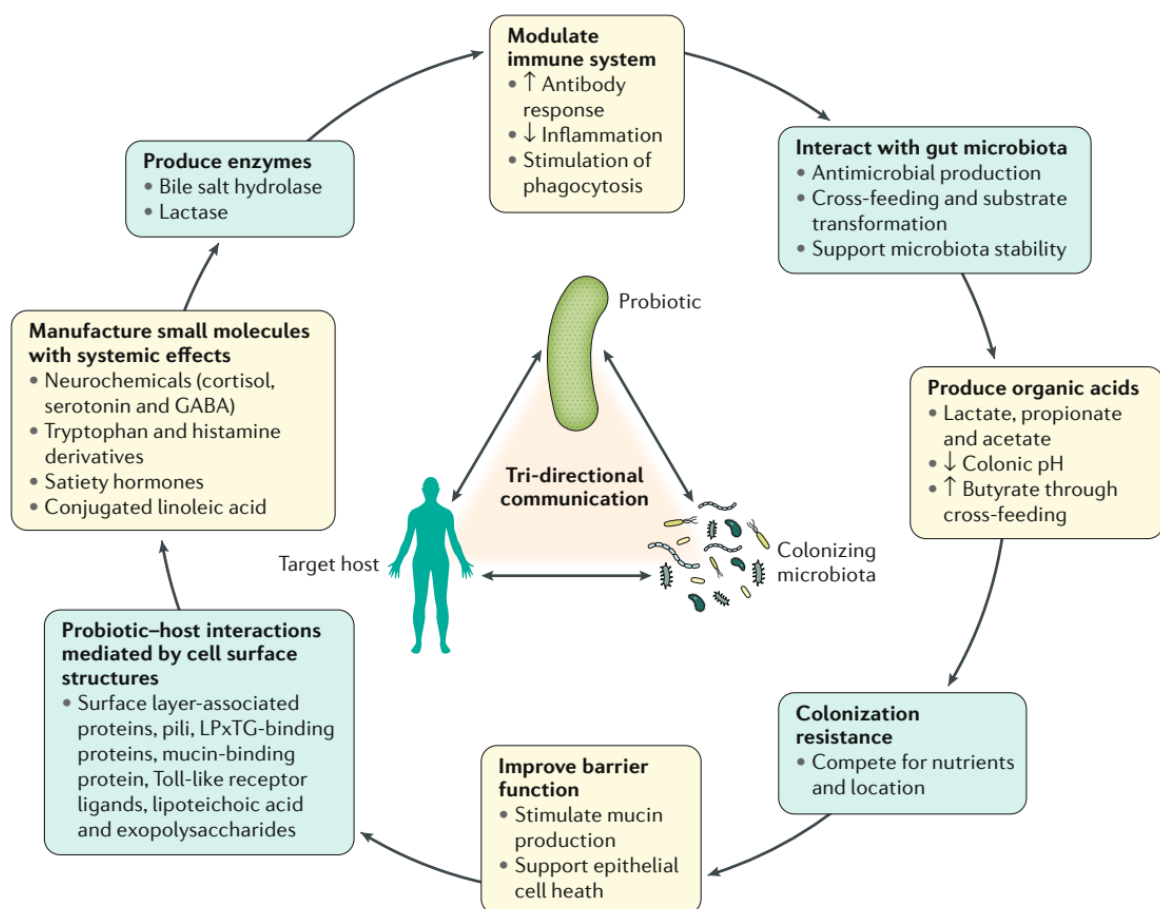


Figure 32. Mécanismes d'action des probiotiques, d'après Sanders et coll. (184).

Récemment, l'utilisation de probiotiques a fait l'objet d'une controverse. L'administration de probiotiques appartenant aux *Lactobacillus* a été associée à un retard à la reconstitution du microbiote digestif suite à une antibiothérapie (185). Cet effet délétère des probiotiques pourrait être dû à la production par les souches de *Lactobacillus* utilisées de facteurs solubles inhibant la croissance de nombreux taxons bactériens du microbiote digestif (*Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Sutterella*). Dans cette même étude, une transplantation de microbiote fécal autologue, à partir de selles conservées avant toute antibiothérapie, permettait une reconstitution rapide du microbiote digestif. Une autre étude également publiée dans le même journal, le même jour, montrait une absence d'efficacité des probiotiques (186). Dans cette étude, les probiotiques passaient juste temporairement au niveau du système digestif, sans effet durable.

Toutefois, le manque d'efficacité des probiotiques mis en évidence dans les deux études précédentes peut correspondre à l'utilisation de souches non optimales, ou d'un mode d'administration non adapté. Un probiotique peut être administré conjointement avec un prébiotique, une combinaison appelée symbiotique. Le prébiotique associé permettrait de promouvoir la croissance et l'implantation de la souche de probiotique. Ainsi l'administration d'un probiotique seul (*Lactobacillus rhamnosus* GG) ne permettait pas d'obtenir une colonisation digestive durable chez des nouveau-nés (187), tandis que l'administration de la combinaison symbiotique d'une autre souche de probiotique (*Lactobacillus plantarum*) associée à un fructo-oligosaccharide permettait d'obtenir une colonisation persistant plusieurs mois (188).

Dans un essai contrôlé et randomisé incluant 4 556 nouveau-nés, l'administration de la combinaison symbiotique de *Lactobacillus plantarum* avec un fructo-oligosaccharide a été évaluée (189). Cet essai a eu lieu dans différents villages ruraux d'Inde, dans lesquels la mortalité infantile était particulièrement importante. L'administration de ce symbiotique permettait de diminuer le taux de sepsis et de décès par rapport au placebo (risque relatif = 0,60 [IC 95 % 0,48 - 0,74]).

De plus, les probiotiques commencent également à être administrés par voie intranasale pour prévenir ou traiter des maladies respiratoires allergiques ou infectieuses. L'administration intranasale de différentes souches de *Lactobacillus* présentait un effet protecteur dans un modèle murin d'infection grippale (190). La mortalité était diminuée, et l'effet était plus important en administrant des bactéries vivantes plutôt que des bactéries mortes. Différentes souches de *Lactobacillus* ont également montré une capacité à inhiber la formation de biofilm de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, ainsi que son activité élastase (191). Cela suggère un rôle potentiel de certaines souches de *Lactobacillus* dans la prévention ou le traitement d'infections respiratoires chroniques à *P. aeruginosa*, qui nécessite d'être évalué dans des modèles *in vivo*.

Une revue très complète de la place des probiotiques a été récemment publiée (192). Les auteurs de cette revue sont également les auteurs principaux de l'article ayant associé l'administration de probiotiques à un retard de reconstitution du microbiote digestif suite à une antibiothérapie (185). Pourtant, l'avis de ces auteurs sur les probiotiques n'est pas négatif. Les stratégies qu'ils proposent consistent à aller vers une administration de probiotiques plus personnalisée, pouvant être fonction du microbiote de base de l'individu ou d'un mécanisme mis en évidence dans des études préalables. Ainsi, il est peu probable qu'une souche donnée soit efficace chez tous les individus, pour traiter différentes conditions. Une orientation vers l'utilisation de souches spécifiques, dans des sous-populations spécifiques, et dans un contexte clinique spécifique, pourrait s'avérer plus efficace. La place des probiotiques est donc amenée à se modifier en parallèle de l'évolution de la compréhension des microbiotes digestifs et pulmonaires.

### **2.5.2. Transplantation de Microbiote Fécal (FMT)**

Un modèle de colonisation à *Escherichia coli* producteur de carbapénémase NDM-1 a été utilisé par Mahieu et coll. pour évaluer l'efficacité de la transplantation de microbiote fécal sur la colonisation par EPC (193). Un cocktail d'antibiotiques à large spectre était administré (vancomycine, métronidazole, ceftriaxone) pendant 5 jours (J1 à J5), puis une exposition à un très fort inoculum d'*E. coli* NDM-1 ( $5 \times 10^9$  UFC) par gavage était répétée 3 fois (J4, J5 et J8). Ensuite une transplantation de microbiote fécal était réalisée pendant

4 périodes de 3 jours de suite (J10 à J12, J23 à J25, J37 à J39, J49 à J51). À J57, 50 % des souris du groupe transplantation de microbiote fécal étaient toujours colonisées par EPC, contre 79 % dans le groupe contrôle ( $p=0,11$ ). Un des points forts de l'étude était l'utilisation de cages individuelles pour chaque souris. Ces résultats étaient modérément convaincants, étant donné la lourdeur du protocole de FMT utilisé et l'absence de différence significative sur 14 souris par groupe.

En utilisant le même modèle de colonisation par *E. coli* NDM-1, Mahieu et coll. ont étudié l'effet d'un protocole de FMT de trois jours seulement (J10 à J12) (194). À J26, la concentration en EPC dans les selles était plus faible dans le groupe FMT que dans le groupe contrôle (3 log UFC/g de selles vs 4,7 log UFC/g de selles, respectivement). Cependant la FMT ne présentait un effet que sur une diminution de la concentration en EPC dans les selles, et pas sur la décolonisation.

L'équipe de Pamer a évalué l'effet de la FMT dans leur modèle murin de colonisation par ERG (182). Après une semaine de traitement par ampicilline, les souris étaient exposées à  $10^8$  UFC d'*E. faecium* possédant le gène *vanA*. Une FMT était alors réalisée pendant trois jours de suite. Après une phase de latence d'une semaine, on observait un infléchissement de la concentration en ERG dans les selles, qui devenait indétectable à J15 alors que dans le groupe contrôle on retrouvait toujours 7 log d'ERG/g de selles. La plupart des analyses statistiques utilisées dans cet article ne sont pas adaptées, car les auteurs ont choisi un test paramétrique (test t de Student) sur des concentrations bactériennes, sans réaliser de transformation logarithmique préalable. Cependant étant donné l'ampleur de la différence observée, il est très probable qu'une différence significative ait tout de même été retrouvée avec un test plus adapté (test paramétrique après transformation logarithmique, ou bien test non paramétrique sur les rangs). Les auteurs ont retrouvé un membre du phylum *Bacteroidetes*, très abondant chez les souris contrôles et chez les souris ayant bénéficié d'une FMT, qu'ils identifient comme appartenant au genre *Barnesiella*. Il s'agit en fait très probablement de la famille *Muribaculaceae* décrite 3 ans après la publication de leur étude et très abondante au niveau du microbiote digestif murin (153, 168), même si les données brutes de séquençage ne sont pas disponibles pour le vérifier. Pamer le reconnaît indirectement dans un article publié ultérieurement en faisant référence à sa propre étude dans les

termes suivants : « As previously reported, S24-7 (*Barnesiella*) was strongly associated with VRE protection » (2). S24-7 est l'ancienne dénomination des *Muribaculaceae*. *Barnesiella* fait partie des *Porphyromonadaceae* et non des *Muribaculaceae*, mais Pamer veut probablement dire que les séquences identifiées comme *Barnesiella* dans son article de 2013 correspondaient à la famille *Muribaculaceae*.

Pour Pamer et coll., la résistance à la colonisation par ERG est médiée par ce taxon décrit comme *Barnesiella*. Dans leur dernière figure, le microbiote digestif de patients qui vont ou non développer une colonisation à ERG a été comparé, et les auteurs concluent que la présence de *Barnesiella* était protectrice de la colonisation par ERG. Cependant l'abondance relative détectée était très faible, *Barnesiella* présentant une abondance moyenne à 0,25 % chez les patients qui ne vont pas se coloniser, contre 0,005 % chez ceux qui vont se coloniser à ERG. Chez l'homme *Barnesiella* est plus fréquemment retrouvée que les *Muribaculaceae*, il est donc possible que leurs séquences détectées chez la souris et chez l'humain, qui sont toutes les deux identifiées comme *Barnesiella*, correspondent en réalité à des taxons différents (*Barnesiella* chez l'homme, et *Muribaculaceae* chez la souris ?). Malgré ces limites cette étude est intéressante, car c'est une des premières à montrer que dans un modèle murin, un taxon appartenant aux *Bacteroidetes* est associé à la résistance à la colonisation, et que son abondance est restaurée suite à une FMT.

Chez l'humain, la FMT est en pleine expansion. Plus de 200 études cliniques sont enregistrées sur ClinicalTrials (195). La FMT peut être réalisée à partir de selles collectées le même jour, de selles congelées, ou de capsules. Des banques de selles ayant pour but de collecter, conserver et distribuer des selles de donneurs sains commencent à être développées (196).

Dans une méta-analyse récente, 11 études ont été incluses pour analyser l'effet de la FMT sur la décolonisation à EPC (197). Du fait d'une forte hétérogénéité, il n'était pas possible de regrouper les résultats de ces études, dont seulement cinq présentaient un groupe contrôle. Au final, le niveau de preuve de l'éradication microbiologique de la colonisation à EPC par la FMT était bas à 1 semaine et très bas à 1 mois. Les auteurs recommandaient d'utiliser de ne pas utiliser la FMT en routine pour essayer de

décoloniser ces patients. Des études contrôlées randomisées dans des populations à haut risque (patients hospitalisés en réanimation, neutropéniques, ou transplantés) sont nécessaires pour mettre à jour ces recommandations.

### **2.5.3. Transplantation de filtrats stériles de microbiote fécal**

Dans le cas des infections récurrentes à *Clostridioides difficile*, la transplantation de microbiote fécal est devenue le traitement de référence. Cette transplantation peut être réalisée à partir de selles fraîches, ou congelées. Le mécanisme d'action exact n'est pas encore élucidé, cependant en cas d'infection récurrente à *C. difficile* la FMT permet une guérison dans 92 % des cas, contre 42 % pour la fidaxomicine et 19 % pour la vancomycine (198).

Une étude pilote portant sur 5 patients avec des diarrhées récurrentes à *C. difficile* suggère que la transplantation de filtrats stériles de selles pourrait également être efficace. Les selles étaient homogénéisées, puis centrifugées à 1 800 G pendant 10 minutes, et le surnageant était filtré une première fois à travers un papier de cellulose. Des filtrations successives par un filtre de 10 µm, 0,6 µm, puis 0,2 µm étaient réalisées. La stérilité du filtrat obtenu était vérifiée par culture. Après transplantation de filtrats stériles, l'alpha-diversité augmentait et la composition du microbiote du receveur tendait à se rapprocher de celle du donneur. Les limites de cette étude sont le faible nombre de patients inclus et l'absence de groupe contrôle.

Ces données préliminaires pourraient, si elles sont confirmées dans d'autres études, remettre en cause le rôle des bactéries dans l'efficacité de la FMT. Les auteurs proposent que l'effet observé pour les filtrats stériles puisse être lié à des composants bactériens (différents types de ligands), à des composés antibactériens d'origine bactérienne (bactériocines), ou à des bactériophages. Ces résultats n'ont pas été reproduits à notre connaissance depuis leur publication en 2017, que ce soit chez des patients ou dans des modèles animaux, mais ils présentent un intérêt important pour essayer d'élucider le mécanisme de la FMT.

## 2.6. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de la thèse est d'évaluer l'impact de la colonisation par EPC sur la sévérité de la pneumopathie à *P. aeruginosa* dans un modèle murin.

Pour atteindre ce but, nous avons procédé dans cet ordre :

- Caractérisation de deux souches d'EPC par séquençage du génome complet et analyse des facteurs de virulence et des déterminants de résistance retrouvés.
- Mise au point d'un modèle murin de colonisation à *K. pneumoniae* NDM-1, et évaluation de la durée de la fenêtre de susceptibilité à la colonisation digestive encadrant une injection de clindamycine.
- Mise en évidence d'un pronostic défavorable associé à la colonisation par EPC lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* 14 jours plus tard, et de la restauration du pronostic par la transplantation de microbiote fécal.
- Description des modifications des populations cellulaires immunitaires par cytométrie en flux, des modifications du microbiote digestif par métagénomique, et des modifications en métabolites par métabolomique dans le but d'analyser les mécanismes sous-jacents.

## 3. Matériel et Méthodes

### 3.1. Souches bactériennes et animaux

#### 3.1.1. Souches bactériennes

La souche bactérienne d'entérobactérie productrice de carbapénémase utilisée est une souche clinique (KPL0.2) de *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase de type NDM-1. Le génome de cette souche a été séquencé par technologie Illumina. La préparation des bibliothèques a eu lieu avec le kit Nextera XT, et le séquençage a eu lieu sur Illumina – HiSeq PE 100. La taille des *read* était de 2 x 100 paires de bases (*paired end*). Le séquençage a été réalisé par un partenaire privé, Admera Health LLC. Nous avons ensuite réalisé l'assemblage en utilisant la plateforme Galaxy (199), à partir des fichiers fastq. Après vérification de la qualité des *read*, les adaptateurs Nextera XT ont été retirés avec Trimmomatic. L'assemblage a ensuite été réalisé avec Unicycler. L'annotation automatisée a été réalisée avec Prokka. Le génome a été déposé dans Genbank (référence PYBH00000000).

Une autre souche clinique de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase de type OXA-48 (KPL0.1) a été également séquencée et déposée dans Genbank (référence QHMA01000000). Cependant, après analyse *in silico*, cette souche n'a pas été retenue dans le modèle final.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* utilisée pour provoquer une pneumopathie dans le modèle murin était la souche de référence PAO1.

Les souches bactériennes étaient incubées dans du *lysogeny broth* (LB) à 35 °C pendant 18 heures, puis diluées au 1/20<sup>ème</sup> dans du LB et incubées pendant 4 heures supplémentaires pour obtention d'une phase exponentielle de croissance. Après centrifugation à 3 000 RPM pendant 8 minutes, et 2 étapes de lavage au PBS, une suspension de densité optique à 0,9 était réalisée. Elle était équivalente à approximativement 5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. La suspension était ensuite diluée à la concentration désirée pour la colonisation digestive (10<sup>7</sup> UFC/mL) ou l'infection pulmonaire (10<sup>7</sup>



UFC/50 µL). La concentration exacte en bactéries était vérifiée par dilutions successives et étalement sur LB agar. Une concentration bactérienne variant au maximum d'un facteur 2 par rapport à la valeur souhaitée était considérée comme acceptable.

La souche de référence de *Muribaculum intestinale* DSM 28989 a été obtenue auprès du Leibniz Institute DSMZ. Cette souche anaérobie stricte a été cultivée en milieu de Rosenow ainsi qu'en milieu Viande Levures (VL) en atmosphère anaérobie. Elle a servi pour la mise au point de la qPCR *Muribaculaceae*.

### **3.1.2. Modèle murin**

Des souris mâles C57BL/6J (Janviers Labs, Le Genest Saint Isle, France) âgées de 6 à 8 semaines étaient hébergées sous un statut sanitaire EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) dans une animalerie de niveau A2. Une stabulation de 1 semaine après réception des souris était respectée. Les animaux étaient hébergés en cages individuellement ventilées, chaque groupe de 5 souris étant hébergé dans une cage séparée. Le change était réalisé au moins une fois par semaine, dont immédiatement après chaque injection d'antibiotique. Une autorisation du comité d'éthique animale a été obtenue préalablement à ce projet (APAFiS #7166).

## 3.2. Procédures

### 3.2.1. Colonisation digestive

#### Groupe Contrôle

Une injection de 200 µL PBS par voie intrapéritonéale était réalisée à J0 et à J7\*.

#### Groupe Clindamycine

Une injection de clindamycine (10 mg/kg dans 200 µL de PBS) était réalisée par voie intrapéritonéale à J0 et à J7\*.

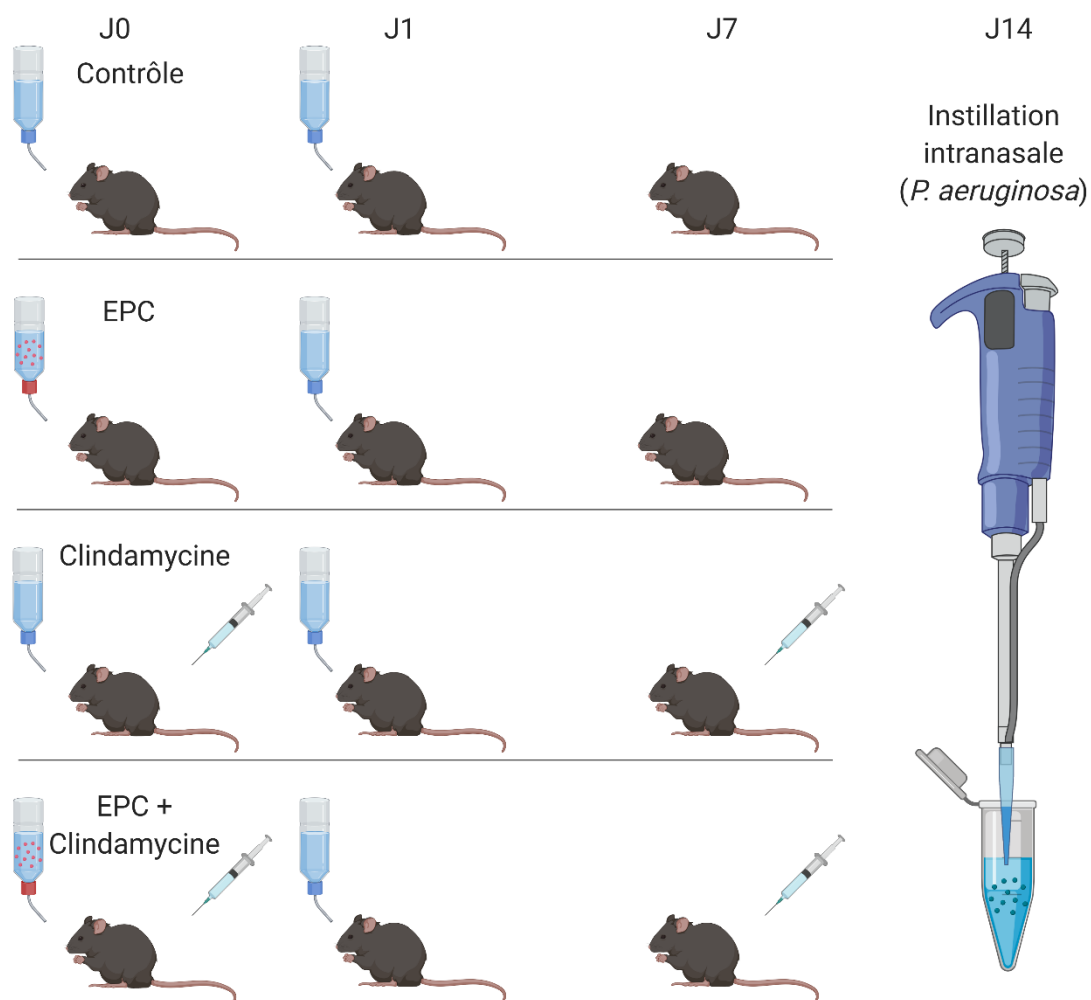
#### Groupe EPC

Les souris étaient exposées à la souche de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase NDM-1 dans l'eau de boisson pendant 24 heures (de J0 à J1), à une concentration de 10<sup>7</sup> UFC/mL. Une injection de 200 µL de PBS par voie intrapéritonéale était réalisée à J0 et J7\*.

#### Groupe EPC+Clindamycine

Une injection de clindamycine (10 mg/kg dans 200 µL de PBS) était réalisée par voie intrapéritonéale à J0. Les souris étaient dans le même temps exposées à la souche de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase NDM-1 dans l'eau de boisson pendant 24 heures (de J0 à J1), à une concentration de 10<sup>7</sup> UFC/mL. L'injection de clindamycine était répétée à J7\* (Figure 33).

\* : pour la mise au point du modèle de colonisation décrite dans le chapitre 4.2, une seule injection de clindamycine était réalisée à J0. À partir du chapitre 4.3 (infection pulmonaire à *P. aeruginosa*), deux injections de clindamycine à J0 et J7 étaient réalisées pour maintenir un haut niveau de concentration en EPC dans les selles.



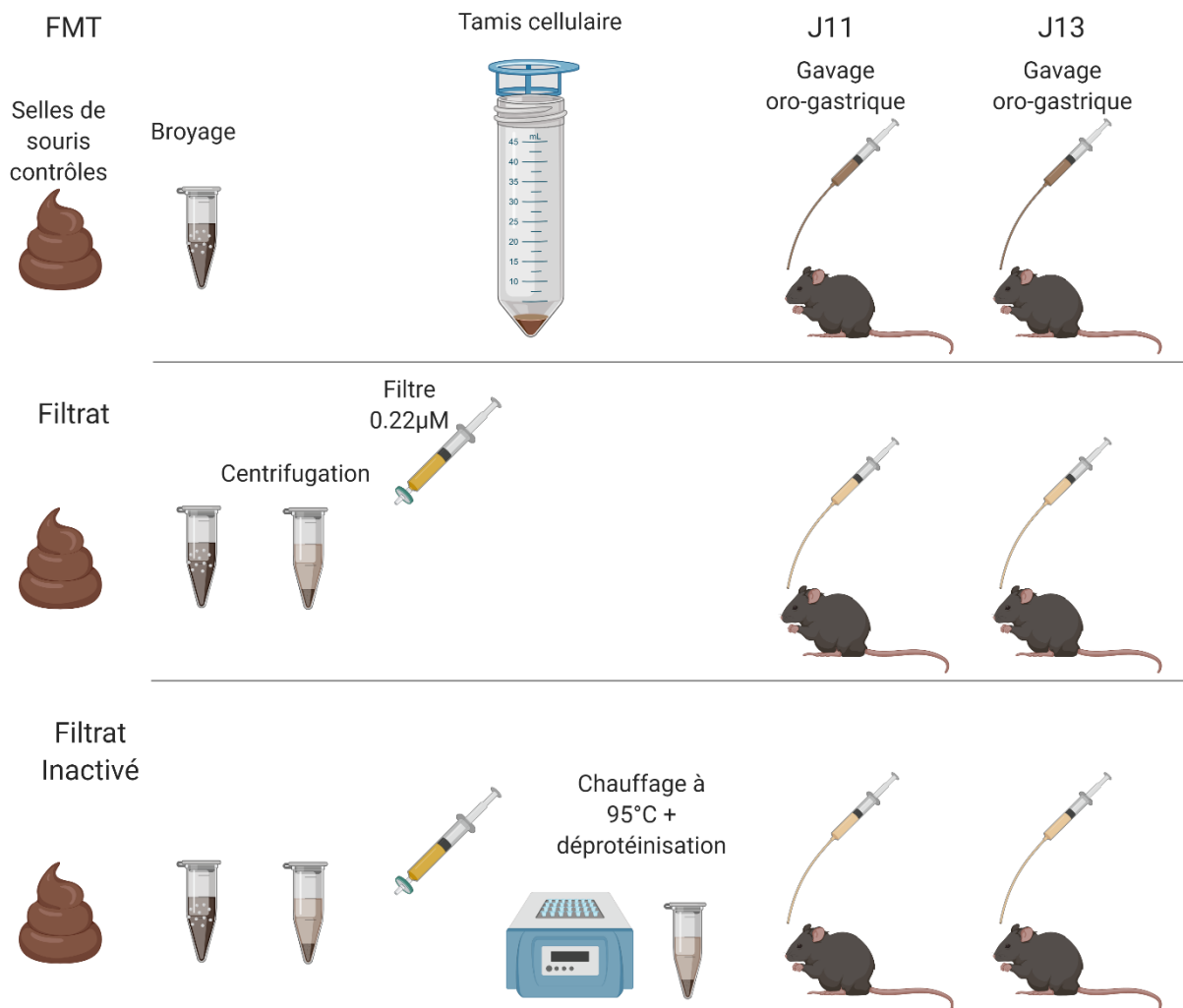
**Figure 33. Schéma expérimental de la colonisation digestive, suivie d'une infection par *P. aeruginosa* (PAO1).** Figure créée à l'aide de BioRender.io (Toronto, Ontario, Canada).

#### Groupe Transplantation de Microbiote Fécal (FMT)

La même procédure que pour le groupe EPC+Clindamycine était réalisée les 10 premiers jours, puis une transplantation de microbiote fécal par gavage orogastrique était réalisée à J11 et J13 (respectivement J-3 et J-1 avant infection par la souche de *P. aeruginosa* PAO1). Des selles de souris contrôles étaient récupérées dans des tubes de 2 mL auxquels étaient ajoutés 500  $\mu$ L de PBS et des billes de silice (2 à 3 selles/tube). Les selles étaient ensuite broyées à l'aide d'un TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Allemagne) et de billes de céramique de 1,4 mm de diamètre, puis filtrées à l'aide d'un tamis cellulaire. Le filtrat était ensuite injecté à l'aide d'une sonde orogastrique souple, pour un volume de 200  $\mu$ L par souris (Figure 34).

### Groupes Filtrat et Filtrat Inactivé

Le groupe « Filtrat » a bénéficié d'une transplantation de filtrats stériles de selles (après filtration par un filtre 0,2 µm), et un groupe « Filtrat Inactivé » a reçu un filtrat stérile ayant en plus été inactivé par chauffage à 95 °C pendant 10 minutes et déprotéinisé par adjonction d'acide trichloracétique (ATCA) puis tamponné à pH 7 avant gavage orogastrique (Figure 34).



**Figure 34. Schéma expérimental de la transplantation de microbiote fécal ou des filtrats de selles.** Pendant les 10 premiers jours, le schéma expérimental est similaire au groupe « EPC + Clindamycine ».

### 3.2.2. Infection pulmonaire et sacrifice

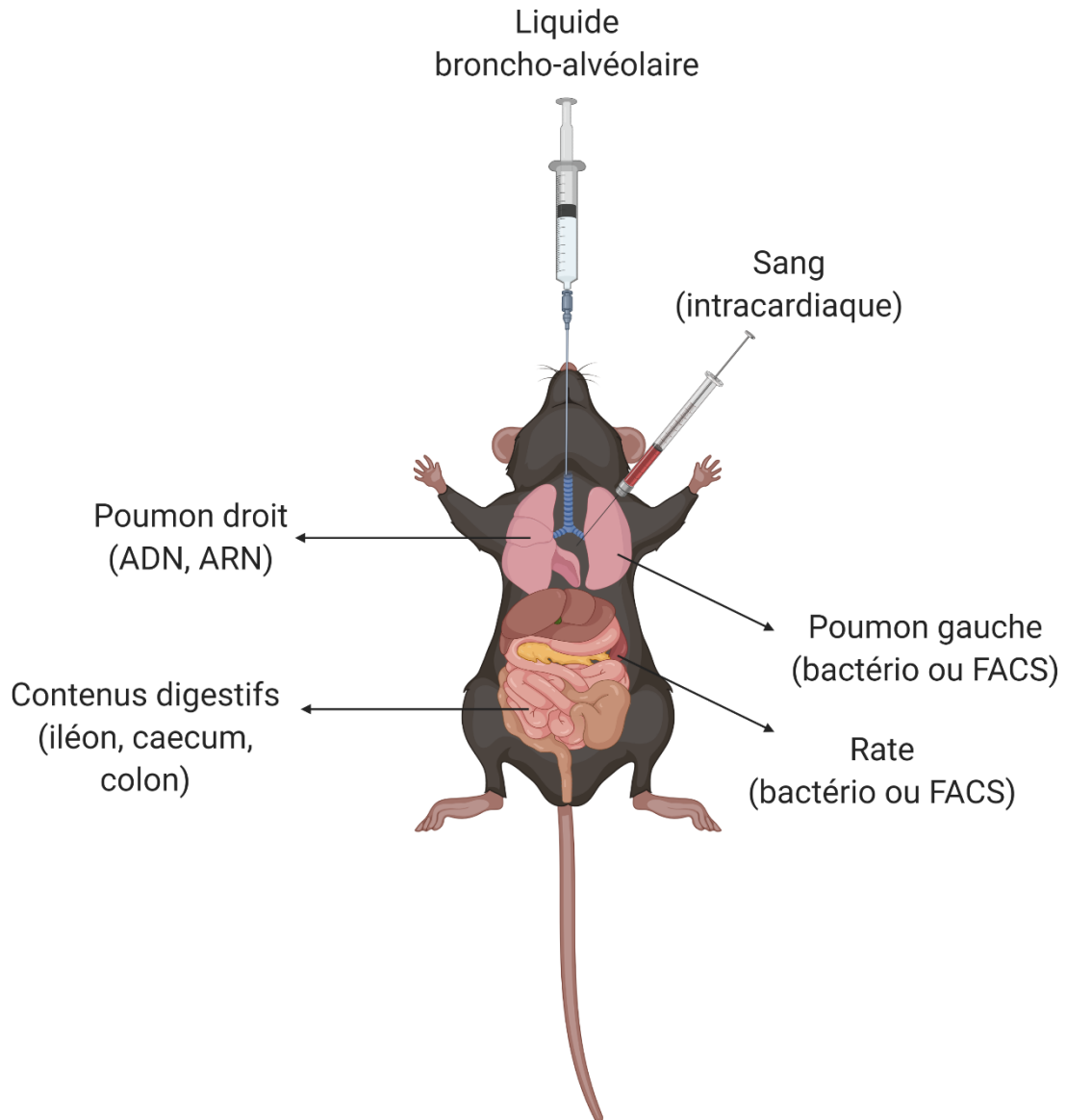
À J14 après le début de l'expérience, une instillation intranasale de  $10^7$  UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 dans 50  $\mu$ L de PBS était réalisée. Les souris étaient anesthésiées par nébulisation d'isoflurane 2 % pendant 2 minutes. Pour les expérimentations où des souris infectées étaient comparées à des souris non infectées (cytométrie en flux), les souris non infectées ont reçu une instillation de 50  $\mu$ L de PBS stérile après la même procédure d'anesthésie. Une surveillance particulière d'une quinzaine de minutes suivant l'acte était réalisée. Dès le réveil des souris avec reprise d'une déambulation, la réintégration de la cage était possible. Dans les 24 heures suivant l'infection, si des signes de détresse respiratoire aiguë ou une perte de poids majeure (>20 %) étaient observés, il était immédiatement procédé à une mise à mort des animaux concernés conformément au protocole d'éthique déposé.

Un score clinique était utilisé pour évaluer la sévérité de l'infection chez les animaux. Il est basé sur plusieurs critères pondérés de 0 à 2 : l'aspect de la fourrure (lisse 0, hérissé 1), le niveau d'activité (très mobile 0, peu mobile 1, prostrée 2) et la température corporelle (normale 0, froide 2).

Les animaux étaient sacrifiés 18 à 24 heures après infection par injection intrapéritonéale de 200  $\mu$ L de pentobarbital sodique (Doléthal®) pour une dose de 182 mg/kg. Tous les échantillons étaient prélevés en post-mortem : sang, liquide broncho-alvéolaire, poumons, rate. Pour certaines expérimentations, les contenus de l'iléon, du cæcum, et du côlon étaient également prélevés. L'autopsie avait lieu sous un poste de sécurité microbiologique de type 2, dans l'animalerie A2.

Les différents types de prélèvements réalisés sont schématisés dans la Figure 35. Le sang était prélevé par ponction intracardiaque, immédiatement après le décès de l'animal. Le liquide broncho-alvéolaire était récupéré en injectant 2 x 800  $\mu$ L de PBS dans les poumons, après avoir inséré un tube métallique dans la trachée en passant par l'oropharynx, et noué un fil autour de la trachée de manière à éviter le reflux. Environ 1 200  $\mu$ L de PBS étaient réaspirés. Les différents organes étaient

prélevés de façon stérile en prenant soin de nettoyer les instruments dans de l'alcool à 70 °C entre chaque prélèvement.



**Figure 35. Types de prélèvements réalisés lors du sacrifice.** FACS = cytométrie en flux.

### 3.2.3. Colite au DSS

Du dextran sodium sulfate (DSS) était ajouté dans l'eau de boisson à une concentration de 3 %. Les souris étaient exposées au DSS pendant les 7 premiers jours, puis de l'eau de boisson standard était mise à disposition pendant les 7 jours suivants.

## **3.3. Méthodes d'analyse**

### **3.3.1. Bactériologie**

#### Calcul de la concentration en EPC et en entérobactéries dans les selles

Les selles de souris été suspendues dans 500 µL de PBS, puis broyées à l'aide de billes de silice à l'aide d'un TissueLyser II. Cinq cents microlitres (500 µL) supplémentaires de PBS étaient ensuite ajoutés pour obtention d'un volume total de 1 mL. Après homogénéisation par vortex, des dilutions successives au 1/10<sup>ème</sup> étaient réalisées, puis 100 µL de chaque suspension étaient étalés sur milieu de culture. Le milieu de culture utilisé pour dénombrer les EPC était un milieu LB agar additionné de 6 mg/L de vancomycine et de 32 mg/L de céfotaxime. Un milieu McConkey était utilisé pour dénombrer les entérobactéries.

#### Calcul de la concentration en *P. aeruginosa* et en bactéries dans les organes

Les organes étaient broyés à l'aide d'un TissueLyser II et de billes de céramique de 1.4 mm de diamètre dans 500 µL de PBS, puis 500 µL supplémentaires de PBS étaient ajoutés. Des dilutions successives au 1/10<sup>ème</sup> étaient réalisées, qui étaient ensuite étalées sur milieu LB, ainsi que sur milieu cétrimide pour dénombrer *P. aeruginosa*.

### **3.3.2. Perméabilité pulmonaire**

Une injection d'albumine-FITC (isothiocyanate de fluorescéine) (200 µL à 2 mg/mL) était réalisée 2 heures avant le sacrifice. Un rapport de fluorescence liquide broncho-alvéolaire divisé par le sang était réalisé à partir des prélèvements faits lors de l'autopsie. Un rapport élevé (> 3 %) était le reflet d'une perméabilité pulmonaire augmentée, et donc témoin d'une infection sévère.

### **3.3.3. Cytométrie en flux**

Les analyses de populations cellulaires par cytométrie en flux ont été réalisées en collaboration avec l'équipe 12 de l'unité INSERM U1019 du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (Dr Philippe Gosset).

Toutes les manipulations décrites ont été réalisées sous poste de sécurité microbiologique de type 2. Le poumon gauche ainsi que la rate étaient prélevés et immédiatement réfrigérés dans de la glace. Le poumon était déposé dans une boîte de Petri stérile, puis haché avec un scalpel à usage unique. Après transfert dans un tube contenant 2 mL de collagénase à 0,1 mg/mL (*Clostridium histolyticum* collagenase C2139, Sigma-Aldrich), la solution était incubée au bain-marie à 37 °C pendant 30 minutes. Les cellules étaient homogénéisées à l'aide d'une seringue 2 mL et d'une aiguille 20 G à 15 min et 30 min d'incubation. Huit millilitres (8 mL) de PBS-2 % de serum de veau fœtal (SVF) étaient ajoutés. La solution était centrifugée à 1 700 RPM pendant 7 minutes à 4 °C. Le surnageant était éliminé. Le culot était repris avec du Percoll 30 % préparé extemporanément. La solution était centrifugée à 2 000 RPM pendant 15 minutes à 4 °C sans frein. Le surnageant était délicatement rejeté. La rate était déposée sur un tamis cellulaire 70 µm préalablement humidifié avec du PBS SVF 2 %, puis broyée mécaniquement à l'aide d'un piston de seringue 2 mL stérile. Le tamis était lavé avec 5 mL de PBS SVF 2 % afin de recueillir un maximum de cellules. Le culot était re-suspendu dans 1 mL de tampon de lyse de globules rouges (RBC Lysis Buffer). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 6 mL de PBS-2 % SVF étaient ajoutés pour stopper la réaction. La solution était centrifugée à 1700 RPM pendant 7 minutes à 4 °C. Le surnageant était éliminé, le culot repris dans 2 mL de milieu RPMI complet additionné d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Un comptage cellulaire en cellule de Malassez était effectué. Une suspension de concentration  $3 \times 10^6$  cellules / 600 µL de RPMI additionné d'antibiotiques était réalisée.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD5 murin, CD1d, NK1.1, CD4, CD25, CD69, TCR $\gamma\delta$ , TCR- $\beta$ , CD45, I-Ab, F4/80, CD103, CD11c, CD86, Ly6G, CD11b, CD45 et CCR2 ont été utilisés. Un cytomètre de flux LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, Californie, États-Unis) a permis d'acquérir les données, qui ont par la suite été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (Stanford, Californie, États-Unis). Les cellules dendritiques cDC1 ont été identifiées comme des cellules CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, et les cDC2 comme des cellules CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>.



### 3.3.4. Métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S

L'analyse métagénomique a été réalisée en collaboration avec le plateau de Génomique fonctionnelle et structurale de l'Université de Lille (Shéhérazade Sebda, Dr Martin Figeac).

L'ADN des différents contenus digestifs (iléon et côlon) était extrait avec un kit d'extraction optimisé pour les prélèvements de selles QIAamp® DNA Stool (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations du fabricant.

La préparation des bibliothèques a été réalisée en amplifiant des régions hypervariables de l'ADNr 16S avec le kit Ion 16S™ Metagenomics, suivie d'une construction des bibliothèques avec le kit Ion Plus Library (Life Technologies, Carlsbad, CA). Les bibliothèques ont été quantifiées et soumises à un contrôle qualité en utilisant Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies). Les bibliothèques ont été mélangées de façon équimolaire et séquencées sur une plateforme Ion PGM avec une puce Ion314 Chip Kit v2 ainsi que le kit Ion PGM Sequencing 400 (Life Technologies). Les fichiers fastq ont été exportés à l'aide du logiciel Ion Reporter.

Le code utilisé pour analyser les données avec Qiime 2 (200) est fourni dans l'Annexe 1. Brièvement, la fonction *denoise-pyro* de *dada2* a été utilisée pour éliminer les erreurs de séquençage, ainsi que pour retirer les 15 premières bases des séquences. Ces valeurs sont recommandées par les développeurs de *dada2* pour analyser des séquences provenant d'Ion Torrent sur Qiime 2. Il n'a pas été possible d'entraîner spécifiquement l'algorithme de classification *classify-sklearn* étant donné que les séquences des amorces utilisées dans le kit Ion 16S™ Metagenomics ne sont pas publiées. L'algorithme de classification *silva-132-99-nb-classifier* déjà préentraîné sur l'intégralité de la séquence de l'ADNr 16S a été utilisé. Cet algorithme est basé sur la classification taxonomique SILVA (201), dont la dernière version 132 a été publiée en décembre 2017. Les *read* correspondant à des séquences contaminantes (*Cyanobacteria*, mitochondries, chloroplastes, eukaryotes) ont été exclus. Les séquences de *Cyanobacteria*, bien qu'appartenant aux bactéries, correspondent en effet fréquemment à de l'ADN de mitochondries ou de chloroplastes (202). Finalement, seuls les *read* correspondant à des

bactéries identifiées au moins au niveau du phylum ont été conservées. L'analyse statistique de variation de composition de microbiote a été réalisée par méthode ANCOM (203). Une *heatmap* a été réalisée en se positionnant sur un niveau correspondant aux familles bactériennes (niveau 5) à l'aide de la fonction *feature-table heatmap* de Qiime 2, en ne conservant que les familles retrouvées dans au moins 500 *read*.

Les données brutes de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S ont été déposées dans *Sequence Read Archive* sous le numéro BioProject PRJNA563864 (Annexe 2). Trente-deux BioSamples correspondant aux 16 prélèvements de côlon et aux 16 prélèvements d'iléon ont été créés (numéros SAMN12691165 à SAMN12691196). Les données seront rendues publiques au 31 décembre 2020 ou à la date de publication de l'article.

### **3.3.5. Mise au point d'une qPCR *Muribaculaceae***

Le couple d'amorces suivant a été sélectionné pour amplifier les *Muribaculaceae* :

- Mb-F (GAGAGTACCTGAAGAAAAAGC)
- Mb-R (ACGCATTCCGCATACTTCT)

Des amorces déjà publiées ont été utilisées pour amplifier l'ADNr 16S d'un grand nombre de bactéries (« universelles ») (204), et un autre couple d'amorces pour amplifier plus spécifiquement les *Bacteroidaceae* (205). Ces 3 couples d'amorces amplifient chacun une partie de l'ADNr 16S.

Le volume final de la réaction de PCR était de 20  $\mu\text{L}$ , comprenant 18  $\mu\text{L}$  de mix et 2  $\mu\text{L}$  d'extrait d'ADN. Le mix de PCR était constitué de 10  $\mu\text{L}$  de mix Brilliant III SYBR® Green QPCR (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis), 0,3  $\mu\text{L}$  de ROX, 3,7  $\mu\text{L}$  d'eau *DNase-free*, 2  $\mu\text{L}$  d'amorce Forward (2  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  d'amorce Reverse (2  $\mu\text{M}$ ). Les réactions d'amplification ont eu lieu sur un automate AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis), en utilisant les conditions suivantes : 95 °C pendant 3 minutes, 40 cycles de 95 °C pendant 5 secondes, et 60 °C pendant 30 secondes. Une courbe de fusion avec une résolution de 0,5 °C était réalisée pour s'assurer de la spécificité des produits amplifiés. Le logiciel Agilent AriaMx était utilisé pour analyser les données, en prenant le ROX comme référence.

Après optimisation de la concentration en amorces et de la température d'hybridation, l'efficacité de la PCR *Muribaculaceae* a été estimée à 93,6 % sur la souche de *M. intestinale* DSM 28989. L'efficacité de la PCR 16S était estimée à 100 % sur cette même souche. La formule utilisée était la suivante, Cq étant le cycle de quantification :

$$\text{Abondance relative en } \textit{Muribaculaceae} = \frac{[(1 + \text{efficacité PCR 16S})^{\text{Cq}}]}{[(1 + \text{efficacité PCR } \textit{Muribaculaceae})^{\text{Cq}}]} * 100$$

Les résultats fournis par la qPCR *Muribaculaceae* ont été validés par rapport aux résultats de séquençage nouvelle génération.

### **3.3.6. Métabolomique**

L'analyse métabolomique ciblée a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille (Dr Marie Lenski, Pr Delphine Allorge). Une méthode de métabolomique ciblée est en cours de développement dans l'unité Fonctionnelle de toxicologie du Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille. Cette méthode permet actuellement la détection de 238 métabolites impliqués dans diverses voies métaboliques majeures telles que la glycolyse, le cycle de Krebs, la voie des pentoses, le métabolisme des acides aminés, ce qui permet un profilage représentatif du métabolome. Ces métabolites ont été sélectionnés en fonction de leur disponibilité sous forme de standards commerciaux.

Les contenus des différents compartiments digestifs ont été récupérés dans des tubes Eppendorf 2 mL dans lesquels 200 µL de PBS et des billes de silice de 0,1 mm de diamètre avaient été ajoutés au préalable. Les tubes ont été pesés avant et après ajout des échantillons pour déterminer le poids de chaque échantillon. Ils ont été broyés à l'aide d'un TissueLyser II. Le volume de PBS ajouté a été normalisé par rapport au volume de selles : pour l'iléon et le côlon le rapport était d'un volume de selles pour 10 volumes de PBS, pour le cæcum le rapport était d'un volume de selles pour 5 volumes de PBS. Les échantillons ont été centrifugés à 13 000 RPM pendant 5 minutes, puis le surnageant a été filtré à l'aide d'un filtre 0,2 µm. Ils ont été conservés à -80 °C jusqu'à analyse.

Les échantillons conservés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ont été décongelés lentement dans de la glace pilée. Chaque échantillon a été homogénéisé au vortex pendant 30 secondes. Cinq microlitres ( $5\text{ }\mu\text{L}$ ) d'étalons internes ( $\beta$ -hydroxyéthyl-théophylline à  $800\text{ ng/mL}$  et méthyl-clonazépam de  $62,5\text{ ng/mL}$ ) ont été ajoutés à  $20\text{ }\mu\text{L}$  de chaque échantillon. Un pool des échantillons à tester a été utilisé comme contrôle de qualité (QC) afin de tester la stabilité analytique au sein d'une série et corriger le signal en cas de fluctuation de réponse. Les flacons échantillons ont été déposés dans l'injecteur maintenu à  $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $10\text{ }\mu\text{L}$ , puis le contenu était injecté dans le chromatographe en phase liquide. L'ordre d'analyse des échantillons a été randomisé pour éviter les biais analytiques et un QC était intercalé tous les 7 échantillons.

La séparation chromatographique a été réalisée sur colonne de type phase inverse Acquity UPLC® HSS T3 ( $150 \times 2,1\text{ mm}$  ;  $1,8\text{ }\mu\text{m}$ , Waters) maintenue dans une enceinte à  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La phase mobile, constituée d'un mélange formate d'ammonium  $5\text{ mM}$  pH 3 (A) et d'acétonitrile avec  $0,1\%$  d'acide formique (B), a été utilisée en mode gradient (**Tableau 3**) le débit est de  $0,4\text{ mL/min}$ . Le temps d'analyse était de 30 minutes.

**Tableau 3. Gradient d'éluion pour l'analyse métabolomique ciblée.**

Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)	Curve
0	97	3	Initial
4	97	3	7
25	3	97	7
27	3	97	7
28	97	3	7
30	97	3	7

Le système chromatographique était couplé à un spectromètre de masse haute résolution G2-XS-QToF (Quadrupole Time-of-Flight, Waters). L'ionisation était faite en mode électrospray positif.

Les paramètres suivants ont été utilisés :

- Température de source : 120 °C
- Gaz de nébulisation : 50 L/H
- Gaz de désolvatation : 1000 L/H
- Température de désolvatation : 600 °C
- Tension des capillaires (inlet et Lockmass) : 0.5 kV
- Tension de cône : 20 V
- Gamme de masse : 50 et 1000 m/z.

L'acquisition en mode MSe :

- basse énergie : 6 eV
- haute énergie : rampe de collision de 10 à 40 eV

Le pilotage de l'appareil et le traitement des données ont été réalisés avec le logiciel Unifi (version 1.8.2, Waters).

Une dérive d'intensité ayant lieu au cours du temps, il a été nécessaire de normaliser les résultats en fonction de leur ordre de passage. Cette normalisation a été réalisée à l'aide de MetaboDrift v1.1 (206). La dérive d'intensité n'a pas engendré de biais dans l'analyse dans la mesure où l'ordre de passage des échantillons était randomisé, et qu'elle a pu être en grande partie corrigée grâce aux 12 contrôles qualité qui ont été répétés au cours de l'analyse pour évaluer la dérive pour chaque métabolite analysé. L'analyse des données normalisées a ensuite été réalisée par MetaboAnalyst v4.0 (207).

### **3.3.7. Métabolites du tryptophane**

Les métabolites du tryptophane ont été dosés en collaboration avec le laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille (Dr Benjamin Hennart, Dr Marie Lenski, Pr Delphine Allorge). Pour déterminer la concentration des métabolites du tryptophane, les mêmes échantillons d'iléon, de cæcum, et de côlon prétraités pour l'analyse métabolomique ont été utilisés. Les concentrations du tryptophane, de la kynurénine, de l'acide kynurénique, de la 3-hydroxykynurénine, de l'antranilate (ou acide anthranilique), du 3 hydroxyantranilate (ou acide 3-hydroxyantranilique), de l'acide xanthurénique, de

l'acide quinaldique, de l'acide 8 hydroxyquinaldique, de l'indole acide lactique, du 5 hydroxyindole acide acétique, de l'indole acide acétique, du 5 hydroxytryptophane, de la sérotonine et de la tryptamine ont été évaluées.

Une procédure analytique basée sur une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par électrospray (LC-ESI/MS/MS) a été utilisée. Cette procédure a été développée en accord avec les méthodes publiées précédemment, avec des modifications mineures (208, 209). Cinquante microlitres (50 µL) de surnageant de contenu digestif ont été analysés après addition de 50 µL d'acétonitrile contenant du tryptophane-D5 à une concentration 50 000 nM, servant de standard interne. Les échantillons ont été vortexés puis centrifugés et le surnageant (50 µL) était ajouté à de l'eau désionisée (600 µL). Quinze microlitres du mélange étaient injectés sur un système UPLC-MS/MS (Xevo TQ-S Detector, Waters, Milford, USA) équipé d'une colonne Acquity HSS C18 (Waters, Milford, USA). Les ions de chaque composant analysé ont été détectés en mode ionisation positive et par méthode MRM (multiple reaction monitoring). Le logiciel Chromalinks (Waters, Milford, USA) était utilisé pour l'acquisition de données et l'analyse.

### **3.3.8. Inférence fonctionnelle à partir de métagénomique ciblée**

PICRUSt2 a été utilisé pour réaliser une inférence de fonctions métaboliques au niveau du microbiote colique à partir des données et métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S (210). Après un prétraitement des données sous Qiime2 (fonction *denoise-pyro* de *dada2*), les séquences représentatives ont été exportées au format FASTA, et une table contenant l'abondance de chaque ASV par échantillon a été exportée au format BIOM. Après analyse par PICRUSt2, des différences inter-groupes pour chaque fonction métabolique ont été recherchées avec STAMP (211), par méthode ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey et application d'une correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples. Une analyse complémentaire de la contribution de chaque ASV dans les modifications de fonction métabolique observées a été réalisée avec PICRUSt2 et R.

### 3.3.9. Analyse statistique

La quasi-totalité des figures et des analyses statistiques a été réalisée sous R (212). Les packages *dplyr* et *tidyr* ont été utilisés pour transformer les données dans une forme exploitable. Les packages *ggplot2*, *ggpubr*, *ggsci* et *gridExtra* ont été utilisés pour générer les différentes figures. Les tests statistiques utilisés étaient soit un test de Student, soit une ANOVA suivie d'une analyse post-hoc lorsque les données étaient paramétriques. Les données non paramétriques ont été transformées en logarithme de base de 10 pour les rendre paramétriques lorsque c'était approprié (charge bactérienne). L'analyse des courbes de survie a été réalisée à l'aide du package R *survival*, en utilisant un test du log-rank. Les analyses statistiques de variation de composition de microbiote ont été réalisées par méthode ANCOM (203). Pour la partie métabolomique ciblée, l'analyse statistique a été réalisée à l'aide de MetaboAnalyst v4.0 (123) : analyse en composantes principales, heatmap, ANOVA, et corrélation.

## 4. Résultats

### 4.1. Caractérisation des souches cliniques d'EPC utilisées

Nous avons d'abord caractérisé les souches d'EPC utilisées par séquençage du génome entier et recherché les déterminants géniques de résistance et de virulence. La prédiction du *sequence type* (ST) et du type capsulaire de la souche ont également permis d'obtenir des informations épidémiologiques.

L'objectif de cette première partie était de choisir une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase, ayant diffusé au niveau mondial, et n'étant pas considérée comme hypervirulente. En effet, nous souhaitons obtenir dans un modèle murin une colonisation digestive durable par EPC, en l'absence de signes d'infection (colite ou bactériémie).

Deux souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémase ont été séquencées : KPL0.1 (productrice de carbapénémase de type OXA-48) et KPL0.2 (productrice de carbapénémase de type NDM-1). Ces deux souches ont été isolées lors de bactériémies : KPL0.1 chez un patient de 77 ans au décours d'une chirurgie digestive, KPL0.2 chez une patiente de 84 ans présentant comme porte d'entrée une pyélonéphrite. La souche KPL0.2 a été utilisée pour la suite de ce travail de thèse.

La caractérisation de ces souches d'EPC a fait l'objet d'une publication dans *Microbiology Resource Announcements* (213) dans un objectif de transparence et de reproductibilité.

Article 1 : (Annexe 3)

**Le Guern R**, Grandjean T, Faure K, Bauduin M, Kipnis E, Dessein R. 2018. Draft Genome Sequences of Two Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Blood Cultures. *Microbiol Resour Announc* 7.



Le génome des deux souches a également été déposé dans DDBJ/ENA/GenBank sous le numéro d'accès QHMA00000000 (KPL0.1) et PYBH00000000 (KPL0.2). Le numéro d'accès SRA est SRP155589.

#### 4.1.1. Souche KPL0.1

Le génome de KPL0.1 est composé de 5 825 823 paires de bases, avec un pourcentage en bases G et C de 56.70 % en moyenne. Au total 5 628 gènes codant pour des protéines ont été annotés. KPL0.1 appartient au *Sequence Type* 307 (ST-307) et possède le locus de capsule de type KL102 (214). ST-307 est décrit comme étant hautement prévalent en Italie (215).

Les gènes de résistance suivants ont été prédits en utilisant ResFinder v3.0 (216) (Tableau 4) :

- cinq gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>SHV-28</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>)
- quatre gènes de résistance aux aminoglycosides [*aac(3)-IIa*, *aph(3) »-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6=)-Ib-cr*]
- cinq gènes de résistance aux fluoroquinolones [*qnrS1*, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*]
- et d'autres gènes de résistances divers (fosfomycine, *fosA* ; phénicolés, *catB4* ; sulfonamide, *sul2* ; triméthoprime, *dfrA14* ; tétracycline, *tetA*).

Les gènes de virulence suivants ont été prédits en utilisant Kleborate, un outil bio-informatique permettant de détecter dans les génomes du genre *Klebsiella* les gènes de virulence de type yersiniabactine et colibactine (ICEKp) (217), aérobactine et salmocheline (218), ainsi que les gènes associés au caractère hypermucoïde (*rmpA* et *rmpA2*).

Un score de virulence 0 à 5 est attribué à chaque isolat par l'outil Kleborate en fonction de la présence des caractères de virulence suivants :

- 0 = absence de locus de virulence détecté
- 1 = seulement yersiniabactine

- 2 = yersiniabactine et colibactine, ou seulement colibactine
- 3 = aérobactine et/ou salmocheline seulement (absence de yersiniabactine ou de colibactine)
- 4 = aérobactine et/ou salmocheline avec yersiniabactine (sans colibactine)
- 5 = yersiniabactine, colibactine et aérobactine et/ou salmocheline.

La souche KPL0.1 obtenait un score de virulence de 0/5 d'après Kleborate. En effet, aucun des gènes de virulence n'était détecté. Les gènes associés au caractère hypermucoïde étaient également absents.

Kleborate confirmait également les résultats de résistance retrouvés avec ResFinder v3.0, et permettait en plus la détection de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones (GyrA-83I; ParC-80I). Ces mutations n'étaient pas détectées par ResFinder, qui n'était pas en mesure de détecter les résistances causées par des mutations chez *Klebsiella* dans sa version 3.0.

**Tableau 4. Principaux gènes de résistances identifiés chez KPL0.1 en utilisant ResFinder v3.0 (216).**

**KPL0.1**

**B-lactamines**

Gène de résistance	Identité (%)	KPL0.1/Réf	Phénotype de résistance	N° d'accession
<i>bla<sub>SHV-28</sub></i>	99,88	861/861	β-lactamines	AF299299
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	100	798/798	β-lactamines	AY236073
<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	100	861/861	β-lactamines	AY458016
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	100	876/876	β-lactamines	AY044436
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	100	831/831	β-lactamines	HQ170510

**Aminoglycosides**

<i>aac(3)-IIa</i>	100	861/861	Aminoglycosides	CP023555
<i>aph(3'')-Ib</i>	99,88	804/804	Aminoglycosides	AF321551
<i>aph(6)-Id</i>	100	837/837	Aminoglycosides	M28829
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100	600/600	Fluoroquinolones Aminoglycosides	DQ303918

**Fluoroquinolones**

<i>qnrS1</i>	100	657/657	Quinolones	AB187515
<i>oqxB</i>	98,57	3153/3153	Quinolones	EU370913
<i>oqxA</i>	98,89	1176/1176	Quinolones	EU370913
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100	600/600	Fluoroquinolones aminoglycosides	DQ303918
<i>qnrB1</i>	100	645/645	Quinolones	DQ351241

### 4.1.2. Souche KPL0.2

Le génome de KPL0.2 est composé de 5 741 089 paires de bases, avec un pourcentage en bases G et C de 56,94 % en moyenne. Au total de 5 570 628 gènes codant pour des protéines ont été annotés. KPL0.2 appartient au *Sequence Type* 147 (ST-147) et possède le locus de capsule de type KL64 (214). Les gènes de résistance suivants ont été prédits en utilisant ResFinder v3.0 (216) (Tableau 5) :

- cinq gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>)
- quatre gènes de résistance aux aminoglycosides [*aac(3)-IIa*, *strA*, *aph(6)-Id*, *aac(6')-Ib-cr*]
- quatre gènes de résistance aux fluoroquinolones [*qnrB1*, *aac(6=)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*]
- et d'autres gènes de résistances divers (fosfomycine, *fosA* ; phénicolés, *catB4* ; sulfonamide, *sul1* ; triméthoprime, *dfrA1* ; tétracycline, *tetA*).

ST-147 a été identifié comme l'un des 3 ST principaux chez *K. pneumoniae* productrices de carbapénémase dans une étude mondiale ; ST-147 est habituellement retrouvé en Inde, en Italie et en Grèce (219). ST-147 fait partie des ST à haut risque de dissémination mondiale (220).

Les gènes de résistance aux antibiotiques ont été déterminés à l'aide de ResFinder v3.0 (216).

KPL0.2 obtenait un score de virulence de 1/5 d'après Kleborate. En effet, seule la présence de yersiniabactine (*ybt* 16; ICEKp12) était détectée. Les gènes associés au caractère hypermucoïde étaient absents.

Kleborate confirmait également les résultats de résistance retrouvés avec ResFinder v3.0, et permettait en plus la détection de mutations associées à la résistance aux fluoroquinolones (*GyrA*-83I ; *ParC*-80I).

**Tableau 5. Principaux gènes de résistances identifiés chez KPL0.2 en utilisant ResFinder v3.0 (216).**

**KPL0.2**

**B-lactamines**

Gène de résistance	Identité (%)	KPL0.1/Réf	Phénotype de résistance	N° d'accension
<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	100	861/861	β-lactamines	AY458016
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	100	876/876	β-lactamines	AY044436
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	100	813/813	β-lactamines	FN396876
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	100	831/831	β-lactamines	HQ170510
<i>bla</i> <sub>SHV-67</sub>	99,77	861/861	β-lactamines	DQ174307

**Aminoglycosides**

<i>aph</i> (3'')-Ib	99.88	804/804	Aminoglycosides	AF321550
<i>aac</i> (6')-Ib-cr	100	600/600	Fluoroquinolones Aminoglycosides	DQ303918
<i>aac</i> (3)-IIa	100	861/861	Aminoglycosides	CP023555
<i>aph</i> (6)-Id	100	837/837	Aminoglycosides	M28829

**Fluoroquinolones**

<i>qnr</i> B1	100	645/645	Quinolones	DQ351241
<i>aac</i> (6')-Ib-cr	100	600/600	Fluoroquinolones Aminoglycosides	DQ303918
<i>oqx</i> B	98,54	3153/3153	Quinolones	EU370913
<i>oqx</i> A	99,49	1176/1176	Quinolones	EU370913

Globalement ces deux souches étaient peu virulentes d'après l'analyse *in silico*, et donc bien adaptées à l'utilisation dans un modèle murin de colonisation digestive. Seule la souche KPL0.2 possédait un gène de virulence porté sur ICEKp. ICEKp est un élément mobile qui contient le locus *ybt* et code pour le sidérophore yersiniabactine. Les sidérophores représentent un facteur de virulence important, car ils améliorent la survie et la réplication de la bactérie chez l'hôte (221).

Pour incorporer du fer, quasiment tous les isolats de *Klebsiella pneumoniae* produisent le sidérophore entérobactine. Cependant, l'entérobactine est inhibée par la lipocaline-2 (Lcn2), présente chez l'homme et également chez la souris. Dans un modèle murin de pneumopathie à *K. pneumoniae*, les souris *Lcn2*<sup>+/+</sup> (phénotype sauvage) présentaient un foyer de pneumopathie circonscrit, alors que chez les souris *Lcn2*<sup>-/-</sup> de nombreuses bactéries étaient retrouvées dans l'espace périvasculaire (222). La yersiniabactine ne se lie pas avec Lcn2, ce qui permet d'améliorer la réplication bactérienne en présence de Lcn2. Ainsi, la yersiniabactine est un facteur de virulence reconnu pour l'infection pulmonaire à *K. pneumoniae* (223). Cependant cet effet est modéré et n'améliore pas la croissance dans le sérum humain ou dans l'urine (224).

La présence de yersiniabactine est très fréquemment retrouvée dans les isolats cliniques : sur 2498 génomes de souches cliniques de *K. pneumoniae*, le gène *ybt* était retrouvé dans 39,5 % des cas (217). La présence de yersiniabactine est retrouvée à la fois chez des souches isolées d'infection ou de colonisation, contrairement aux autres facteurs de virulence de type aérobactine, colibactine, et salmochéline qui étaient retrouvés exclusivement chez des souches isolées d'infection (225).

L'étude EuSCAPE incluant 1722 de *K. pneumoniae* isolées en Europe entre novembre 2013 et mai 2014, qui a été récemment publiée en juillet 2019, ne mentionne pas les caractères de virulence des souches de *K. pneumoniae* dans le manuscrit (162). Cependant, les auteurs ont mis à disposition sur Microreact (226) les données de 1717 souches ([https://microreact.org/project/EuSCAPE\\_Kp](https://microreact.org/project/EuSCAPE_Kp)), parmi lesquelles figurent notamment le caractère infectant ou colonisant de la souche, ainsi que la présence de yersiniabactine. Cette base de données publique nous a permis d'observer que la présence de yersiniabactine n'était pas associée au caractère infectant des souches

isolées (présence chez 43,8 % des souches infectantes contre 46,4 % des souches colonisantes,  $p = 0,55$ ) à l'aide d'un test du  $\chi^2$ . Il faut tout de même noter que dans cette étude 87 % du sous-ensemble des souches dont le statut infectant ou colonisant était connu (1319/1513) étaient responsables d'infection.

Cette première étape de caractérisation des souches est indispensable pour la suite du travail, étant donné qu'il nous paraissait plus judicieux de travailler avec des souches cliniques qu'avec des souches de référence de type *American Type Culture Collection* (ATCC). Les souches de référence présentent le désavantage de ne pas forcément être le reflet de l'épidémiologie hospitalière, sont plus coûteuses (451 € sur ATCC), et ne sont pas caractérisées au niveau des facteurs de virulence.

Pour la mise au point du modèle de colonisation à EPC, nous avons sélectionné la souche KPL0.2, productrice de carbapénémase de type NDM-1 et possédant uniquement la yersiniabactine (score de virulence 1/5). La présence de yersiniabactine semblait intéressante du fait de son caractère extrêmement fréquent (39,5 % des souches cliniques de *K. pneumoniae*) et de l'avantage théorique qu'elle pourrait procurer au niveau de la réplication bactérienne pour obtenir un modèle de colonisation stable dans le temps.

## 4.2. Modèle murin de colonisation à EPC

Une antibiothérapie récente est un facteur de risque majeur de colonisation par EPC chez les patients ayant été potentiellement exposés à une EPC au cours de l'hospitalisation. Cependant, la définition d'une antibiothérapie récente peut varier de 1 jour à 6 mois selon les études. De plus, une antibiothérapie débutée après l'exposition à une EPC pourrait également être un facteur de risque, mais ce point est peu étudié dans la littérature. Nous avons souhaité évaluer la durée de la fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC encadrant l'administration de clindamycine, un antibiotique possédant une forte activité anti-anaérobie.

Pour mettre au point un modèle murin de colonisation par EPC, nous avons d'abord étudié la résistance à la colonisation apportée par le microbiote digestif. En l'absence d'antibiothérapie concomitante, il n'était pas possible d'obtenir une colonisation digestive durable à EPC. Par contre, une fenêtre de susceptibilité à la colonisation de 7 jours encadrant la prise de clindamycine a été mise en évidence. Cette fenêtre de susceptibilité était retrouvée non seulement lorsque l'exposition à l'EPC avait lieu dans les 7 jours précédant l'administration de clindamycine, mais également dans les 7 jours suivants.

La mise au point du modèle de colonisation à EPC et l'étude de la résistance à la colonisation apportée par le microbiote digestif ont fait l'objet d'une publication dans *Antimicrobial Agents Chemotherapy* (227). Cette publication concerne les chapitres 4.2.1 à 4.2.4 uniquement. La vérification de l'absence d'effet délétère de la colonisation par EPC dans le chapitre 4.2.5 n'a pas fait l'objet d'une publication, mais est nécessaire pour la compréhension de la suite du travail.

Article 2 : (Annexe 4)

**Le Guern R**, Grandjean T, Bauduin M, Figeac M, Millot G, Loquet A, Faure K, Kipnis E, Dessein R. 2019. Impact of the Timing of Antibiotic Administration on Digestive Colonization with Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother* 63.



### **4.2.1. Résistance à la colonisation par EPC liée au microbiote digestif**

Le rôle du microbiote digestif dans la résistance à la colonisation par EPC a été évalué. Quatre conditions étaient étudiées :

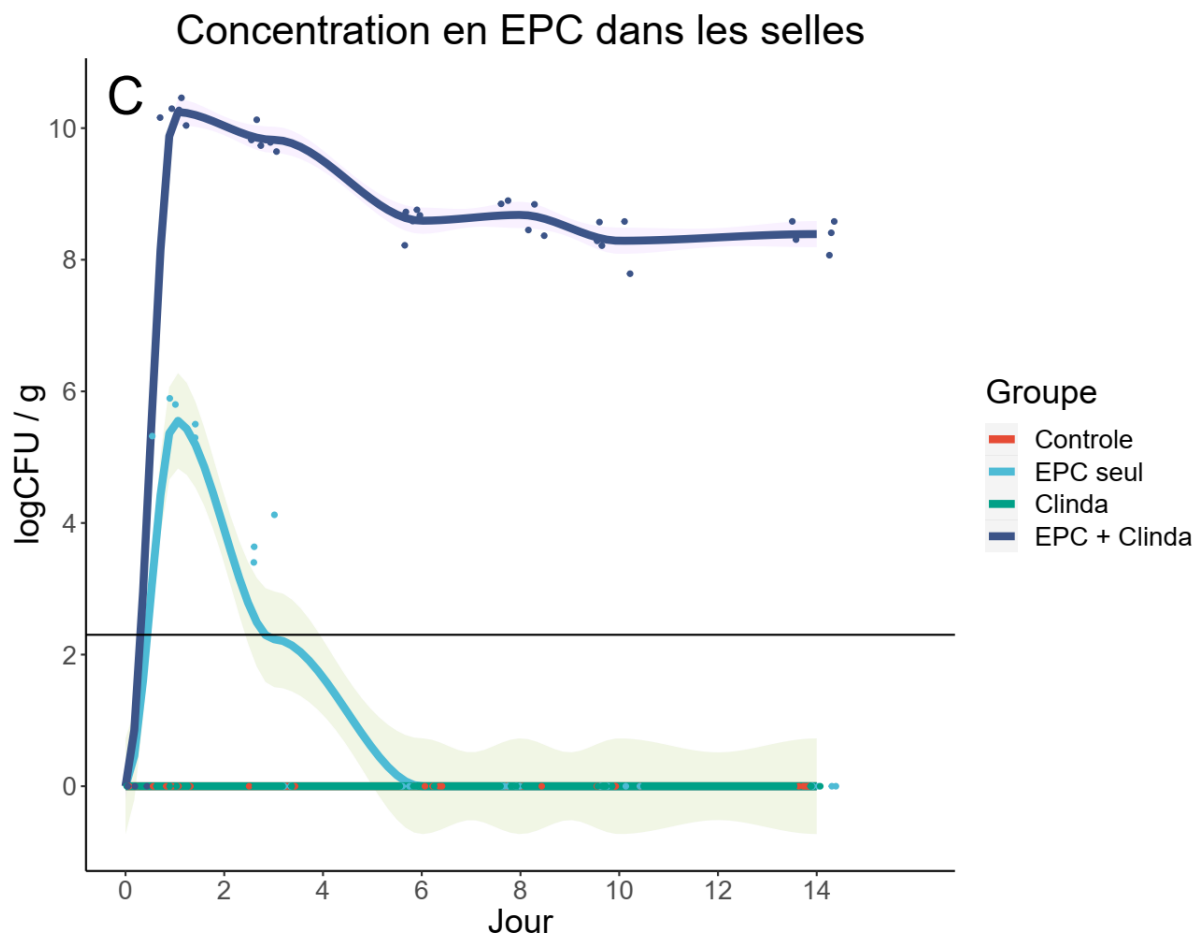
- Groupe contrôle : recevait une injection de PBS stérile à J0, et avait accès à de l'eau de boisson standard.
- Groupe clindamycine : recevait une injection de clindamycine à J0, et avait accès à de l'eau de boisson standard.
- Groupe EPC : recevait une injection de PBS stérile à J0, et était exposé à de l'EPC (souche KPL0.2) dans l'eau de boisson pendant 24 heures puis à de l'eau standard.
- Groupe EPC + Clindamycine : recevait une injection de clindamycine à J0, et était exposé à de l'EPC (souche KPL0.2) dans l'eau de boisson pendant 24 heures puis à de l'eau standard.

Dans ce modèle murin, pour obtenir une colonisation à EPC durable (supérieure à une semaine), il était nécessaire d'injecter de la clindamycine de manière concomitante à l'exposition à l'EPC (Figure 36). En effet, chez les souris exposées uniquement à la souche KPL0.2 dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0 sans injection d'antibiotique, à partir de J4 la concentration en EPC dans les selles était inférieure à la limite de détection, préalablement estimée à 200 UFC/g de selle.

Lorsqu'une injection de clindamycine était réalisée à J0 en même temps que l'exposition à l'EPC (groupe « EPC + Clinda »), on obtenait une colonisation digestive qui se stabilisait entre 8,3 et 8,7 log d'EPC / g de selles au cours de la deuxième semaine (J8 à J14).

En l'absence d'exposition à l'EPC il n'y avait pas d'EPC détectée dans les selles y compris chez les souris ayant reçu de la clindamycine. Ces deux groupes (groupe « Contrôle » et groupe « Clindamycine ») valident les conditions d'hébergement dans des cages séparées, et l'absence de transmission croisée entre les cages.

Ces résultats montrent que le microbiote digestif normal s'oppose à une colonisation durable à EPC dans un modèle murin. C'est le concept de résistance à la colonisation, décrit à de multiples reprises dans la littérature que nous allons discuter dans la suite du document.



**Figure 36. Concentration en EPC dans les selles en fonction du temps.** n=5 souris par groupe. Les groupes « EPC seul » et « EPC + Clinda » ont été exposés à la souche KPL0.2 (*K. pneumoniae* NDM-1) dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0. Les groupes « Clinda » et « EPC + Clinda » ont reçu une injection de clindamycine à J0 (10 mg/kg en intrapéritonéal). La limite de détection a été estimée à 200 UFC/g de selles (ligne horizontale).

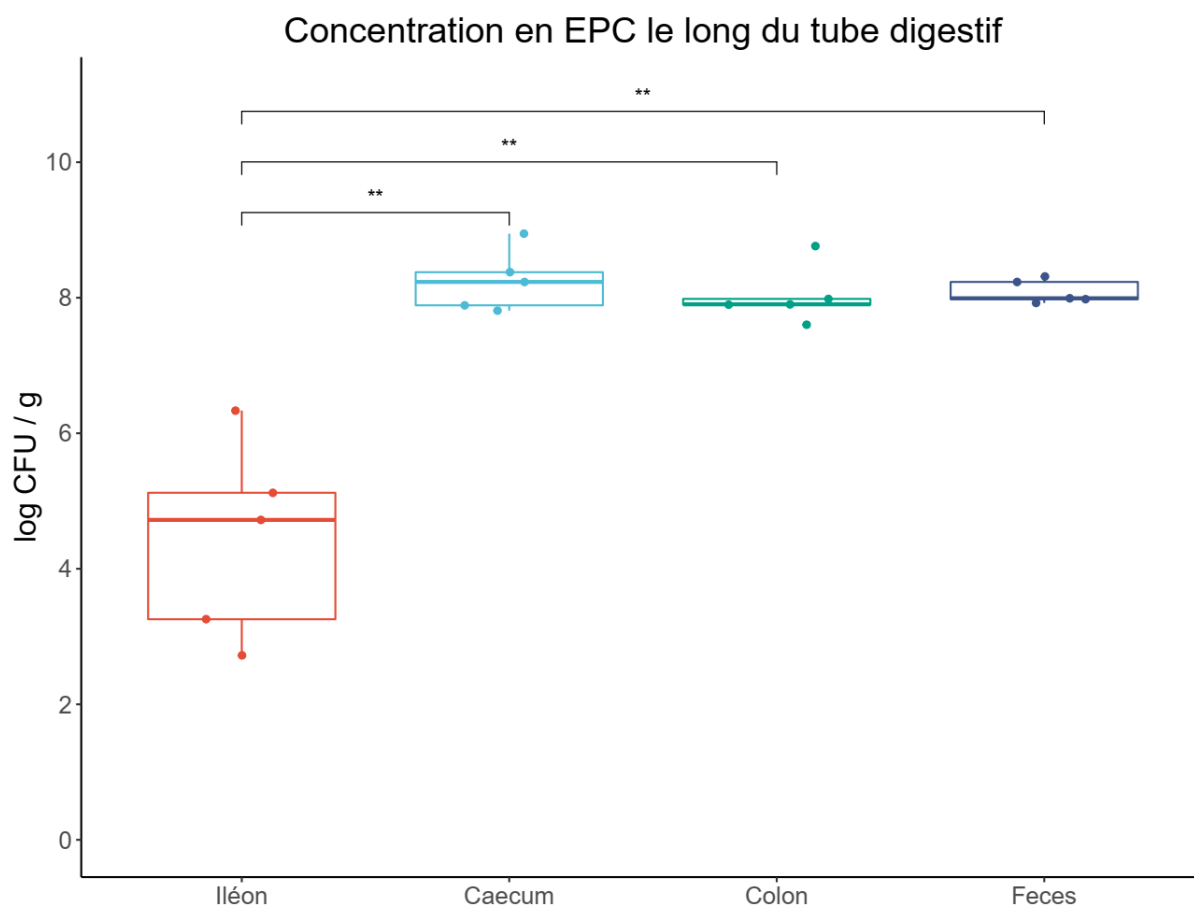
## 4.2.2. Localisation de la colonisation à EPC le long du tube digestif

La colonisation à EPC est le plus souvent étudiée au niveau des selles, car il s'agit d'un prélèvement non invasif. La localisation de la colonisation à EPC le long du tube digestif est peu étudiée. Pourtant, pour explorer l'axe intestin-poumon, il est important d'évaluer la charge bactérienne en EPC non seulement au niveau des fèces, mais aussi au niveau de l'iléon, du cæcum et du côlon. En effet, les effets potentiels sur les cellules immunitaires diffèrent selon le compartiment étudié.

Seul le groupe EPC + Clindamycine a été étudié, car c'était le seul à être colonisé à J14. Les contenus de l'iléon, du cæcum, du côlon ainsi que les fèces ont été prélevés à J14 après sacrifice pour documenter la concentration en EPC le long du tube digestif.

Une concentration plus élevée d'EPC était retrouvée au niveau du cæcum (8,2 log EPC/g contenu  $\pm$  0,5), du côlon (8,0 log  $\pm$  0,4) et des fèces (8,1 log  $\pm$  0,2), par rapport à l'iléon (5,0 log  $\pm$  0,8,  $p < 0,01$ ) (Figure 37).

Ces résultats montrent que la concentration en EPC dans les selles est un bon reflet de la concentration présente au niveau du côlon et au niveau du cæcum. On retrouvait également la présence d'EPC au niveau iléal, même si la charge bactérienne était moins élevée (3 log d'UFC de moins que dans le cæcum, l'iléon, et le côlon). En effet, l'iléon est connu pour être moins favorable à la croissance bactérienne, étant le siège d'une libération abondante de composés antibactériens comme les sels biliaires, et des peptides antimicrobiens synthétisés par les cellules de Paneth (228). Comme la charge bactérienne totale est moins élevée dans l'iléon que dans les autres compartiments, ces résultats sont compatibles avec une colonisation par EPC tout le long du tube digestif. La présence d'EPC au niveau iléal est un résultat intéressant, car la muqueuse iléale contient de nombreuses cellules immunitaires.

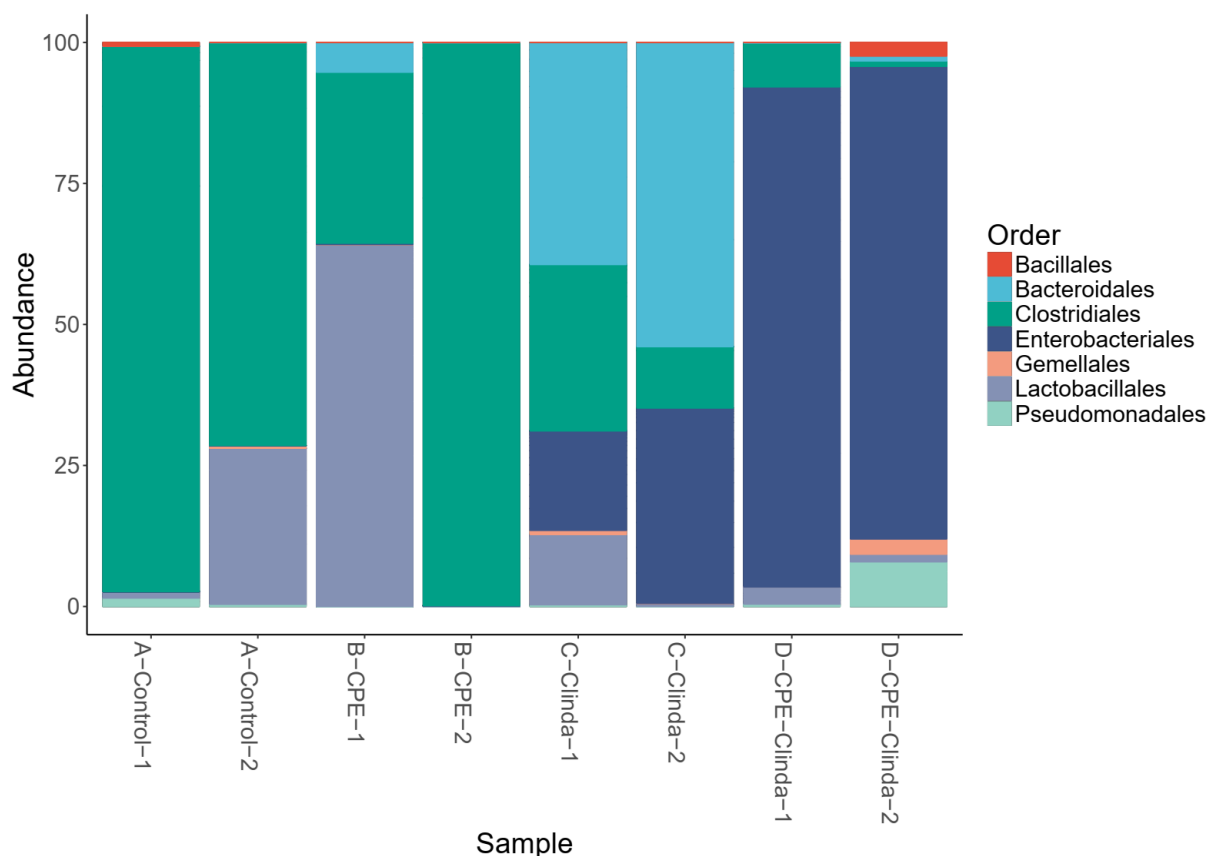


**Figure 37. Concentration en EPC le long du tube digestif pour le groupe EPC + Clindamycine.** n=5 souris par groupe, toutes exposées à la souche KPL0.2 (*K. pneumoniae* NDM-1) dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0, ainsi qu'à une injection de clindamycine à J0 (10 mg/kg en intrapéritonéal) à J0. Les prélèvements des différents compartiments ont été effectués à J15.

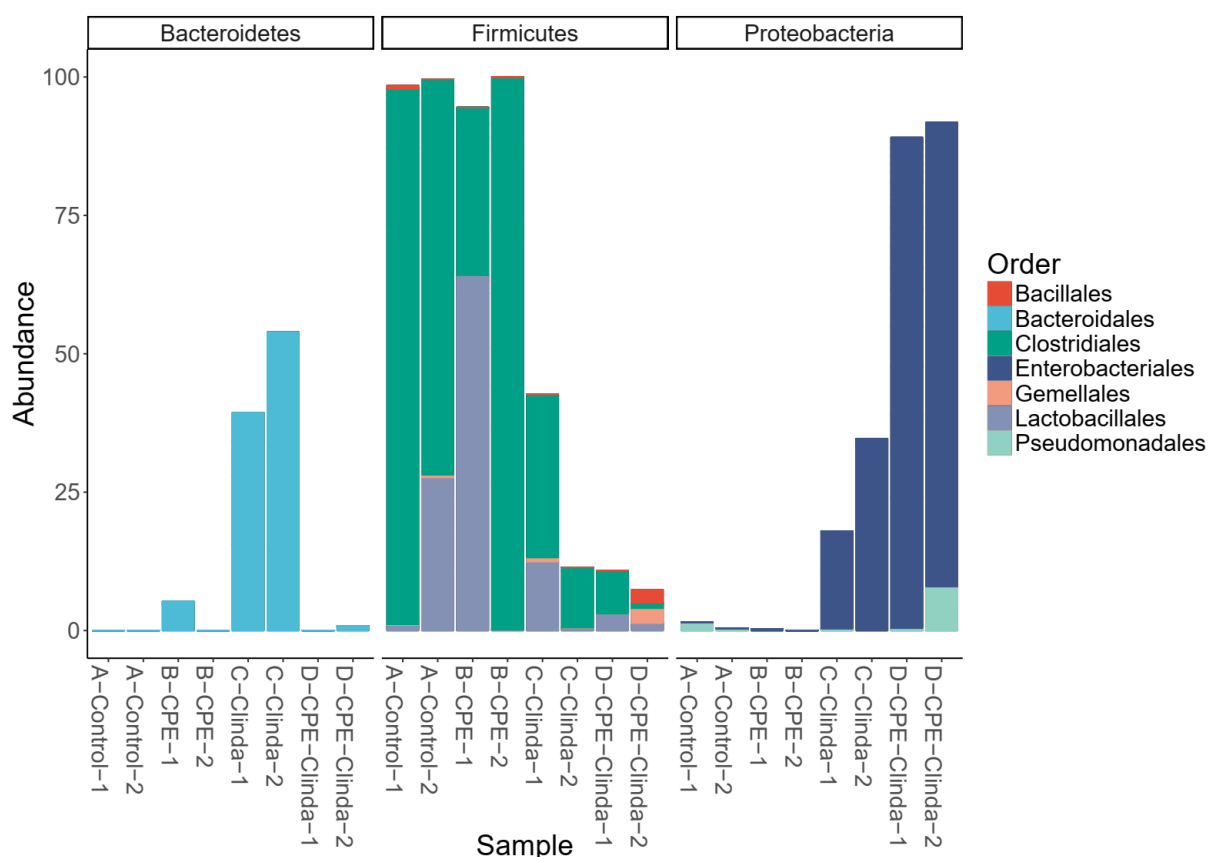
### 4.2.3. Altération du microbiote digestif associée à l'antibiothérapie et à la colonisation par EPC

Les modifications du microbiote associées à l'administration de clindamycine et/ou à l'exposition à l'EPC ont été analysées par métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S. Des échantillons de muqueuse de l'iléon terminal ont été prélevés à J14 dans les 4 groupes cités précédemment (n=2 souris par groupe).

Ces résultats sont représentés sous forme d'abondance relative des différents ordres bactériens détectés : résultats bruts (Figure 38), ou séparés par Phyla (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*) (Figure 39).



**Figure 38. Abondance relative des différents phyla bactériens au niveau d'échantillons d'iléon terminal prélevés à J14.** n=2 souris par groupe. Les groupes « EPC seul » (CPE) et « EPC + Clinda » (CPE + Clinda) ont été exposés à la souche KPL0.2 (*K. pneumoniae* NDM-1) dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0. Les groupes « Clinda » et « EPC + Clinda » (CPE + Clinda) ont reçu une injection de clindamycine à J0 (10 mg/kg en intrapéritonéal).



**Figure 39. Abondance relative des différents phyla bactériens au niveau d'échantillons d'iléon terminal prélevés à J14, séparés selon les 3 phyla principaux (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*). n=2 souris par groupe.**

L'exposition à l'EPC dans l'eau de boisson pendant 24 heures, sans injection associée de clindamycine, n'altérerait pas le microbiote digestif 14 jours après l'arrêt de l'exposition par rapport aux souris contrôles. Dans ces deux groupes « Contrôle » et « EPC », on retrouvait au niveau iléal plus de 90 % des séquences d'ADNr 16S classées en tant que *Firmicutes* (*Clostridiales* ou *Lactobacillales*).

L'administration de clindamycine, sans exposition à l'EPC, provoquait une augmentation des *Bacteroidetes* (45 %) et des *Proteobacteria*, appartenant majoritairement à l'ordre *Enterobacteriales* (26 %).

L'administration de clindamycine associée à une exposition à l'EPC pendant 24 heures provoquait une expansion majeure des *Proteobacteria* (84 %), appartenant

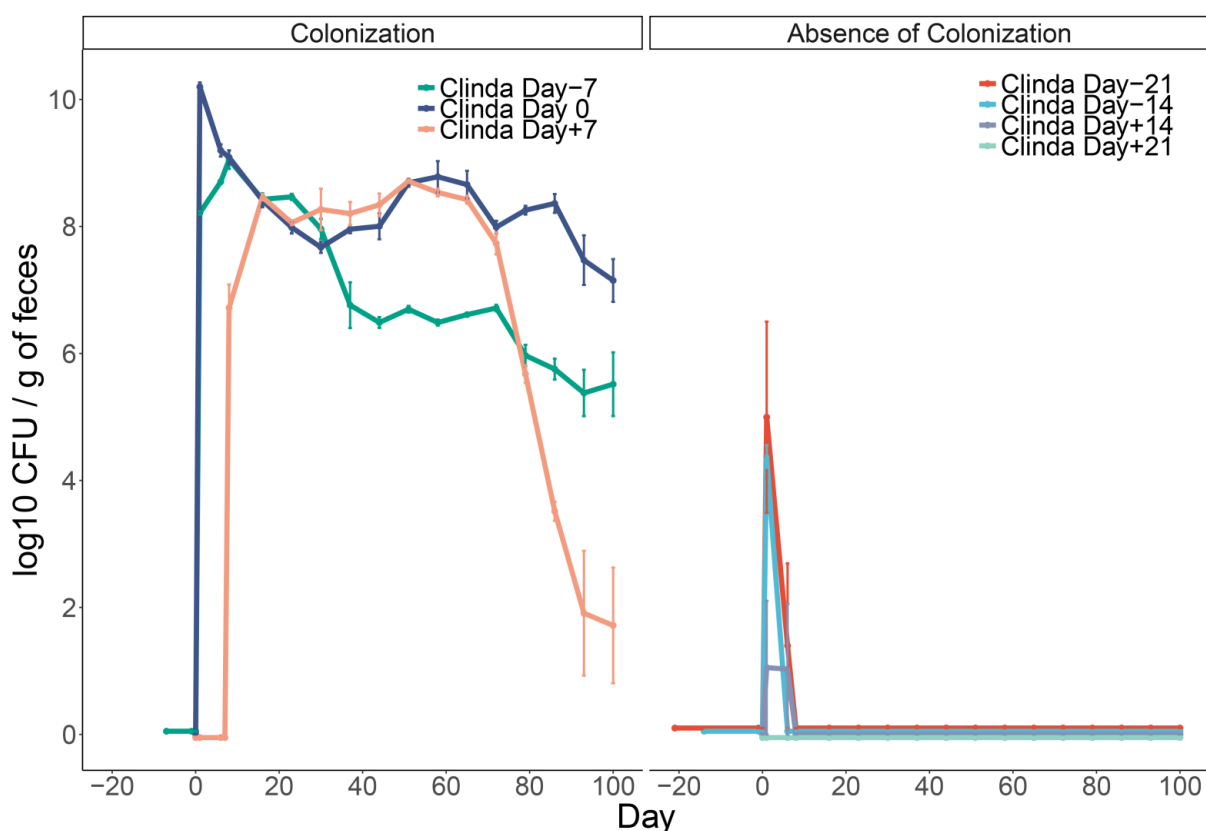
majoritairement à l'ordre *Enterobacteriales* (76 %). Les entérobactéries étant naturellement résistantes à la clindamycine, l'injection de clindamycine permettait leur expansion.

Ces résultats suggèrent un rôle des bactéries anaérobies appartenant à l'ordre *Clostridiales* dans la résistance à la colonisation par EPC. Cependant, ces résultats uniquement descriptifs ne concernaient que la muqueuse iléale, avec un faible nombre de souris par groupe ne permettant pas d'analyse statistique. Il serait nécessaire d'évaluer également les microbiotes iléal et colique de façon dynamique sur un plus grand nombre d'individus pour pouvoir conclure.

#### 4.2.4. Existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC encadrant l'administration de clindamycine

L'objectif principal était de rechercher l'existence d'une fenêtre de susceptibilité encadrant l'administration de clindamycine, et d'évaluer sa durée.

Sept groupes de 3 souris (n=21) ont été étudiés. Tous les individus ont été exposés à l'EPC dans l'eau de boisson à J0, mais l'administration de clindamycine a été réalisée à des temps différents par rapport à l'exposition à l'EPC selon les groupes : J-21, J-14, J-7, J0, J+7, J+14, J21 (Figure 40).



**Figure 40. Concentration en EPC dans les selles de souris en fonction du temps et du délai entre l'exposition à l'EPC et l'injection de clindamycine. n=3/groupe. Toutes les souris ont été exposées à l'EPC dans l'eau de boisson à J0, mais elles ont reçu**



une injection de clindamycine à des temps différents par rapport à l'exposition à l'EPC : J-21, J-14, J-7, J0, J+7, J+14, J21.

L'administration de clindamycine dans la semaine avant ou après l'exposition à l'EPC était nécessaire pour obtenir une colonisation digestive. Cette colonisation digestive persistait alors plus de 3 mois. En effet, lorsque l'injection de clindamycine avait lieu trop longtemps avant l'exposition à l'EPC (J-21 ou J-14), ou trop longtemps après (J+14 ou J+21), on n'observait pas de colonisation digestive durable. Ces résultats suggèrent une absence de persistance d'EPC en dessous de la limite de détection (< 200 UFC/g de selle) 14 jours après l'exposition, car elle aurait été démasquée par l'administration de clindamycine, un antibiotique provoquant une expansion majeure des *Enterobacteriales*.

La résistance à la colonisation induite par le microbiote digestif est un concept ancien, dont l'un des pionniers a été van der Waaij. En 1971, il formulait déjà l'hypothèse selon laquelle la résistance à la colonisation était apportée par des espèces anaérobies du tube digestif, appartenant selon lui principalement au genre *Clostridium* (229). D'après lui, les bactéries du genre *Bacteroides* ou *Lactobacillus* présentes dans le microbiote digestif des souris ne permettaient pas de résister à la colonisation par des entérobactéries telles que *Escherichia coli* ou *K. pneumoniae*. Cependant, ses conclusions sont aujourd'hui à réévaluer du fait des techniques de l'époque reposant uniquement sur la culture, des difficultés d'identification bactérienne et par la taxonomie des anaérobies ayant été largement modifiée depuis. Une étude plus récente utilisant également des techniques de culture conventionnelles montrait que l'administration d'antibiotiques permettait d'obtenir une colonisation par *E. coli* producteur de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu, que ces antibiotiques présentent un effet sur les *Bacteroides* (clindamycine), ou non (céfuroxime, dicloxacilline) (169).

Ces résultats sont cohérents avec les études cliniques s'intéressant au risque d'acquisition de bactéries multirésistantes pendant un voyage à l'étranger. Alors que le taux de colonisation par des *Enterobacteriaceae* multirésistantes était de 51 % au retour de voyage, seulement 5 % des individus restaient colonisés 3 mois après (230). Dans cette population de voyageurs sains, 10 % ont été exposés à des antibiotiques pendant leur voyage. La plupart de ces études sur des voyageurs s'intéressent à l'acquisition d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu, et à l'heure actuelle on

retrouve peu d'études sur l'acquisition d'entérobactéries productrices de carbapénémase telles que NDM-1. Au total, l'utilisation d'antibiotiques pendant le voyage est un facteur de risque majeur d'acquisition de bactéries multirésistantes (231). Le microbiote digestif normal semble protéger les voyageurs exposés à des bactéries multirésistantes (232).

Dans un contexte de mésusage d'antibiotiques pouvant atteindre 50 % des prescriptions hospitalières, éviter la diffusion épidémique des EPC requiert des politiques de bon usage des antibiotiques, en plus des mesures d'hygiène. Notre modèle suggère que la simple notion binaire d'exposition à des antibiotiques (oui ou non) n'est pas le paramètre le plus informatif permettant d'expliquer la survenue de colonisation après exposition à une EPC. Le délai entre l'administration d'antibiotique relatif à l'exposition à l'EPC pourrait être le facteur principal expliquant la survenue d'une colonisation. Il s'agit d'un paramètre qui pourrait être pris en compte dans les stratégies d'hygiène et de bon usage des antibiotiques. En effet, nos résultats sont compatibles avec l'existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation encadrant la prise d'antibiotique. Cette fenêtre de susceptibilité était évaluée à 7 jours dans notre modèle murin, mais elle dépend probablement de la nature du ou des antibiotiques reçus, et de leur activité anti-anaérobie.

La transposition de résultats d'un modèle murin à des patients est toujours délicate. Néanmoins, il paraît important de limiter au maximum la prescription d'antibiotiques possédant une forte activité anti-anaérobie lorsqu'elle n'est pas nécessaire. Une des pistes de travail potentielles pourrait être les patients allergiques à la pénicilline. En effet, en cas de prophylaxie chirurgicale, la clindamycine est fréquemment utilisée à la place de la céfazoline d'après les recommandations de la Société Française d'Anesthésie Réanimation. Certes il ne s'agit que d'une prophylaxie (une dose unique de 900 mg de clindamycine), mais ce schéma est identique à celui utilisé dans notre modèle murin (une administration de 10 mg/kg de clindamycine). La notion d'allergie à la pénicilline est fréquente, 10 % des adultes rapportant une allergie à la pénicilline. Cependant en pratique, 90 % des adultes se déclarant allergiques à la pénicilline ne le sont pas réellement et pourraient recevoir une  $\beta$ -lactamine telle que la céfazoline, qui présente très peu d'allergies croisées. La céfazoline altère peu le microbiote digestif (233), contrairement à la clindamycine. Un exemple d'intervention que nous avons menée pour

optimiser la prescription d'antibiotiques chez les patients se disant allergiques à la pénicilline (234) est détaillé dans la discussion.

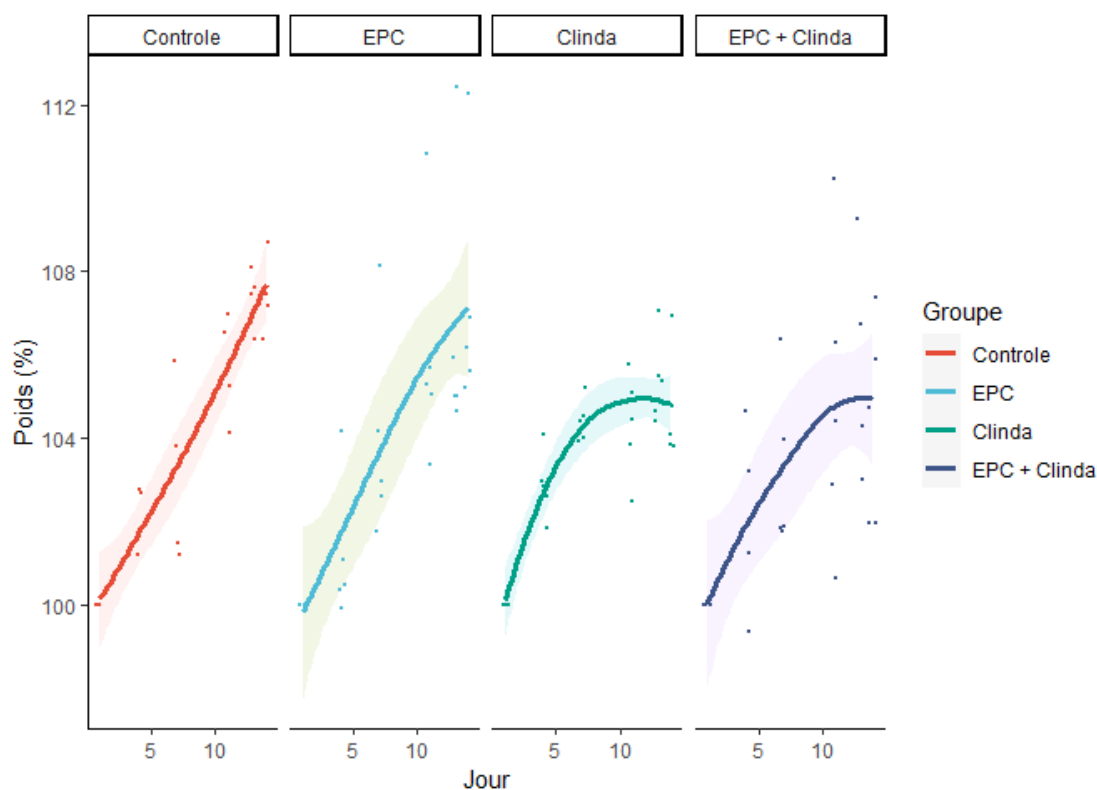
Chez les patients qui ont potentiellement été exposés à une EPC pendant leur hospitalisation et qui sont étiquetés « contact EPC », il conviendrait également de limiter au maximum toute prescription d'antibiotique superflue. En effet, dans notre modèle murin non seulement l'antibiothérapie dans la semaine précédente était associée à une colonisation par EPC à long terme ; mais le même phénomène était observé lorsque l'antibiotique était administré dans les 7 jours suivants. Grâce à la résilience apportée par le microbiote digestif, un patient qui aurait été exposé à une EPC lors des soins aurait une probabilité plus élevée de résister à la colonisation en l'absence d'antibiothérapie.

## 4.2.5. Vérification de l'absence d'effet délétère d'une colonisation par EPC

Dans le cadre de la mise au point d'un modèle de colonisation à EPC, le caractère colonisant (et non infectant) de la souche d'EPC implantée a été vérifié. Ces contrôles sont primordiaux pour la compréhension de la suite du travail réalisé. Pour cela, l'absence de colite a été vérifiée (suivi du poids, analyse de la perméabilité intestinale) puis une translocation digestive au niveau de la rate a été recherchée. Pour maintenir des niveaux d'EPC élevés dans les selles, deux injections de clindamycine à J0 et J7 seront utilisées à partir de maintenant, au lieu d'une seule injection à J0.

### Courbes de poids

On observe une légère inflexion de la prise de poids chez les souris ayant reçu de la clindamycine (qu'elles aient ou non été colonisées à EPC) (Figure 41).



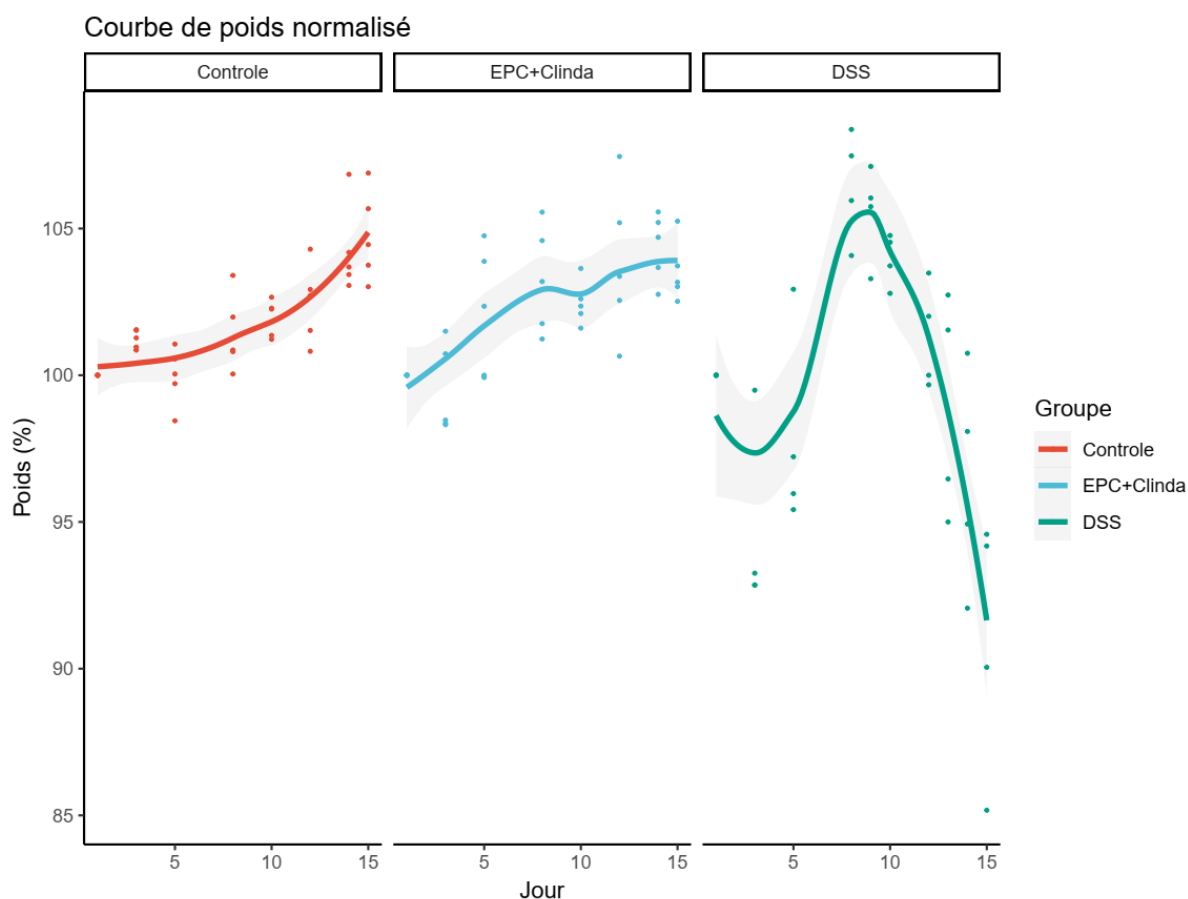
**Figure 41. Courbes de poids en fonction du temps.** n=5 souris par groupe. Les groupes « EPC » et « EPC+Clindamycine » ont été exposés à la souche KPL0.2 (*K. pneumoniae* NDM-1) dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0. Les groupes « Clinda »

et « EPC+Clindamycine » ont reçu une injection de clindamycine à J0 et à J7 (10 mg/kg en intrapéritonéal).

## Perméabilité intestinale

Pour rechercher des modifications de la perméabilité intestinale, les souris « contrôle », « EPC + Clindamycine » et un témoin positif de colite au Dextran Sulfate Sodium (DSS) ont été comparés.

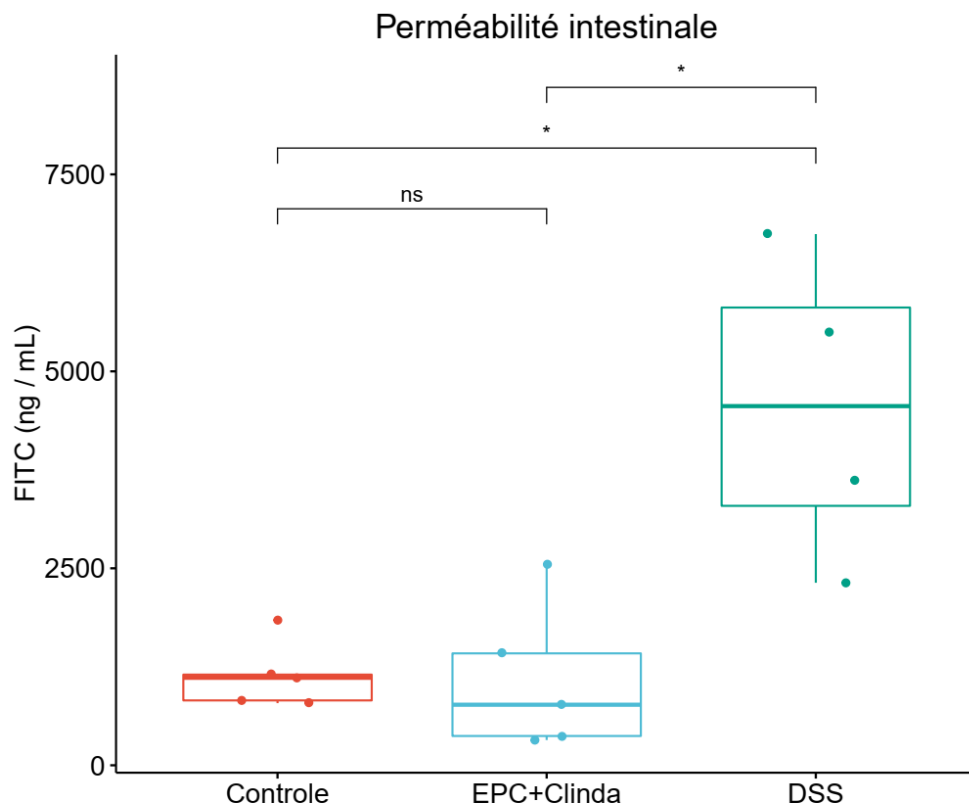
Après exposition à du DSS à 3 % dans l'eau de boisson pendant les 7 premiers jours, on observait une perte de poids très importante (Figure 42). Un des individus du groupe DSS est décédé de colite à J14.



**Figure 42. Courbe de poids en fonction du temps.** n=5 souris par groupe. Le groupe « EPC + Clindamycine » a été exposé à de l'EPC dans l'eau de boisson pendant les 24 premières heures, et a reçu une injection de clindamycine à J0 et à J7. Le groupe DSS a été exposé à du DSS à 3 % dans l'eau de boisson pendant les 7 premiers jours.

La perméabilité intestinale était évaluée en mesurant les taux sériques en FITC-Dextran à l'aide d'un spectrophotomètre, 4 heures après un gavage orogastrique de 600 mg/kg de FITC-dextran.

La perméabilité intestinale était similaire dans les groupes « contrôle » et « EPC + Clindamycine », après gavage orogastrique de FITC. Seul le groupe « DSS » présentait une perméabilité intestinale augmentée (Figure 43).



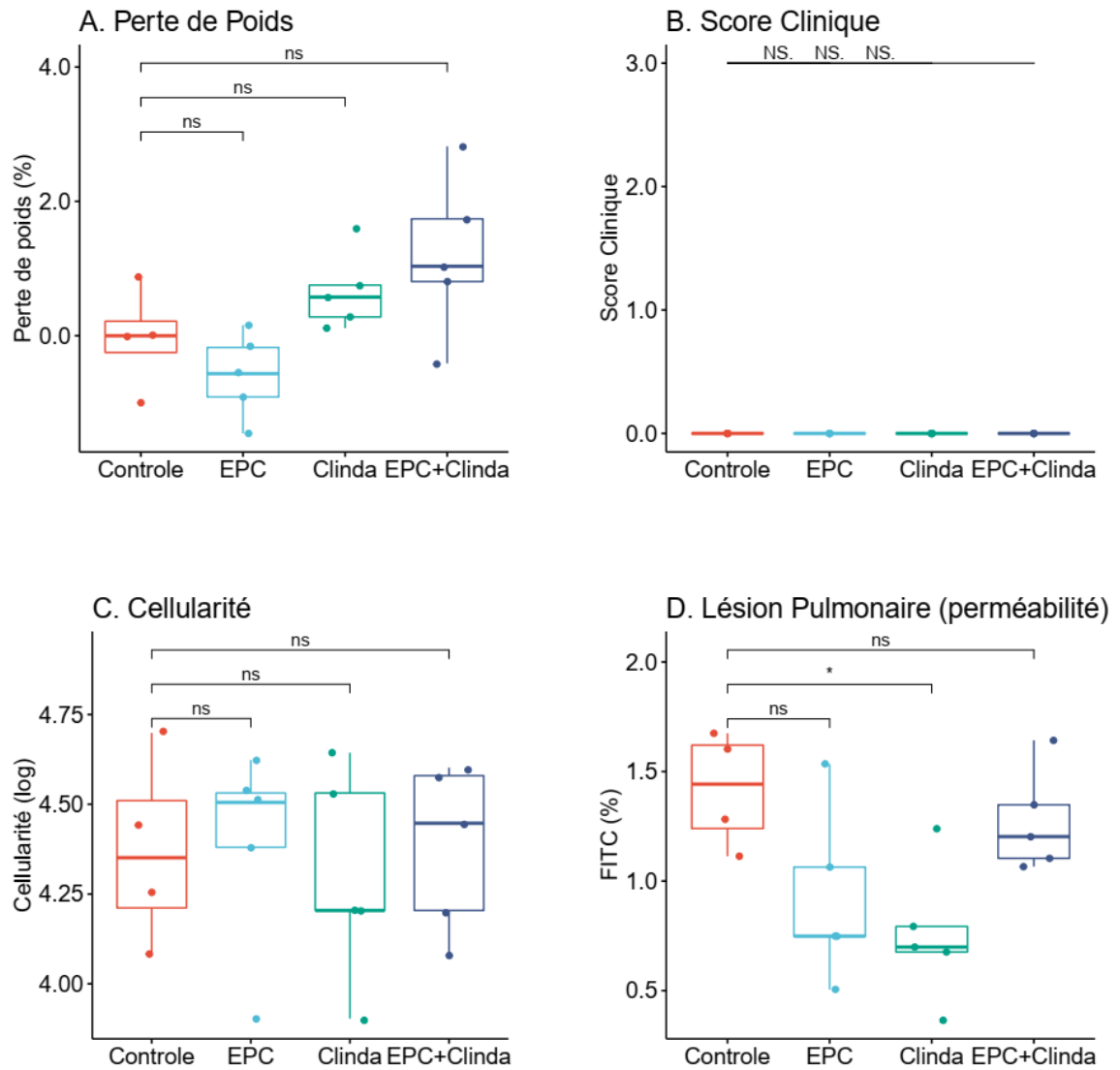
**Figure 43. Perméabilité intestinale.** n=5 souris par groupe. 1 souris du groupe DSS est décédée de colite à J14.

## Score de gravité clinique et perméabilité pulmonaire

Finalement, l'absence de translocation digestive d'EPC a été recherchée au niveau de la rate. Cette expérimentation était également l'occasion de déterminer les valeurs de score de gravité clinique, de cellularité dans le LBA, de perméabilité pulmonaire et de concentration bactérienne dans le poumon retrouvée à l'état de base chez des souris non infectées. Les figures suivantes sont réalisées en l'absence d'infection pulmonaire par *P. aeruginosa*. Seul l'effet de l'exposition à la souche d'EPC et/ou à la clindamycine est considéré.

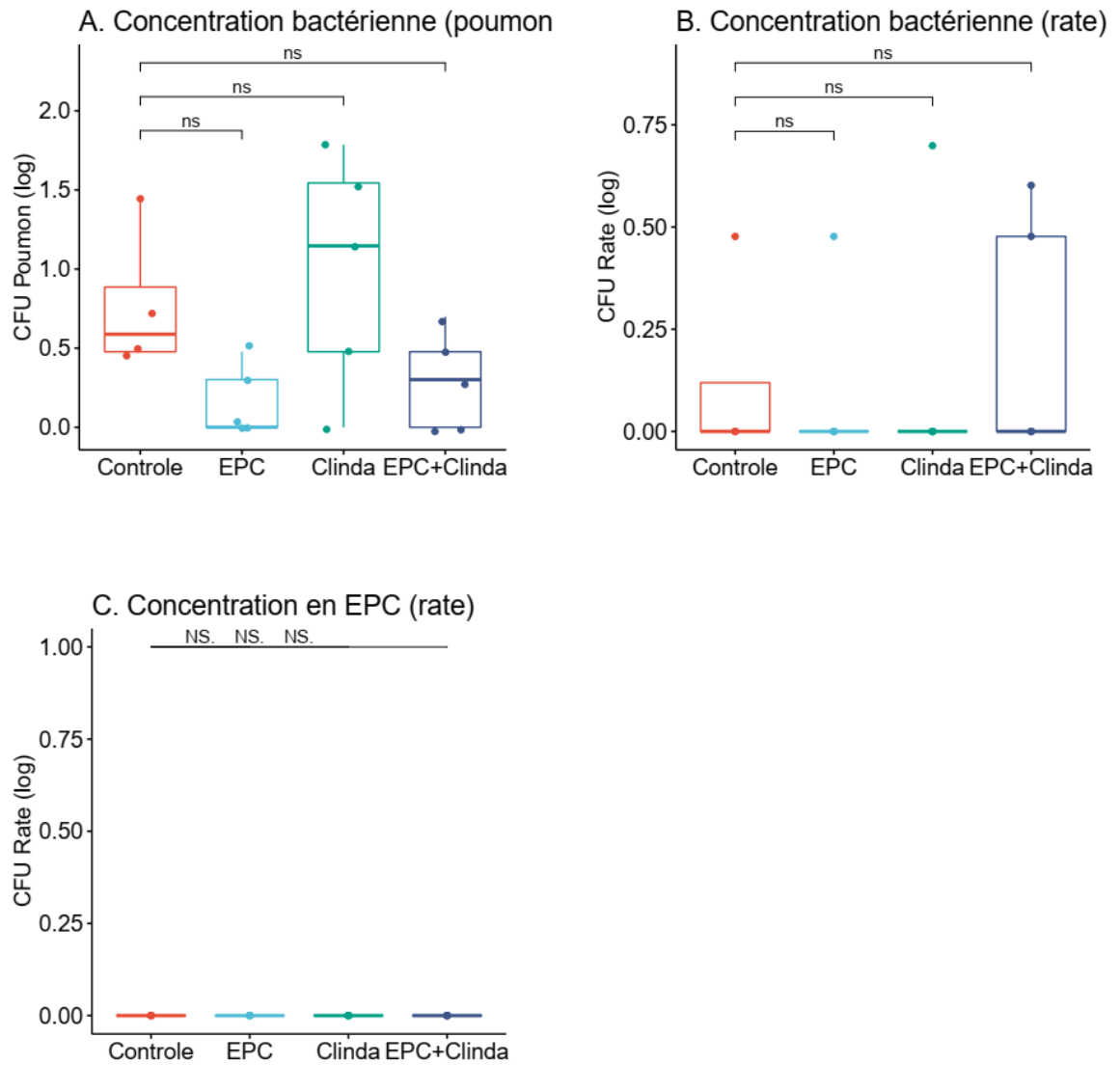
Comme attendu, on n'observait pas de perte de poids entre le jour de sacrifice et la veille, le score de gravité clinique était noté à 0 pour tous les individus, et la perméabilité alvéolo-capillaire était basse (inférieure à 2 % chez tous les individus). On retrouvait une diminution significative de la perméabilité alvéolo-capillaire dans le groupe clindamycine par rapport au groupe contrôle, néanmoins cela pourrait être lié au nombre de tests statistiques réalisés (inflation du risque alpha).

On ne retrouvait pas d'EPC dans le poumon et dans la rate. Quelques colonies d'*Enterococcus* étaient parfois retrouvées dans la rate, mais inférieures à 1 log d'UFC. Cela pourrait correspondre soit à une translocation digestive lors du décès par injection de pentobarbital, soit à une faute d'asepsie d'un opérateur au moment du prélèvement. Le cæcum étant distendu chez les souris ayant reçu de la clindamycine (indépendamment de l'exposition à l'EPC), il est plus facile de le léser lors de l'autopsie.



**Figure 44. Réponse des souris 18 heures après instillation intranasale de 50  $\mu$ L de PBS stérile.** n=5 souris par groupe. A : perte de poids entre J14 et J15 d'après la formule  $(\text{PoidsJ14} - \text{PoidsJ15}) / \text{PoidsJ14} \times 100$ . B : Score de gravité clinique (aspect fourrure, mobilité, température). C : Cellularité du liquide broncho-alvéolaire (LBA). D = Lésion pulmonaire déterminée par le rapport  $(\text{Fluorescence du LBA}) / (\text{Fluorescence du sérum}) \times 100$ , de l'albumine-FITC ayant été injectée par voie intrapéritonéale 2 heures avant sacrifice.





**Figure 45. Résultats microbiologiques 18 heures après instillation intranasale de 50  $\mu$ L de PBS stérile.** n=5 souris par groupe. A : Concentration bactérienne en *P. aeruginosa* dans le poumon gauche. B : Concentration bactérienne (toutes bactéries confondues) dans la rate. C : Concentration bactérienne en EPC dans la rate.

## **4.3. Impact de la colonisation à EPC sur la pneumopathie à *P. aeruginosa***

### **4.3.1. Impact de la colonisation à EPC sur la sévérité de la pneumopathie**

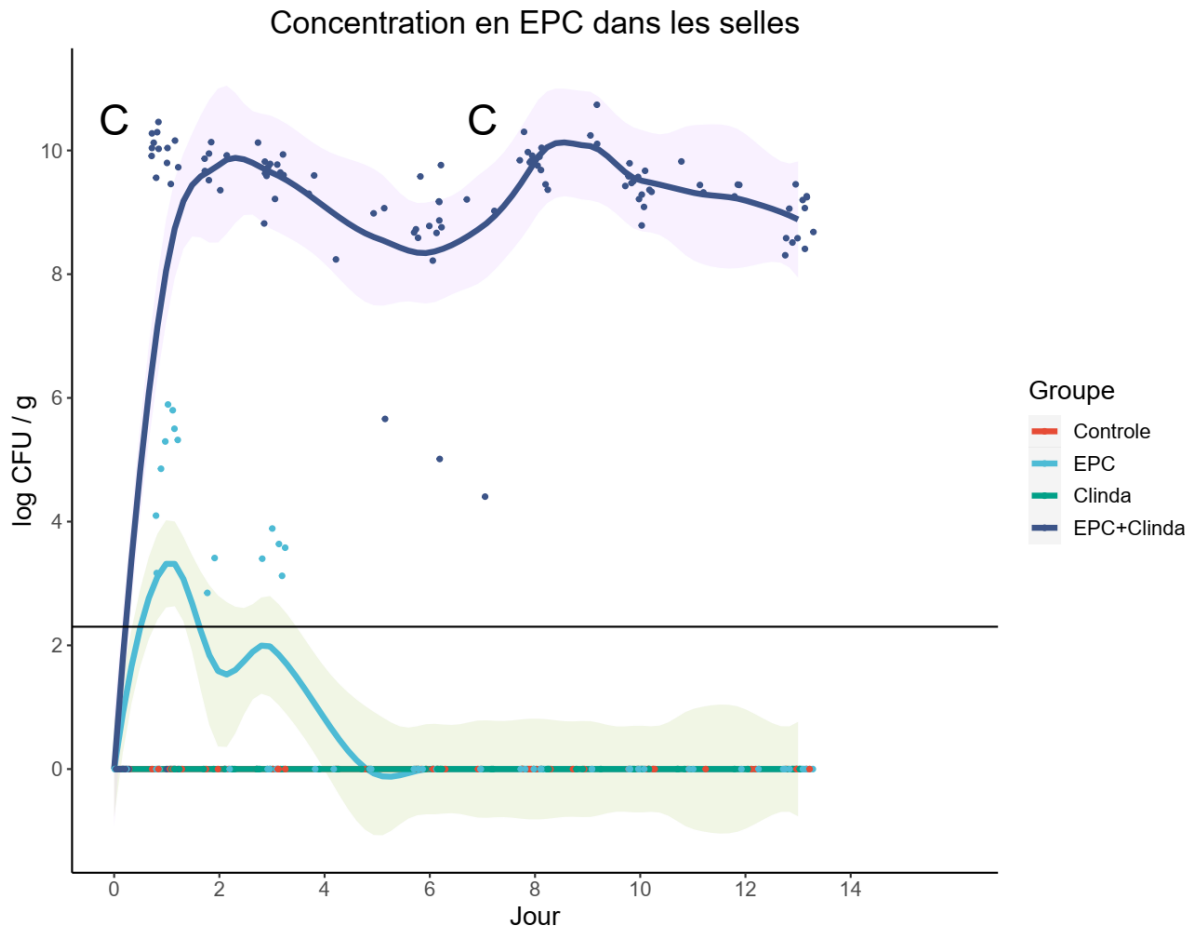
Le rôle du microbiote digestif a été mis en évidence dans la réponse de l'hôte à une pneumopathie. Ce concept est décrit dans la littérature selon le terme « axe intestin-poumon ». La plupart des modèles publiés utilisent une antibiothérapie à très large spectre pour altérer le microbiote. Cependant en pratique, l'altération du microbiote engendrée par une antibiothérapie peut s'accompagner d'une colonisation par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Nous avons souhaité évaluer les rôles respectifs d'une antibiothérapie par clindamycine et/ou d'une exposition à une souche de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase NDM dans la réponse de l'hôte à une pneumopathie à *P. aeruginosa*.

Quatre conditions étaient évaluées :

- Groupe contrôle : recevait une injection de PBS stérile à J0 et à J7, et avait accès à de l'eau de boisson standard.
- Groupe clindamycine : recevait une injection de clindamycine à J0 et à J7, et avait accès à de l'eau de boisson standard.
- Groupe EPC : recevait une injection de PBS stérile à J0 et à J7, et était exposé à de l'EPC (souche KPL0.2) dans l'eau de boisson pendant 24 heures puis à de l'eau standard.
- Groupe EPC + Clindamycine : recevait une injection de clindamycine à J0 et à J7, et était exposé à de l'EPC (souche KPL0.2) dans l'eau de boisson pendant 24 heures puis à de l'eau standard.

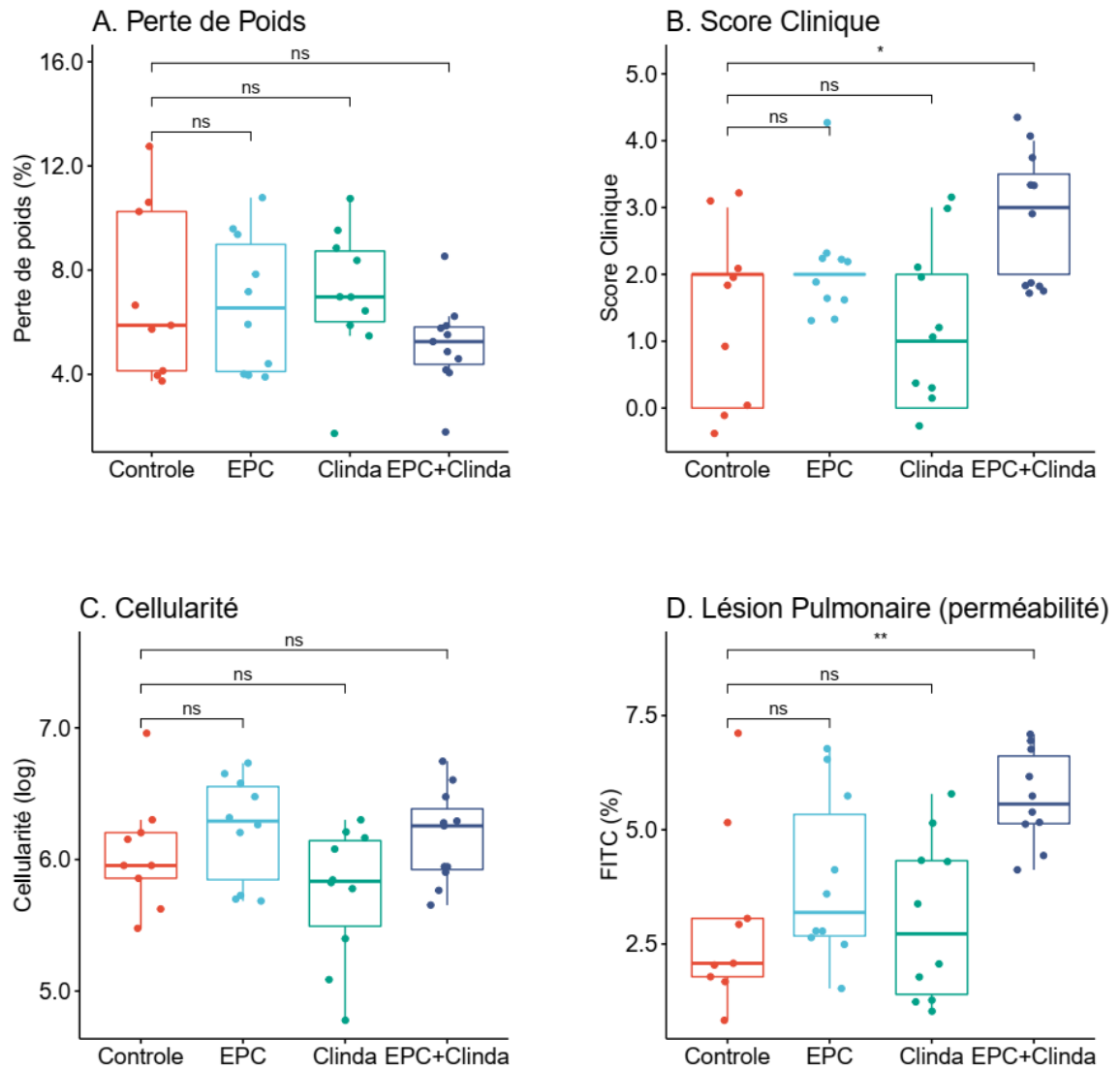
Dans ce modèle, l'injection de clindamycine était répétée à J0 et à J7 de manière à obtenir une concentration élevée en EPC au cours du temps (Figure 46). On observait

dans cette expérimentation un individu du groupe « EPC + Clindamycine » qui commençait à diminuer fortement sa charge bactérienne en EPC dans les selles à J5, J6, et J7. Une seconde administration de clindamycine permettait d'obtenir un modèle plus reproductible.



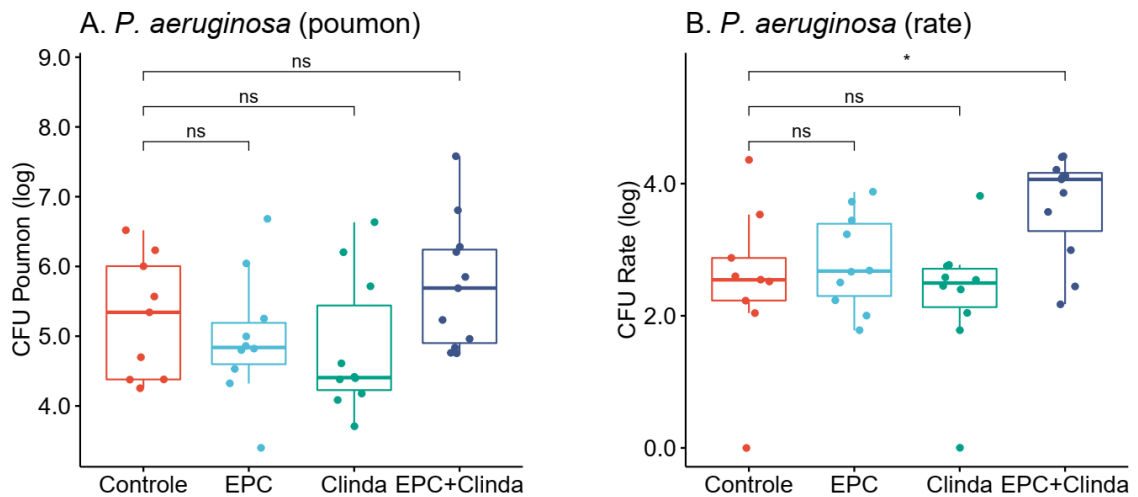
**Figure 46. Concentration en EPC dans les selles en fonction du temps.** n=10 souris par groupe. Les souris des groupes « Clinda » et « EPC+Clinda » ont reçu une injection de clindamycine (10 mg/kg) à J0 et J7 (« C » indiqué sur le schéma). Les souris des groupes « EPC » et « EPC+Clinda » ont été exposées à de l'EPC dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0.

Après infection par la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à J14, on observait une pneumopathie plus sévère chez les souris colonisées par EPC. Le score de gravité clinique ainsi que la lésion alvéolo-capillaire étaient significativement plus élevés dans ce groupe (Figure 47). Pour les souris uniquement exposées soit à l'EPC, soit à la clindamycine (absence de colonisation), il n'y avait par contre pas de différence de sévérité par rapport au groupe contrôle.



**Figure 47. Réponse des souris 18 heures après instillation intranasale de *P. aeruginosa* (souche PA01).** n=10 souris par groupe. A : perte de poids entre J14 et J15 d'après la formule  $(\text{PoidsJ14} - \text{PoidsJ15}) / \text{PoidsJ14} \times 100$ . B : Score de gravité clinique (aspect fourrure, mobilité, température). C : Cellularité du liquide broncho-alvéolaire (LBA). D = Lésion pulmonaire déterminée par le rapport  $(\text{Fluorescence du LBA}) / (\text{Fluorescence du sérum}) \times 100$ , de l'albumine-FITC ayant été injectée par voie intrapéritonéale 2 heures avant sacrifice.

Au niveau microbiologique, la charge bactérienne en *P. aeruginosa* pulmonaire était similaire entre les groupes. Il existait par contre une dissémination bactérienne plus importante au niveau de la rate pour le groupe « EPC + Clindamycine » (Figure 48).



**Figure 48. Données microbiologiques 18 heures après instillation intranasale de *P. aeruginosa* (souche PAO1).** n=10 souris par groupe. A : Concentration bactérienne en *P. aeruginosa* dans le poumon gauche. B : Concentration en *P. aeruginosa* dans la rate.

Au total, une pneumopathie à *P. aeruginosa* plus sévère était observée uniquement dans le groupe étant « EPC + Clindamycine », le seul à être durablement colonisé par EPC. Dans ce modèle, l'exposition à l'EPC seule, ou l'administration de clindamycine seule, ne modifiait pas le pronostic.

### 4.3.2. Effet de la transplantation de microbiote fécal

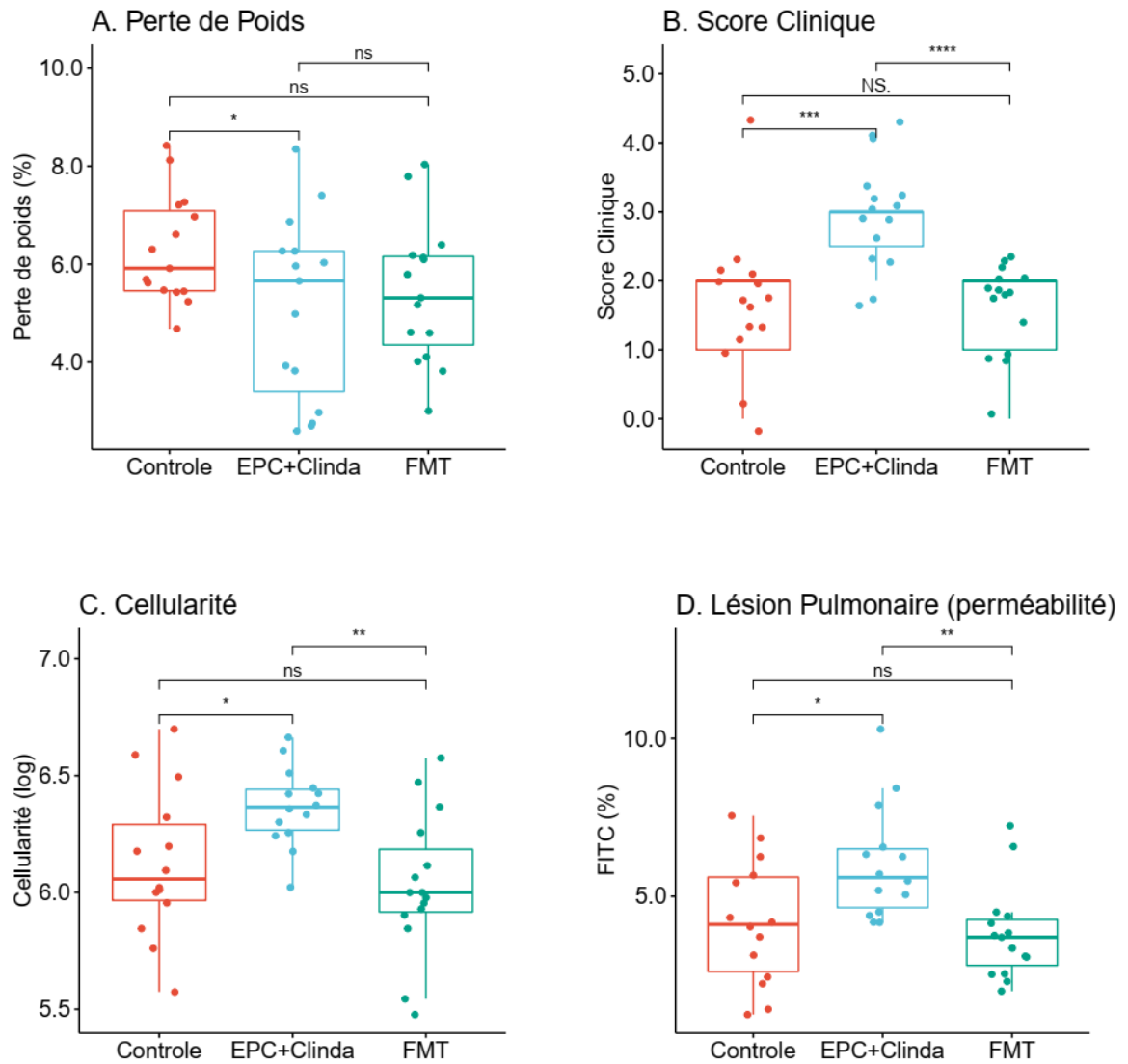
La transplantation de microbiote fécal (FMT) est décrite pour avoir un effet bénéfique sur l'axe intestin-poumon, en restaurant au moins partiellement le microbiote digestif. La capacité de la FMT à décoloniser des souris porteuses de bactéries hautement résistantes émergentes est controversée.

Nous avons souhaité évaluer l'effet de la transplantation de microbiote fécal (groupe « FMT ») dans notre modèle. Le groupe « FMT » a été exposé à l'EPC dans l'eau de boisson pendant les 24 premières heures, et a reçu deux injections de clindamycine à J0 et J7, tout comme le groupe « EPC + Clindamycine ». Par contre, une transplantation de microbiote fécal a été réalisée à partir de selles de souris contrôles à J11 et J13 (respectivement J-3 et J-1 avant infection par la souche de *P. aeruginosa* PAO1).

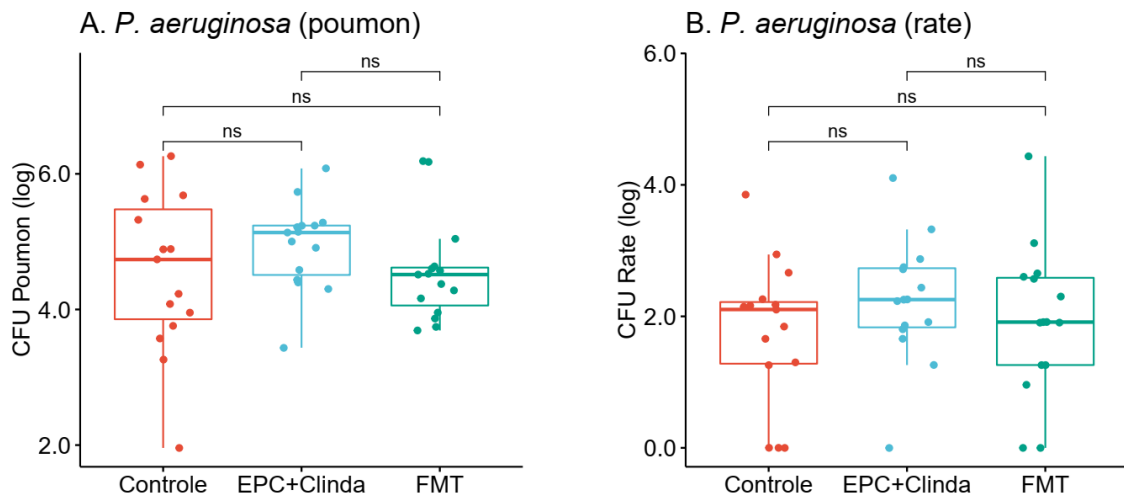
On observe une restauration du pronostic chez les souris ayant bénéficié d'une transplantation de microbiote fécal. Le score clinique ainsi que la perméabilité alvéolo-capillaire sont similaires dans le groupe FMT par rapport au le groupe contrôle. En revanche, nous confirmons le rôle délétère de la colonisation digestive par EPC sur la pneumopathie à *P. aeruginosa* sur deux expérimentations différentes pour un effectif de 15 souris par groupe (Figure 49).

Cette fois-ci, la cellularité était un peu plus élevée dans le groupe EPC, mais on n'observait plus de différence significative au niveau de la dissémination en *P. aeruginosa* au niveau de la rate. Il existait tout de même une tendance à une augmentation de la charge bactérienne en *P. aeruginosa* au niveau du poumon et de la rate, sans que cette différence soit significative (Figure 50).

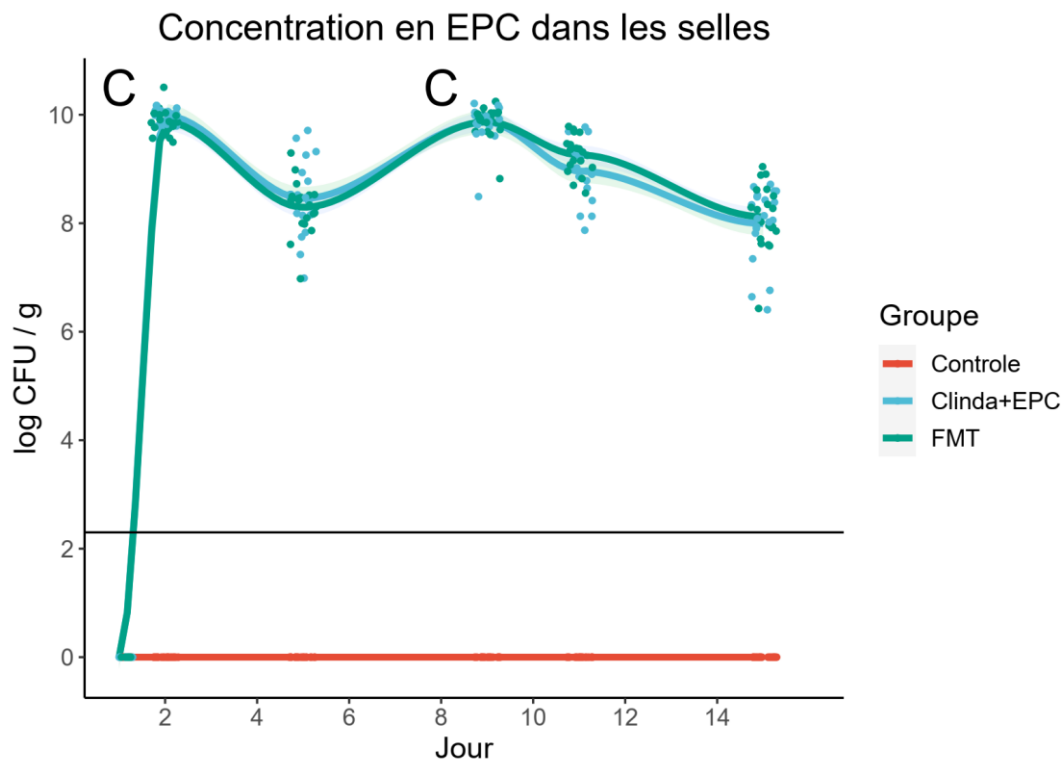
La transplantation de microbiote fécale réalisée ne modifiait pas la concentration bactérienne en EPC dans les selles (Figure 51). Il est possible que la FMT ait un impact à plus long terme sur la colonisation par EPC, mais pas dans un temps aussi court (première FMT à J11, deuxième FMT à J13, sacrifice à J15).



**Figure 49. Réponse des souris 18 heures après instillation intranasale de *P. aeruginosa* (souche PA01).** n=15 souris par groupe. A : perte de poids entre J14 et J15 d'après la formule  $(\text{Poids}_{J14} - \text{Poids}_{J15}) / \text{Poids}_{J14} \times 100$ . B : Score de gravité clinique (aspect fourrure, mobilité, température). C : Cellularité du liquide broncho-alvéolaire (LBA). D = Lésion pulmonaire déterminée par le rapport  $(\text{Fluorescence du LBA}) / (\text{Fluorescence du sérum}) \times 100$ , de l'albumine-FITC ayant été injectée par voie intrapéritonéale 2 heures avant sacrifice.



**Figure 50. Données microbiologiques 18 heures après instillation intranasale de *P. aeruginosa* (souche PA01).** n=15 souris par groupe. A : Concentration bactérienne en *P. aeruginosa* dans le poumon gauche. B : Concentration bactérienne en *P. aeruginosa* dans la rate.



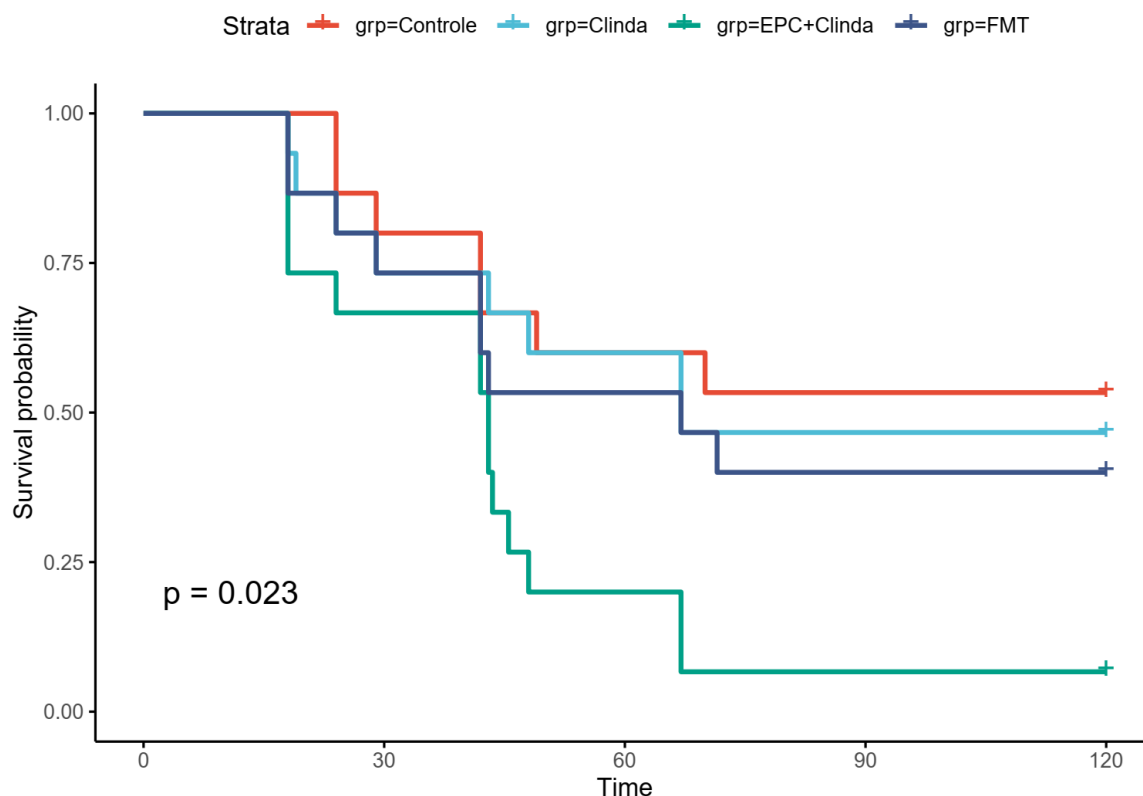
**Figure 51. Concentration en EPC dans les selles en fonction du temps.** n=15 souris par groupe.



## Courbes de survie

Nous avons réalisé des courbes de survie afin d'évaluer si l'augmentation de la sévérité de la pneumopathie à *P. aeruginosa* se traduisait également par une augmentation de mortalité. Pour réaliser ces courbes de survie, la dose de *P. aeruginosa* instillée en intranasal était deux fois plus élevée que pour les expérimentations précédentes.

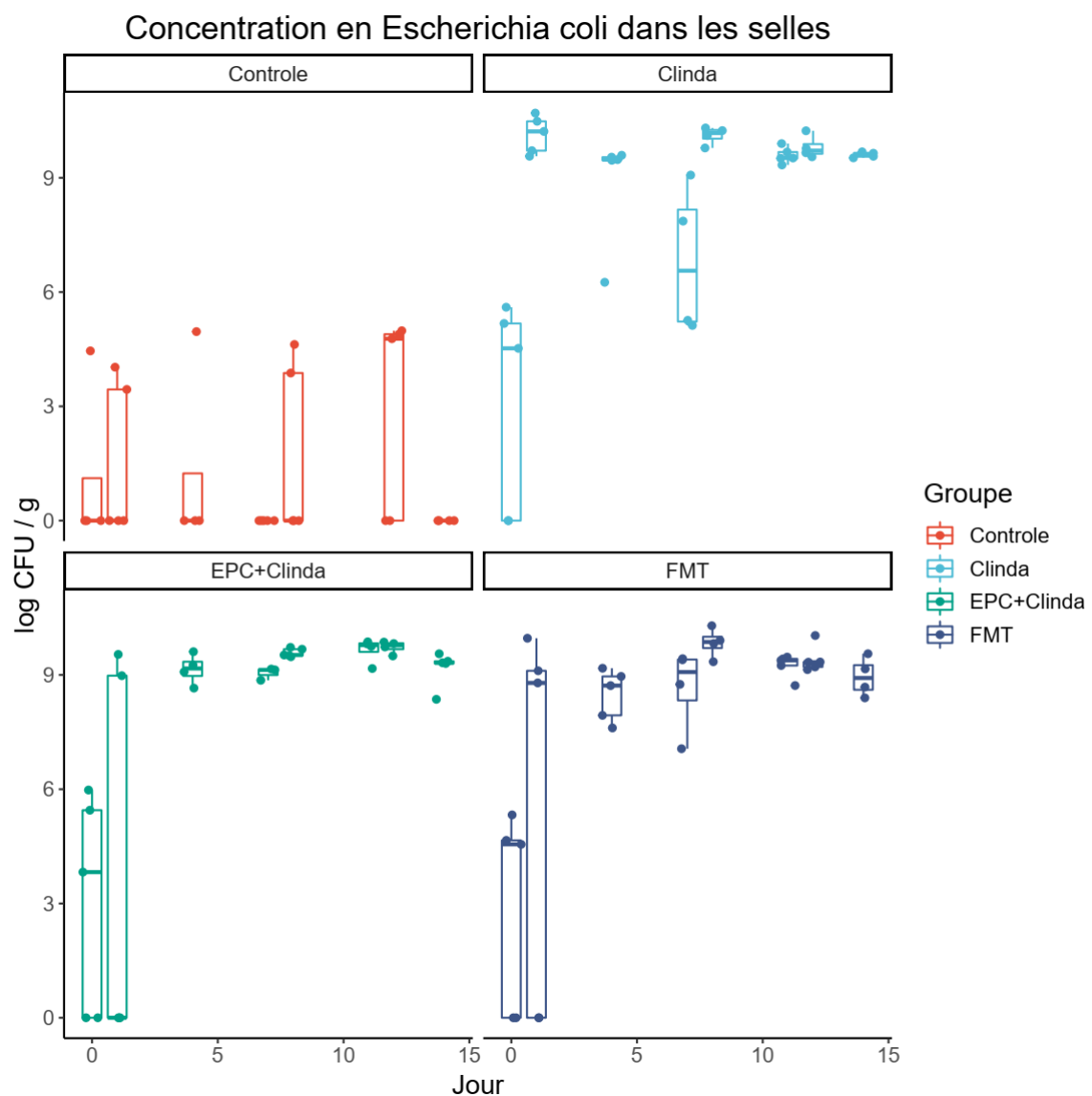
Après challenge par  $2 \times 10^7$  UFC/mL de la souche de *P. aeruginosa* PAO1, la mortalité du groupe colonisé par EPC était plus élevée que celle du groupe contrôle, ou que celle du groupe clindamycine. La transplantation de microbiote fécal chez les souris colonisées par EPC restaurait le pronostic (Figure 52). Ces courbes de mortalité proviennent de 3 expérimentations différentes (3 x 5 souris par groupe). Pour le groupe colonisé par EPC 14 individus sur 15 étaient décédés, contre 7 sur 15 pour le groupe contrôle. Les groupes Clindamycine et FMT fécal étaient proches du groupe contrôle (8 et 9 décès respectivement).



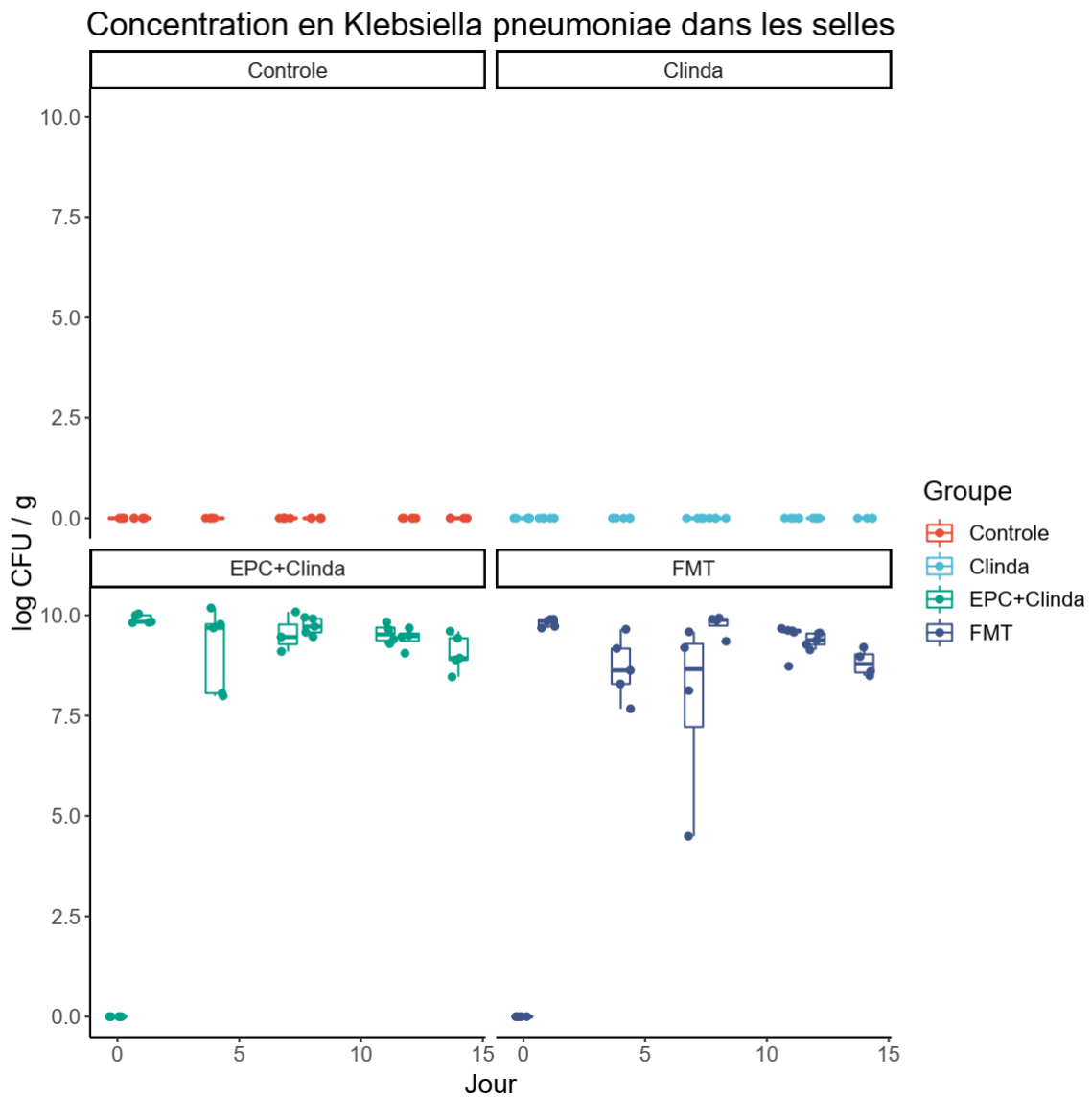
**Figure 52.** Survie après challenge par  $2 \times 10^7$  UFC/mL de *P. aeruginosa* PAO1. n=15 souris par groupe.

## Etude de la dynamique du portage d'entérobactéries par culture

La clindamycine provoquant une expansion des *Enterobacteriaceae*, nous avons souhaité analyser la dynamique des entérobactéries présentes dans les selles. Avant tout traitement par clindamycine et/ou exposition à l'EPC, on retrouvait une charge bactérienne faible en *E. coli*, parfois proche de la limite de détection estimée à 2 log UFC/g de selle (**Figure 53**). Après exposition à la clindamycine, la concentration en *E. coli* dans les selles augmentait rapidement. Il s'agissait d'une souche commensale, déjà présente chez les souris à de faibles niveaux avant administration d'antibiotique.



**Figure 53. Concentration en *Escherichia coli* dans les selles en fonction du temps.**  
n=5 souris par groupe.



**Figure 54. Concentration en *Klebsiella pneumoniae* dans les selles en fonction du temps.** n=5 souris par groupe.

En cas d'exposition à l'EPC à J0 en plus de l'administration de clindamycine, une co-dominance d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* était retrouvée (Figure 54). Ces taux étaient stables au cours du temps, autour de 8 à 9 log d'UFC/g de selles. La FMT n'avait pas d'effet détectable. Dans d'autres expérimentations, il est arrivé que de rares souris soient colonisées à l'état de base à *Enterobacter cloacae* à de faibles niveaux (données non montrées), mais ce n'était pas le cas ici. Les résultats présentés dans ce document sont représentatifs de ce qui était habituellement retrouvé lors de nos expérimentations.

## Évaluation de stratégies de décolonisation digestive

Différentes stratégies de décolonisation digestive ont été évaluées dans le cadre du modèle murin mis au point. Comme précédemment, les souris des 4 groupes ont été exposées à de l'EPC dans l'eau de boisson pendant 24 heures à J0, et ont reçu une injection de clindamycine à J0 et J7. Le groupe FMT a bénéficié d'une FMT à J11 et J13, le groupe colistine a reçu de la colistine dans l'eau de boisson à concentration de 5 000 UI/mL de J11 à J13, le groupe mannose a reçu du D-mannose dans l'eau de boisson à concentration de 20 mg/mL de J11 à J13. En effet, le mannose a été décrit pour inhiber l'adhésion médiée par FimH (par compétition), et permettait de diminuer la concentration digestive en *E. coli* uropathogène dans un modèle murin (235).

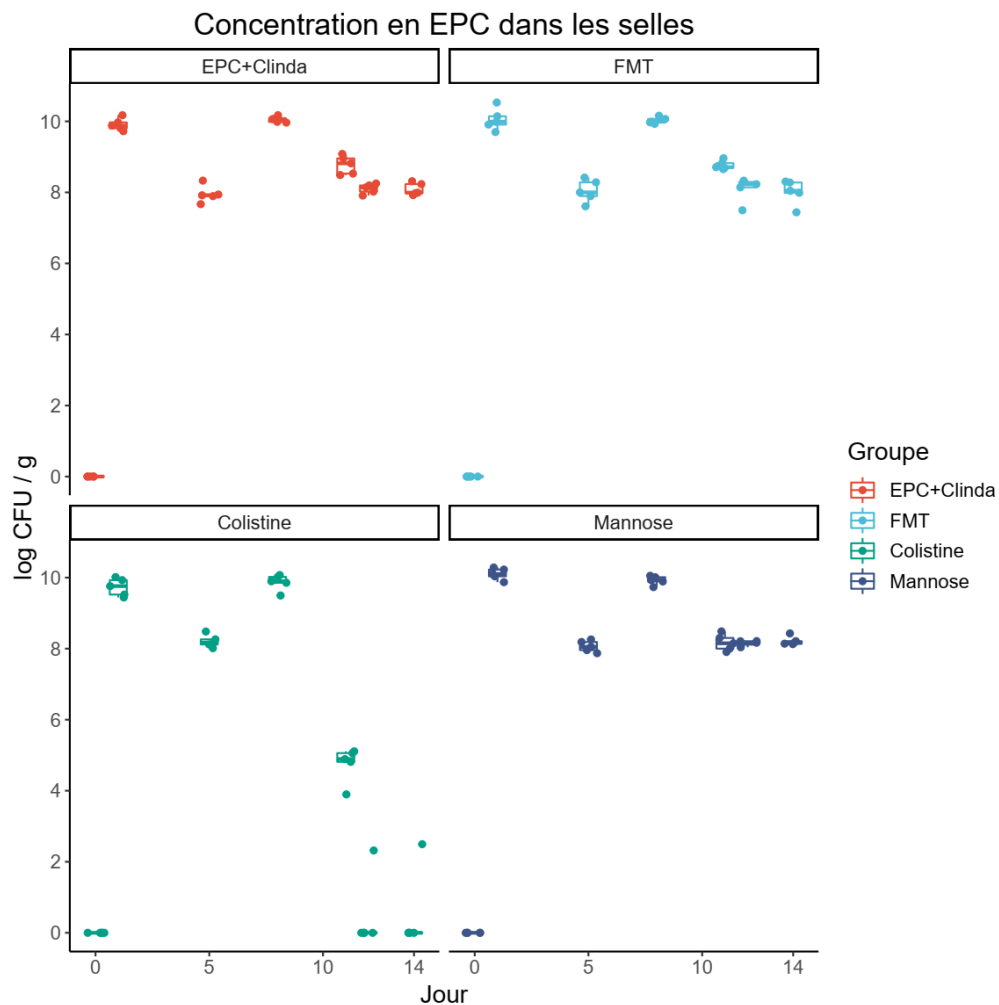
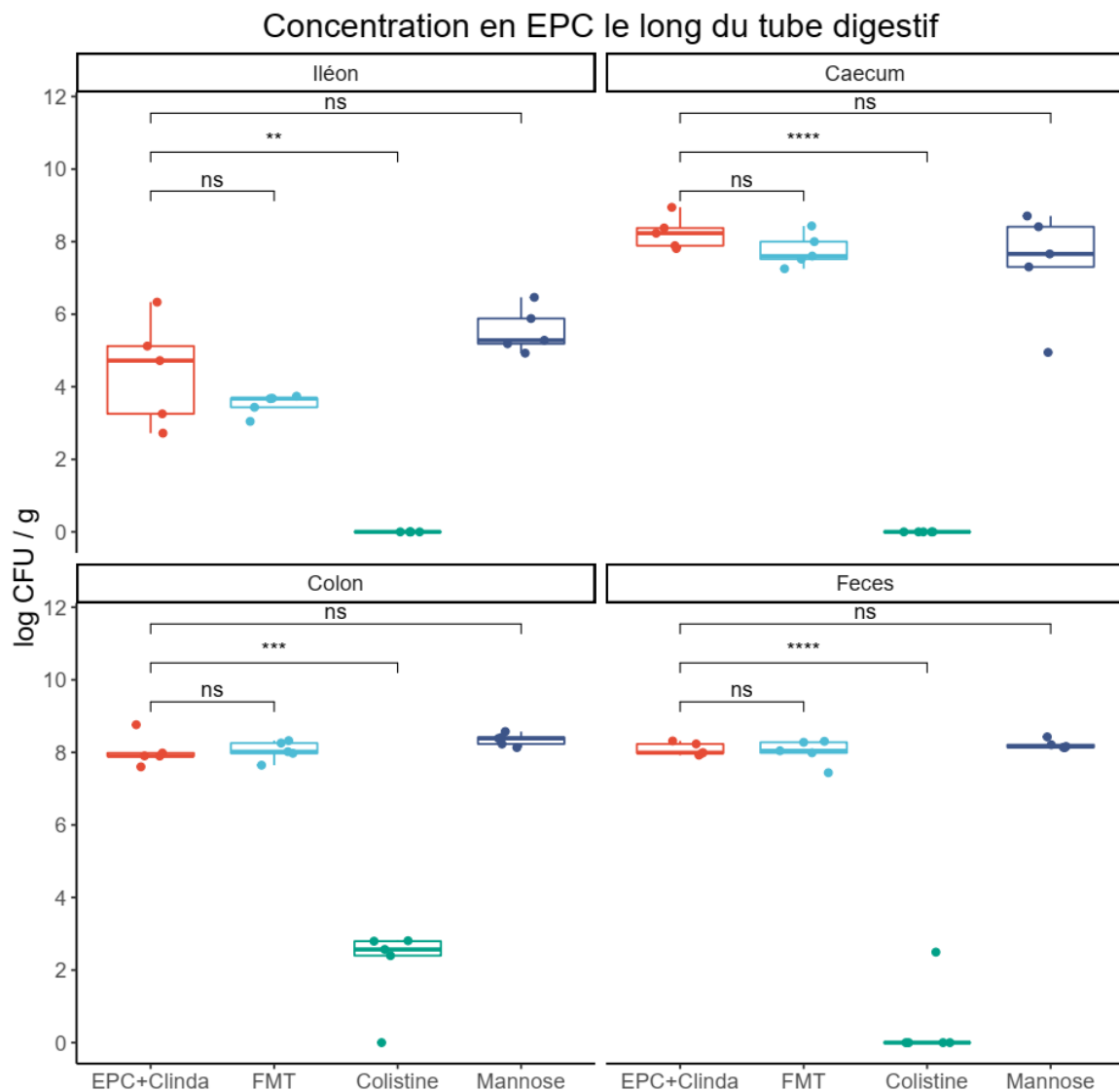


Figure 55. Évaluation de stratégies de décolonisation digestive : concentration en EPC au cours du temps. n=5 souris par groupe.

Seule la colistine parvenait à faire diminuer la charge bactérienne en EPC sous la limite de détection (Figure 55). Les autres stratégies évaluées n'avaient pas d'effet notable dans un temps si court.

A J14 les souris ont été sacrifiées et la charge bactérienne en EPC a été évaluée le long du tube digestif. La FMT et le mannose ne présentaient pas d'effet notable. La colistine était très efficace, même si on retrouvait une charge bactérienne un peu plus élevée au niveau du côlon montrant que la décolonisation n'était pas complète (Figure 56).

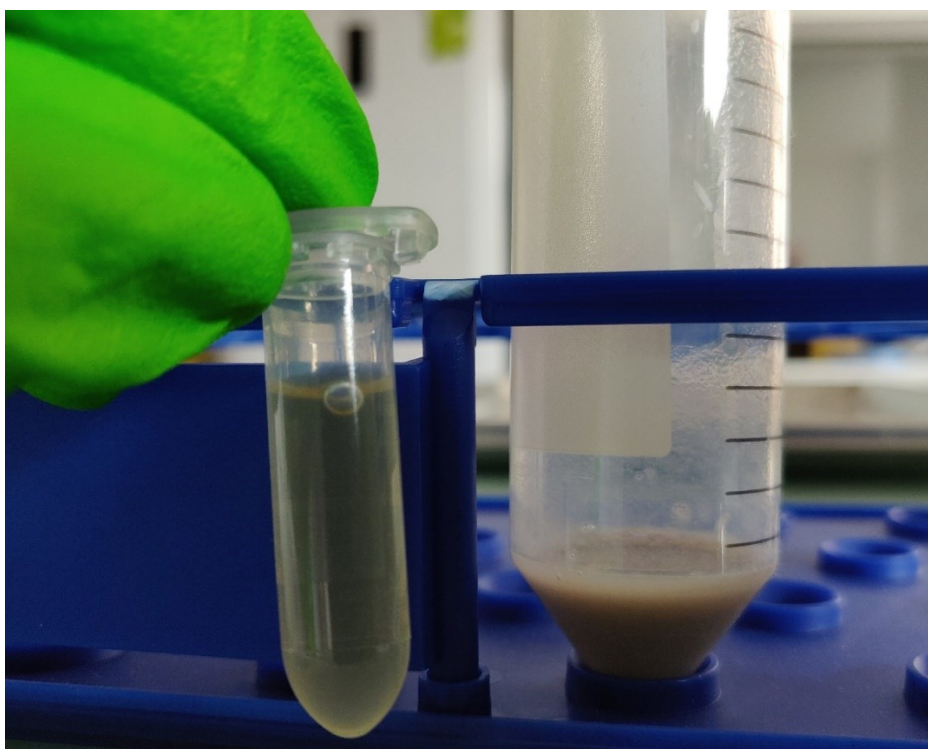


**Figure 56. Évaluation de stratégies de décolonisation digestive : concentration en EPC EPC le long du tube digestif à J14. n=5 souris par groupe.**

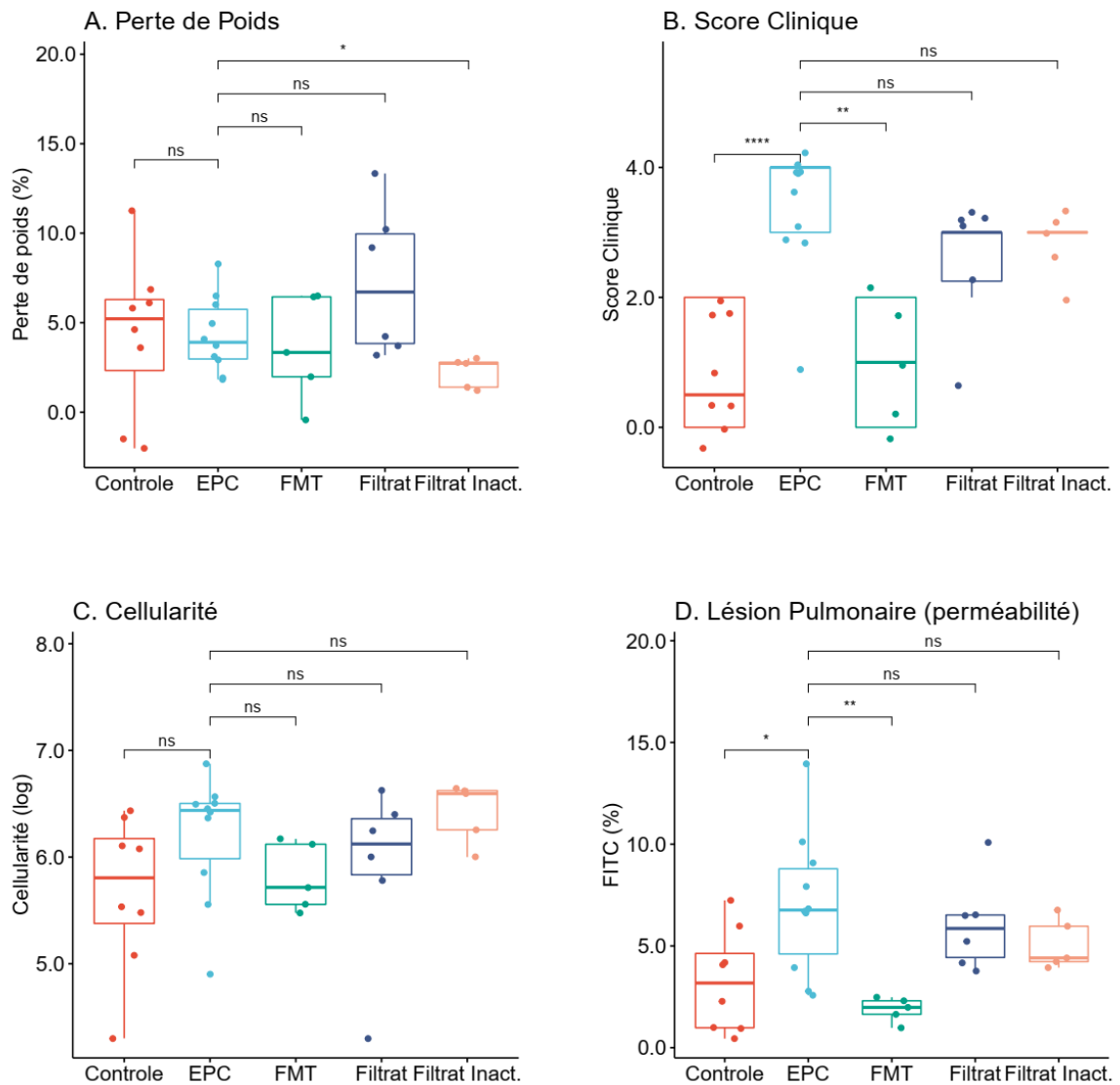
### 4.3.3. Effet de la transplantation de filtrats stériles de selles

La FMT restaure un pronostic favorable lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* dans notre modèle de colonisation à EPC. Des résultats similaires sont retrouvés dans la littérature, avec un effet bénéfique de la FMT suite à une altération du microbiote digestif par antibiothérapie. Cependant, le mécanisme d'action de la FMT n'est pas clairement compris. Récemment, un effet bénéfique de filtrats stériles de selles a été décrit pour des patients atteints de colite à *C. difficile* (236). Nous avons souhaité explorer cette piste permettant potentiellement de préciser le mécanisme de la FMT.

L'effet de la transplantation de filtrats stériles de selles a été évalué par rapport à la transplantation de microbiote fécal (FMT) classique. Un groupe « Filtrat » a bénéficié d'une transplantation de filtrats stériles de selles (après filtration par un filtre de 0,2 $\mu$ m), et un groupe « Filtrat Inactivé » a reçu d'un filtrat stérile ayant en plus été inactivé par chauffage à 95 °C pendant 10 minutes et déprotéinisé par adjonction d'acide trichloracétique (ATCA) puis tamponné à pH 7 avant gavage orogastrique.



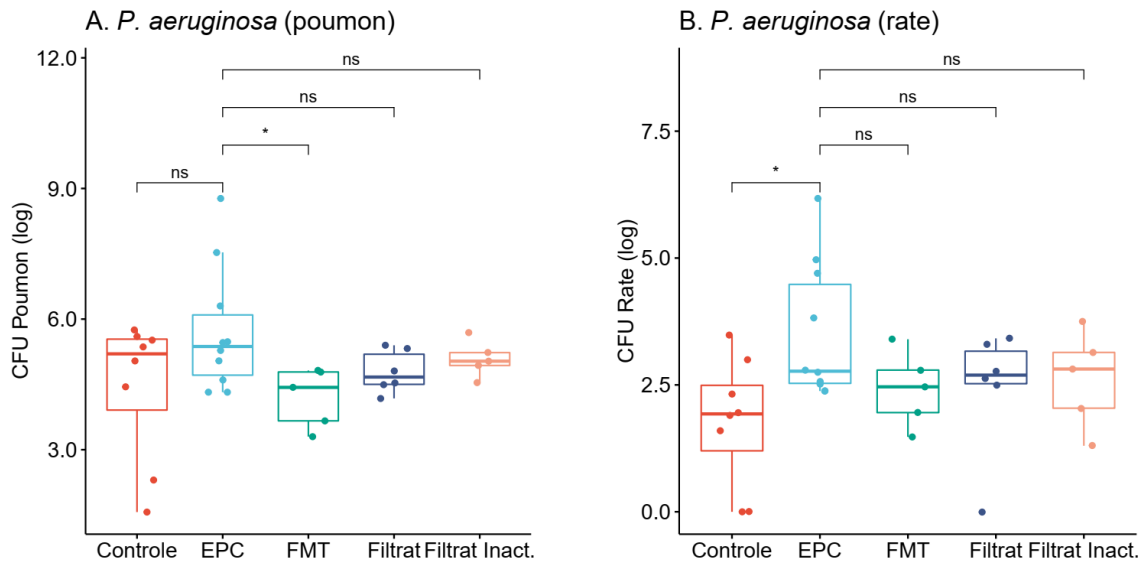
**Figure 57. Aspect macroscopique des filtrats stériles de selles (à gauche) et des selles broyées puis tamisées utilisées pour la FMT (à droite).**



**Figure 58. Réponse des souris 18 heures après instillation intranasale de *P. aeruginosa* (souche PAO1).** n=5 à 10 souris par groupe. A : perte de poids entre J14 et J15 d'après la formule  $(\text{Poids}_{J14} - \text{Poids}_{J15}) / \text{Poids}_{J14} \times 100$ . B : Score de gravité clinique (aspect fourrure, mobilité, température). C : Cellularité du liquide broncho-alvéolaire (LBA). D = Lésion pulmonaire déterminée par le rapport  $(\text{Fluorescence du LBA}) / (\text{Fluorescence du sérum}) \times 100$ , de l'albumine-FITC ayant été injectée par voie intrapéritonéale 2 heures avant sacrifice.

Aucune différence significative n'était observée pour les groupes « Filtrat » ou « Filtrat inactivé », que ce soit pour le score clinique, la lésion pulmonaire, ou la charge bactérienne (Figure 58 et Figure 59). Les valeurs étant toutefois marginalement moins élevées que dans le groupe colonisé par EPC, un effet des filtrats aurait peut-être pu être mis en évidence en augmentant le nombre de souris. Cependant, étant donné que la FMT

était plus efficace que l'utilisation de filtrats stériles, nous n'avons pas souhaité continuer à explorer l'effet des filtrats stériles dans ce travail.



**Figure 59. Résultats microbiologiques 18 heures après instillation intranasale de *P. aeruginosa* (souche PAO1).** n=5 à 10 souris par groupe. A : Concentration bactérienne en *P. aeruginosa* dans le poumon gauche. B : Concentration bactérienne en *P. aeruginosa* dans la rate.



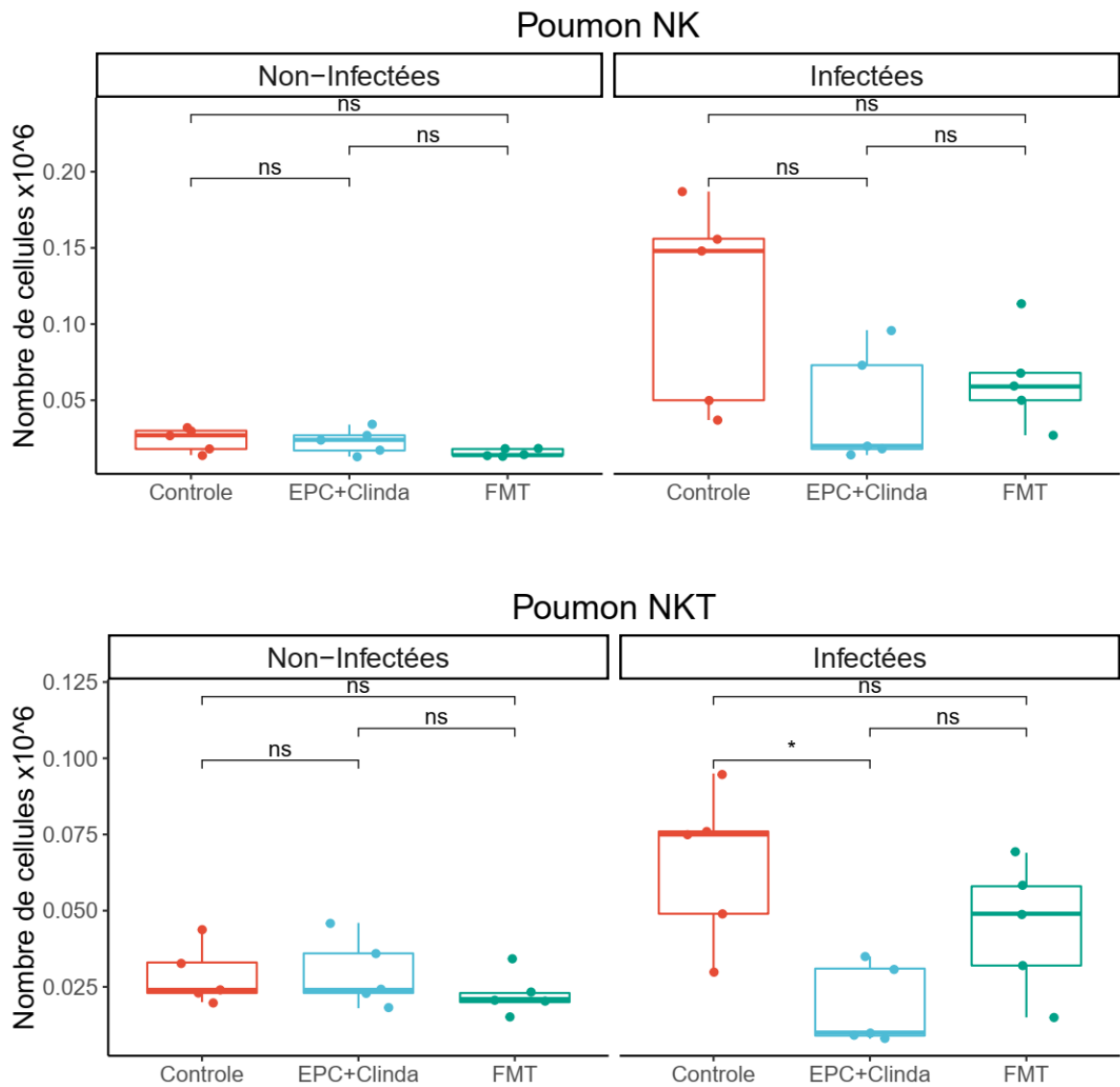
#### **4.3.4. Analyse par cytométrie en flux des populations cellulaires pulmonaires et spléniques**

Dans les chapitres précédents, nous avons montré un pronostic défavorable lors qu'une infection à *P. aeruginosa* chez les souris colonisées par EPC, restauré par la FMT. Pour explorer le mécanisme immunologique sous-jacent, nous avons analysé les populations cellulaires par cytométrie en flux sur 3 groupes de souris : « contrôle », « colonisées à EPC » (EPC + Clindamycine), et « colonisées à EPC ayant bénéficié d'une FMT », dans deux conditions : « non infectées » (instillation de 50 µL de PBS), et « infectées par *P. aeruginosa* » (instillation de  $10^7$  UFC de *P. aeruginosa*).

L'analyse des populations cellulaires par cytométrie en flux a été réalisée dans le poumon ainsi que dans la rate.

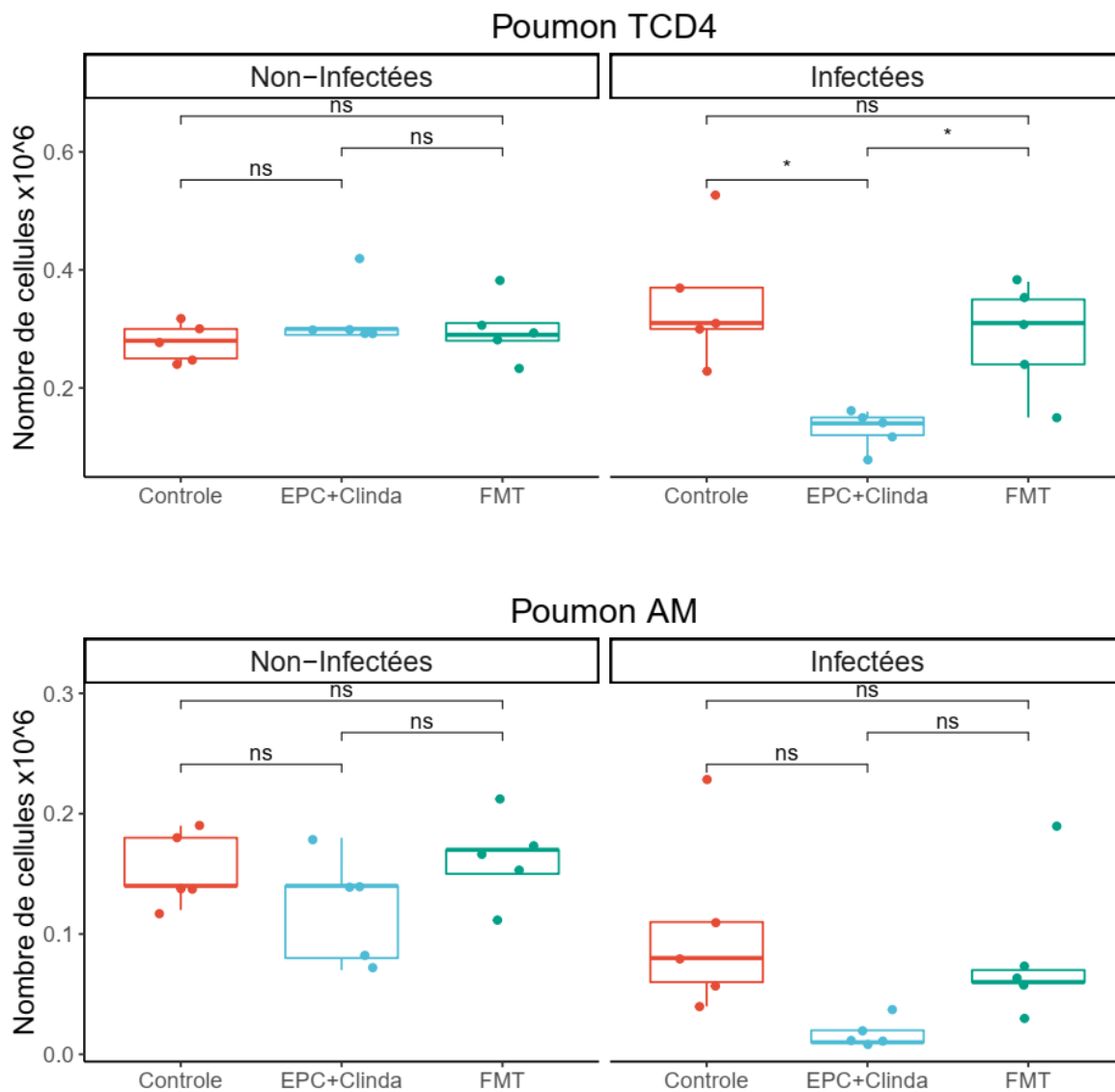
## Poumon

Après infection par la souche de *P. aeruginosa* PAO1, on observe une diminution significative des lymphocytes NKT (*Natural Killer T*) dans le poumon (**Figure 60**).



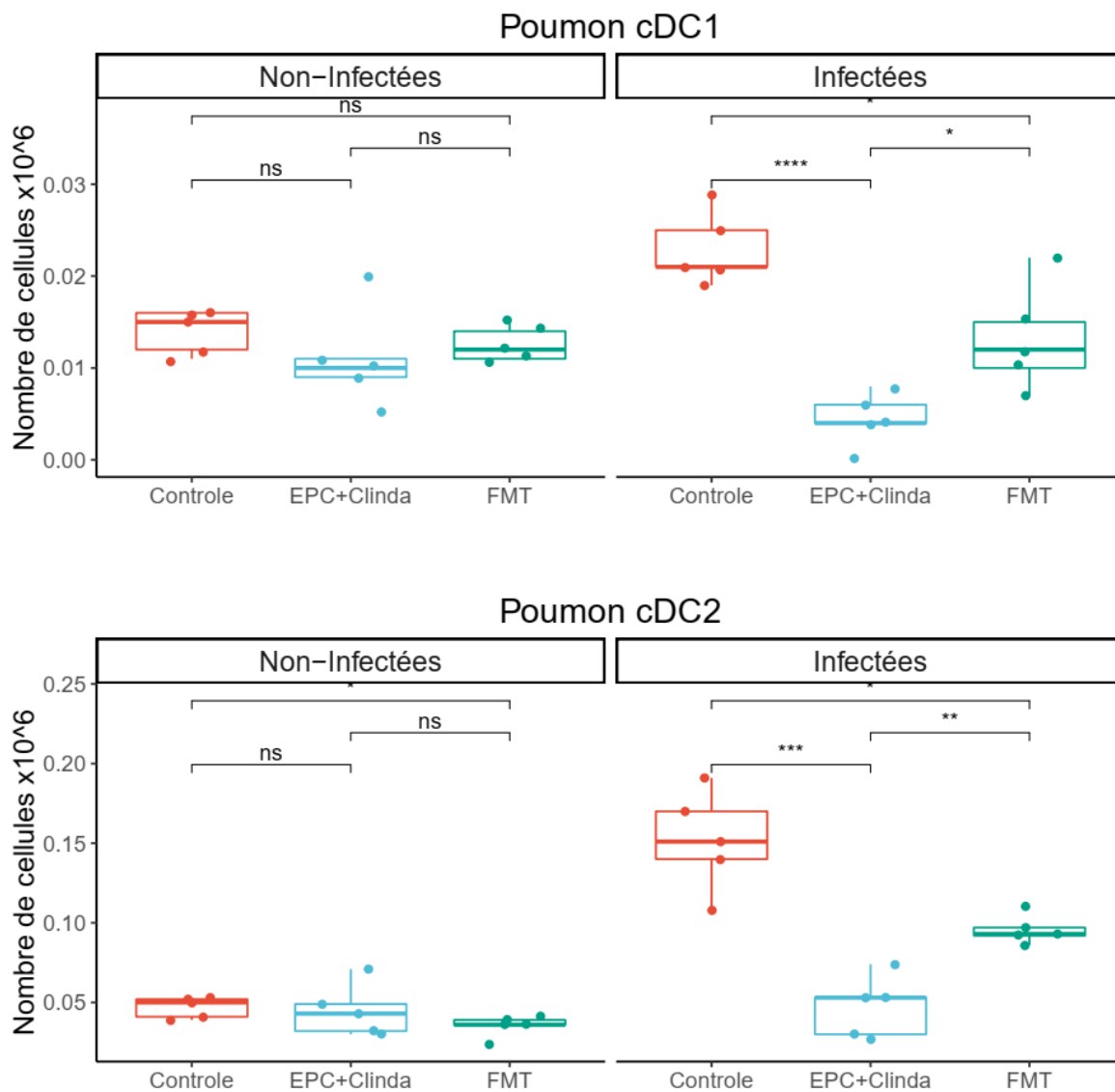
**Figure 60. Dénombrement des lymphocytes NK et NKT dans le poumon.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation 10<sup>7</sup> UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

Les lymphocytes T CD4 étaient également diminués chez les souris colonisées par EPC, uniquement après infection par PAO1 (Figure 61). La diminution des macrophages alvéolaires dans le groupe colonisé par EPC n'était pas significative.



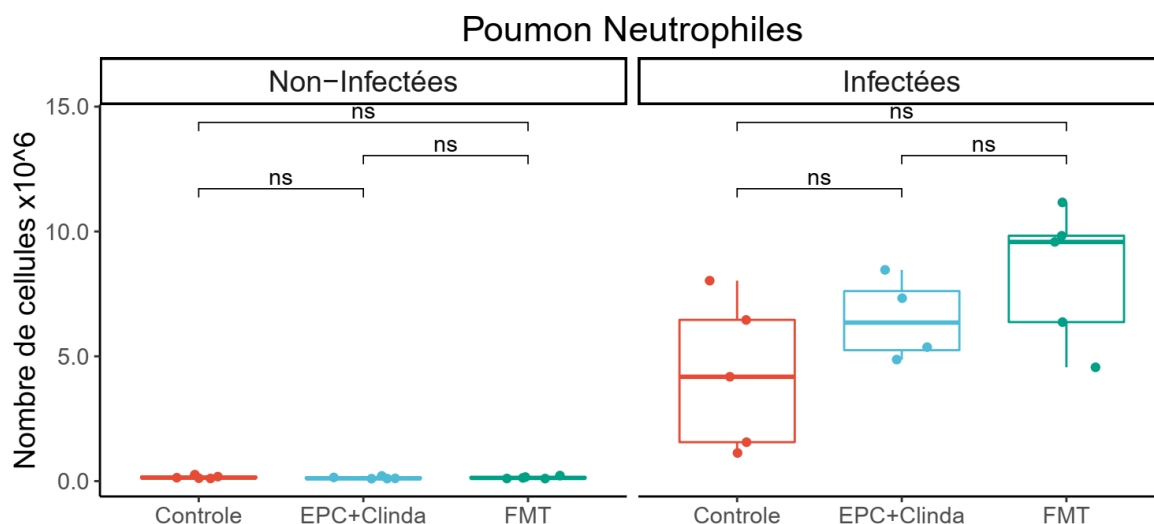
**Figure 61. Dénombrement des lymphocytes T CD4 et des macrophages alvéolaires dans le poumon.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation 10<sup>7</sup> UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

Les cellules dendritiques de type cDC1 et cDC2 étaient diminuées au niveau pulmonaire, chez les souris colonisées par EPC, uniquement après infection par PAO1. Cette diminution des cellules dendritiques était partiellement restaurée dans le groupe FMT (Figure 62).



**Figure 62. Dénombrement des cellules dendritiques de type cDC1 ou cDC2 dans le poumon.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation 10<sup>7</sup> UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

Aucune différence n'était observée au niveau du nombre de neutrophiles retrouvés dans le poumon entre les groupes (Figure 63). Ce résultat négatif est intéressant, car les polynucléaires neutrophiles sont un des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée vis-à-vis d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.



**Figure 63. Dénombrement des polynucléaires neutrophiles dans le poumon.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation  $10^7$  UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

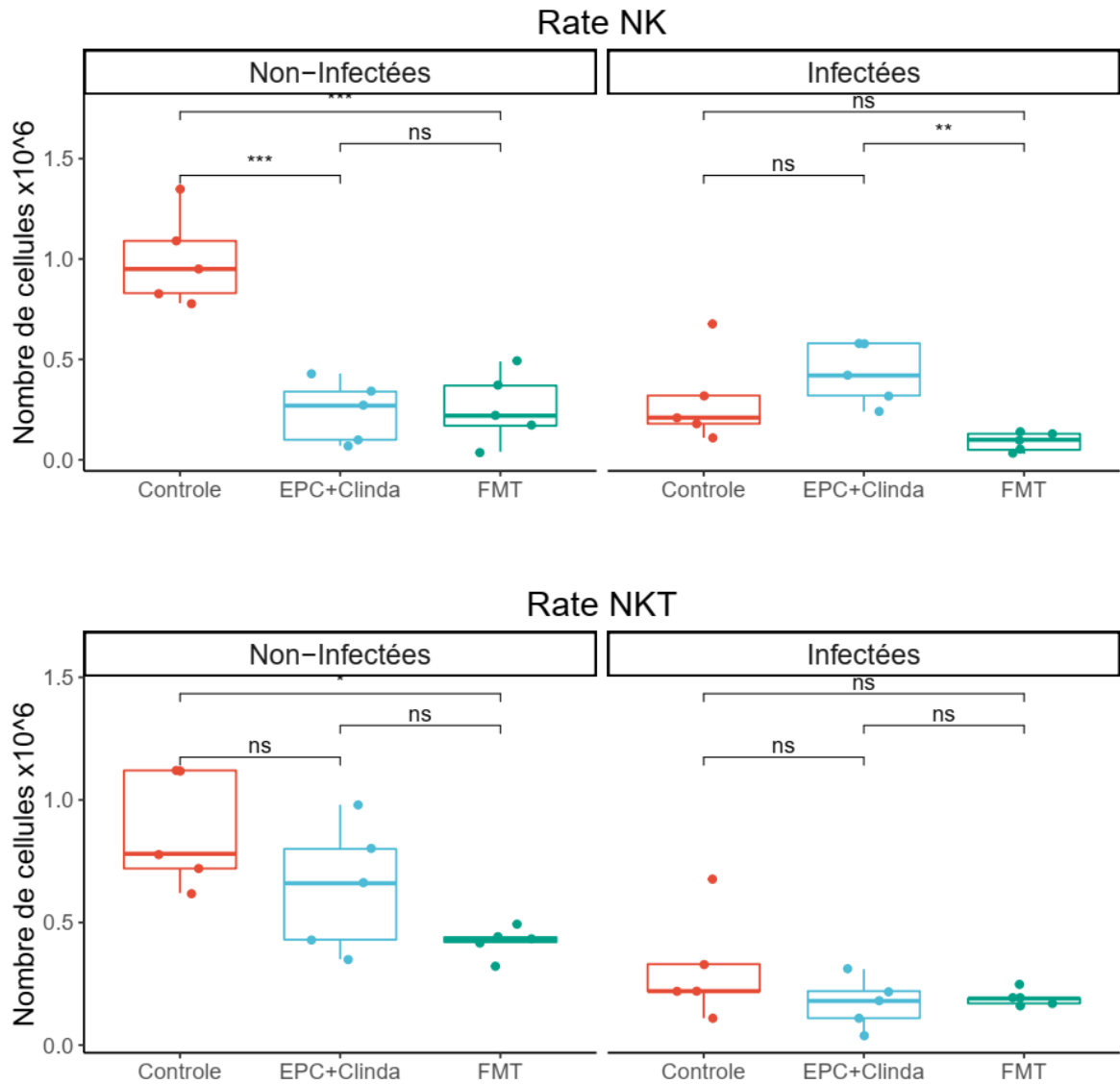
Au total au niveau du poumon, on observait principalement une diminution dans le groupe EPC dans la condition « infectée par *P. aeruginosa* » des paramètres suivants :

- Lymphocytes NKT et lymphocytes T CD4
- Cellules dendritiques cDC1 et cDC2

Cette diminution est restaurée par la FMT. En l'absence d'infection par *P. aeruginosa*, aucune différence n'était mise en évidence dans le poumon.

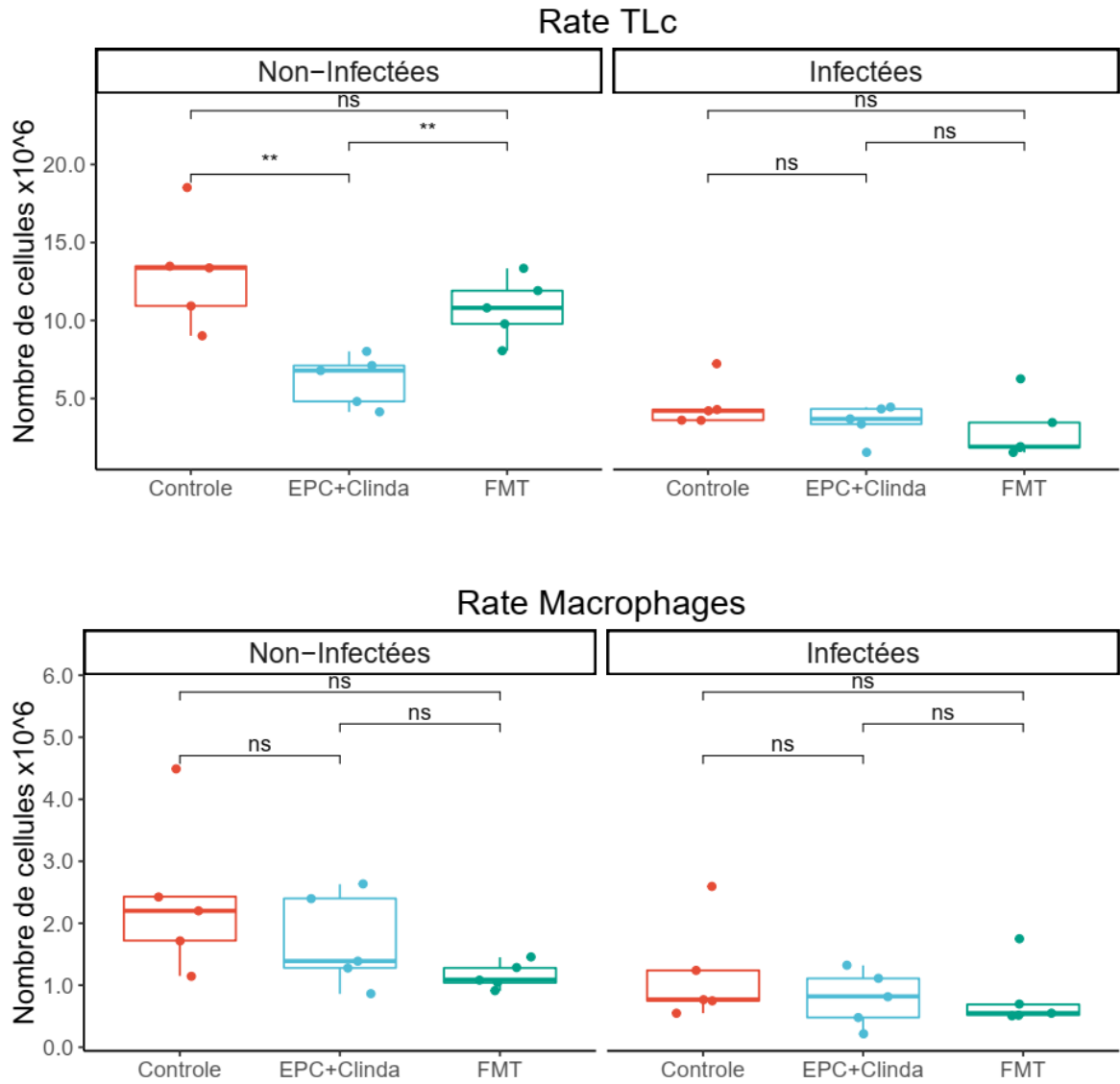
## Rate

Au niveau de la rate, on observe une diminution importante des lymphocytes NK chez les souris non infectées colonisées par EPC, non restaurée par la FMT (**Figure 64**).



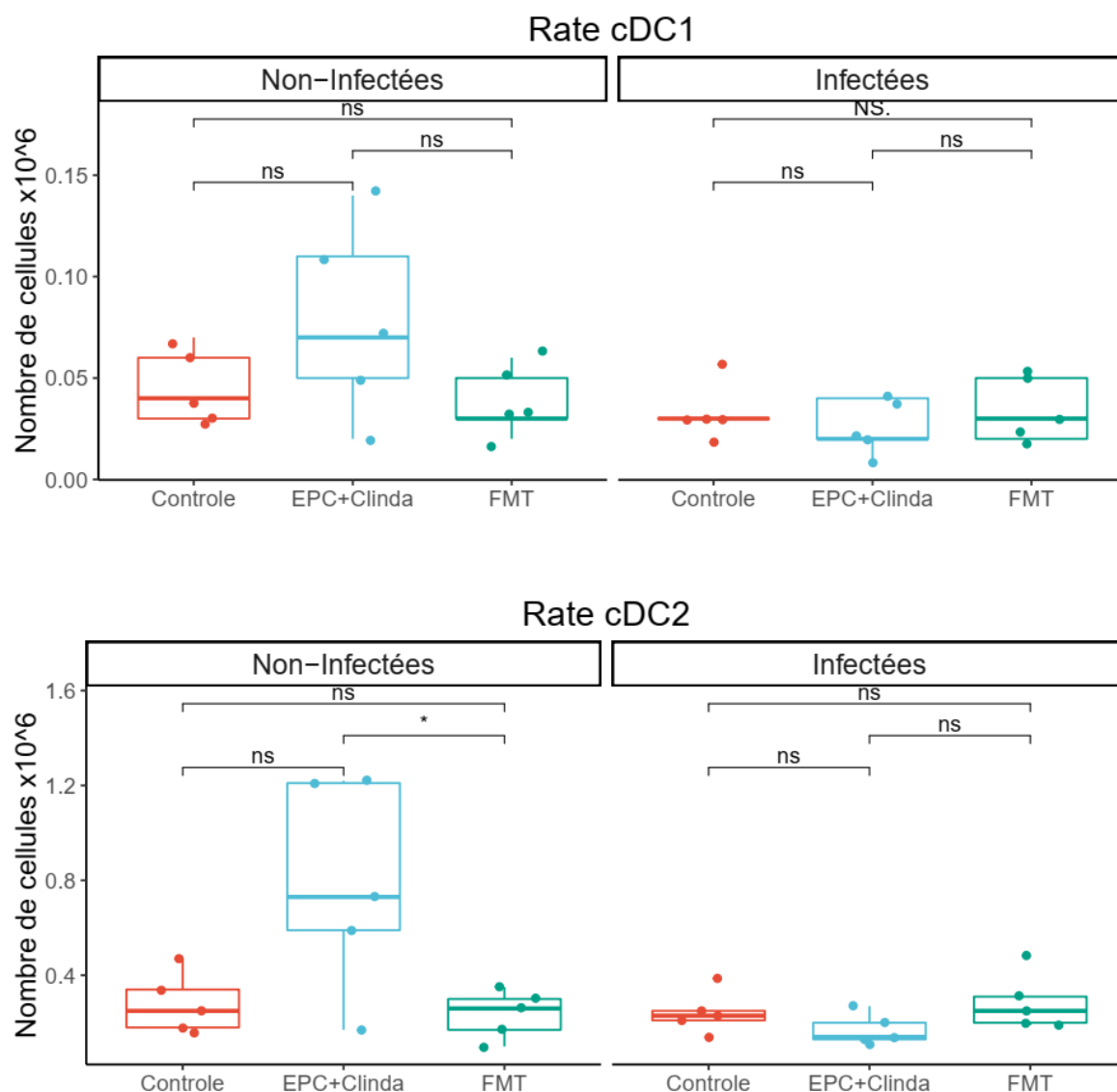
**Figure 64. Dénombrement des lymphocytes NK et NKT dans la rate.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation 10<sup>7</sup> UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

Les lymphocytes T sont diminués au niveau de la rate chez les colonisées par EPC, en l'absence d'infection. La FMT restaure la concentration en lymphocytes T à des niveaux comparables aux contrôles (Figure 65).



**Figure 65. Dénombrement des lymphocytes T et des macrophages dans la rate.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation  $10^7$  UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

Au niveau de la rate, les cellules dendritiques cDC1 et cDC2 ont tendance à être plus élevées dans le groupe EPC en l'absence d'infection (Figure 66).



**Figure 66. Dénombrement des cellules dendritiques de type cDC1 ou cDC2 dans la rate.** n=10 souris par groupe : souris non infectées à gauche, souris infectées par une instillation 10<sup>7</sup> UFC de la souche de *P. aeruginosa* PAO1 à droite.

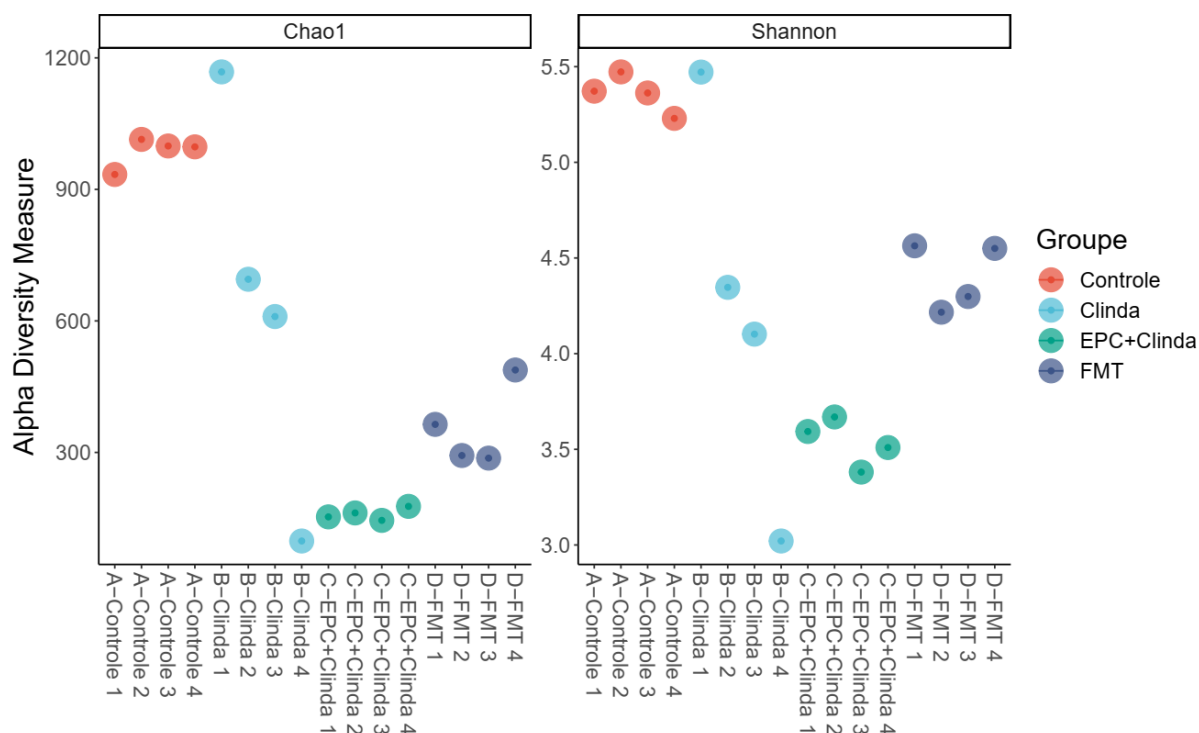
Au total au niveau de la rate, on observait principalement une diminution dans le groupe EPC des lymphocytes NK et des lymphocytes T dans la condition « non infectées ». Après infection par *P. aeruginosa*, il n'y avait pas de différence mise en évidence.



### 4.3.5. Analyse métagénomique de la composition du microbiote digestif

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence une altération du microbiote digestif (colique et iléal) spécifique du groupe colonisé par EPC, et en partie restaurée par la FMT. Pour cela, une technique de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S a été utilisée. Les données brutes ainsi que les métadonnées des 64 échantillons séquencés ont été déposées sur *Sequence Read Archive* (237) sous le numéro BioProject PRJNA563864 (Annexe 2). Elles seront librement accessibles après publication de l'article.

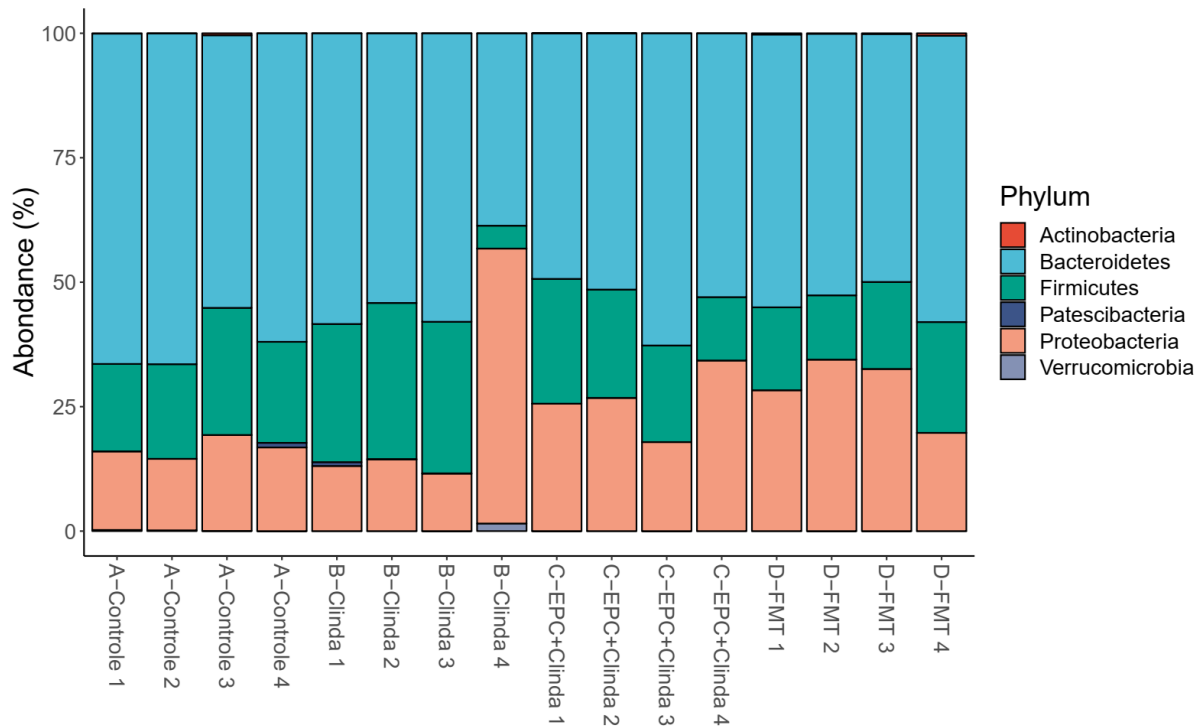
#### Colon



**Figure 67. Alpha diversité au niveau du côlon.** n=4 souris par groupe.

L'alpha-diversité était la plus importante dans le groupe contrôle, et la plus basse dans le groupe colonisé par EPC (Figure 67). Les groupes clindamycine et FMT présentaient une alpha-diversité intermédiaire. À noter que le groupe clindamycine présentait une forte variabilité intragroupe : deux individus présentaient une alpha-diversité intermédiaire, pour un individu l'alpha-diversité était similaire aux contrôles, et pour un

autre elle était similaire au groupe colonisé par EPC. Il est possible qu'au moment du prélèvement (7 jours après la dernière injection de clindamycine), le microbiote digestif initialement altéré par l'antibiothérapie soit en cours de reconstitution, mais que cette reconstitution ne soit pas homogène selon les individus. Cette hypothèse pourrait être confirmée par la réalisation de prélèvements plus tardifs.

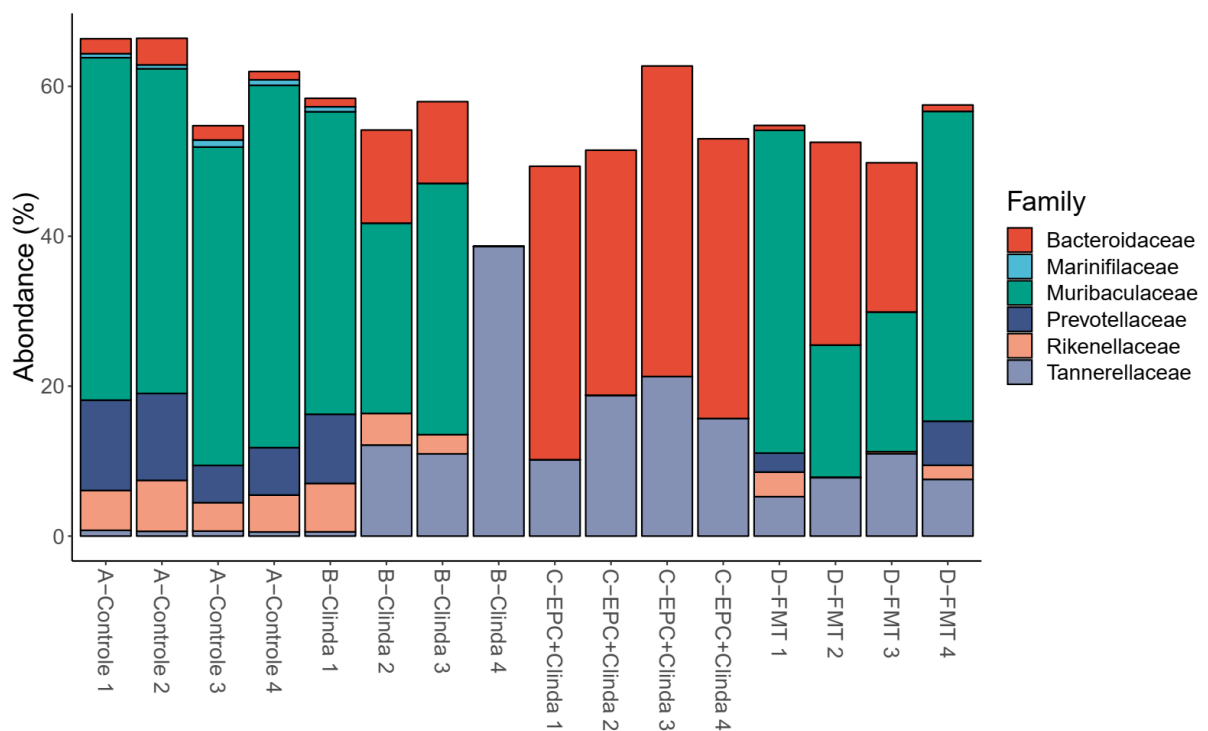


**Figure 68. Abondance relative des différents phyla au niveau du côlon.**

En se positionnant au niveau de classification le plus large (phylum) on observe très peu de modifications entre les groupes. Les principaux phyla détectés sont les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes*, et les *Proteobacteria*, comme dans la plupart des études métagénomiques concernant des prélèvements digestifs murins (Figure 68).

Les rares bactéries du phylum *Actinobacteria* détectées appartenaient principalement au genre *Bifidobacterium*, mais étaient peu abondantes. Le phylum *Actinobacteria* était plus représenté dans les groupes contrôle et FMT.

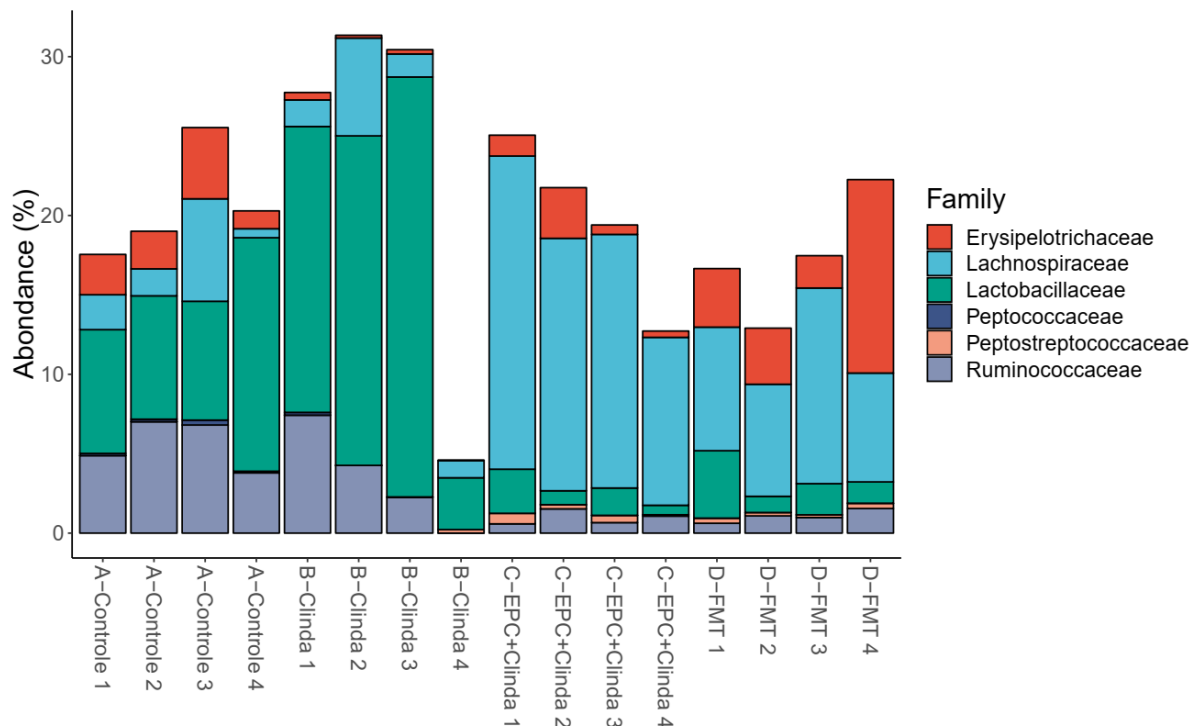
Les *Patescibacteria*, *Tenericutes* et *Verrucomicrobia* étaient présents en trop faible abondance pour présenter une signification dans notre modèle. À noter toutefois que le phylum *Verrucomicrobia* correspondait au genre *Akkermansia* et était présent principalement chez les souris contrôles et clindamycine à des niveaux très faibles. L'espèce *Akkermansia muciniphila* est considérée comme bénéfique et associée à une diminution de l'inflammation, ainsi que des maladies métaboliques et cardio-vasculaires (238).



**Figure 69. Abondance relative des différentes familles de *Bacteroidetes* au niveau du côlon.**

Les modifications les plus importantes étaient observées pour la famille *Muribaculaceae* (Figure 69). Cette famille représentait 44 % des séquences pour les contrôles, mais moins de 0,01 % en cas de colonisation par EPC. On observait une restauration dans le groupe FMT (30 % des séquences), et cette famille était également présente dans le groupe clindamycine seule (25 %).

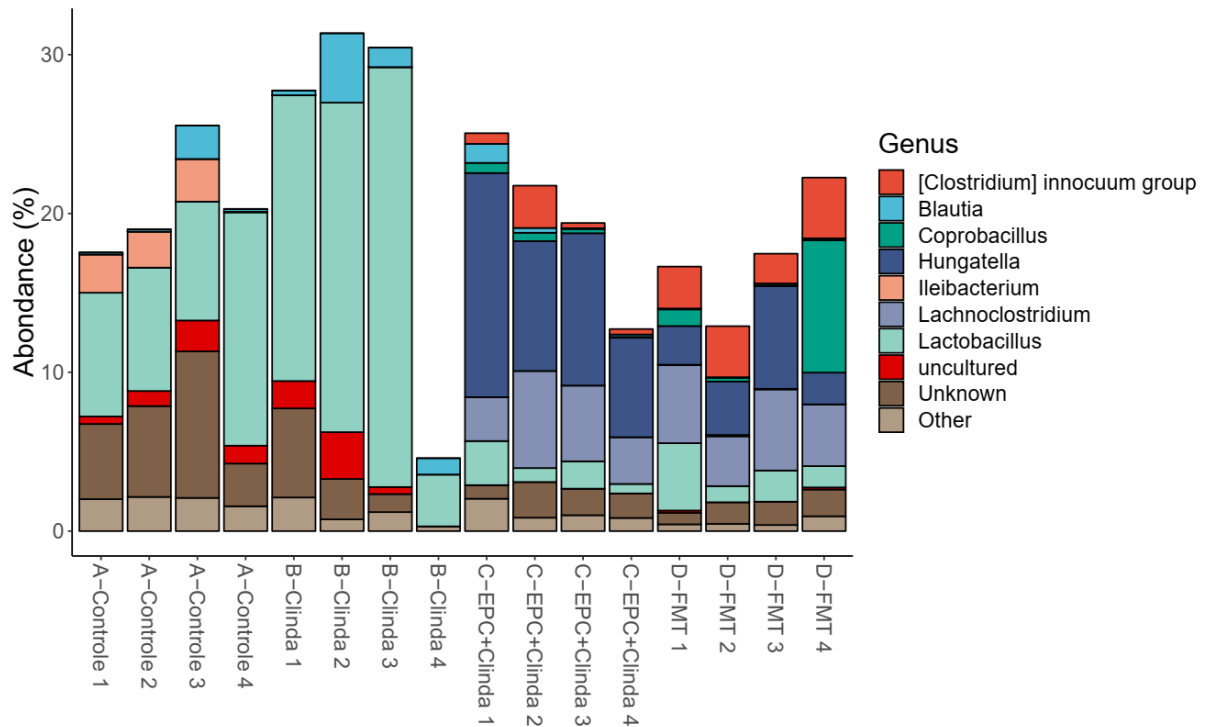
Une expansion des *Tannerellaceae* était observée dans tous les groupes ayant reçu de la clindamycine (groupe clindamycine, EPC et FMT). Les *Tannerellaceae* correspondaient exclusivement au genre *Parabacteroides*. Même s'il n'est pas possible d'identifier les séquences au niveau de l'espèce, dans la littérature *Parabacteroides distasonis* est décrit comme très abondant chez les patients atteints de maladie de Crohn, et serait un marqueur de dysbiose (239).



**Figure 70. Abondance relative des différentes familles de *Firmicutes* au niveau du côlon.**

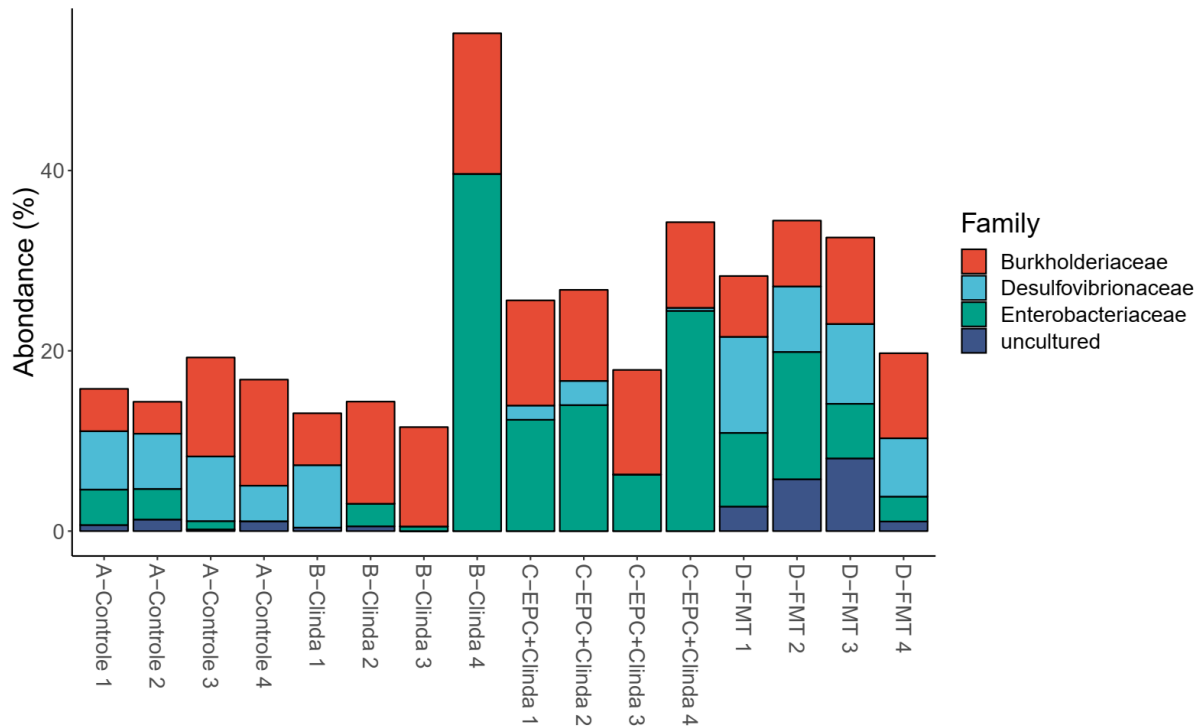
Parmi les *Firmicutes*, les modifications majeures étaient marquées par une expansion des *Lachnospiraceae* dans les groupes colonisés par EPC et FMT. Parmi ces *Lachnospiraceae*, les genres *Hungatella* et *Lachnoclostridium* étaient dominants dans les groupes EPC et FMT ; et le genre *Blautia* dans les groupes contrôle et clindamycine.

Les *Lactobacillaceae* identifiés au niveau du genre correspondaient exclusivement à *Lactobacillus*, et présentaient une abondance de l'ordre de 10 à 20 % dans les groupes contrôle et clindamycine.



**Figure 71. Abondance relative des différents genres de *Firmicutes* au niveau du côlon.**

Même si la famille *Erysipelotrichaceae* était détectée dans tous les groupes, en pratique elle se décomposait en 4 genres répartis différemment. *Ileibacterium* et *Dubosiella* étaient présents dans les groupes contrôle et clindamycine ; tandis que *[Clostridium] innocuum group* et *Coprobacillus* étaient présents dans les groupes EPC et FMT (Figure 71). *Ileibacterium* et *Dubosiella* font partie du microbiote digestif murin normal (240). *[Clostridium] innocuum* pourrait être responsable de diarrhées associées aux antibiotiques chez l'homme (241). Plus de 10 % des souches de *C. innocuum* seraient résistantes à la clindamycine (242). Le nom du genre de *C. innocuum* va probablement être modifié dans l'avenir, car il appartient à la famille des *Erysipelotrichaceae* et non aux *Clostridiaceae*, d'où l'utilisation de crochets dans les bases de données taxonomiques.



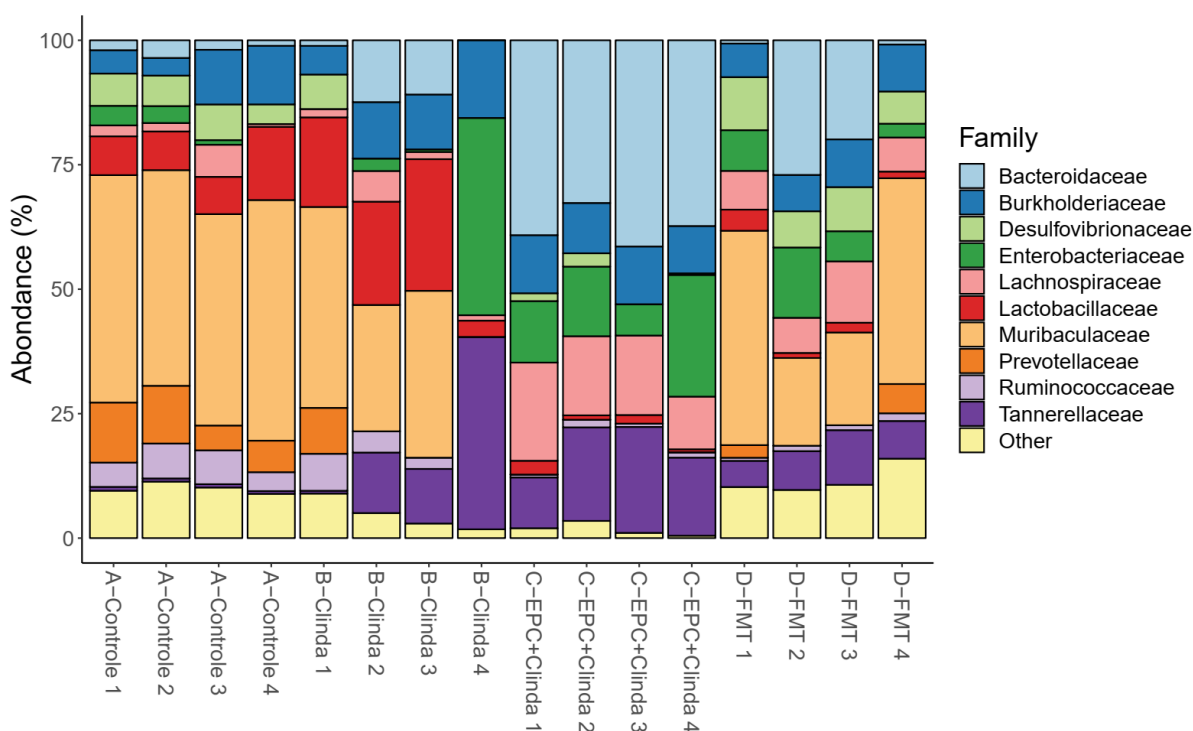
**Figure 72. Abondance relative des différentes familles de *Proteobacteria* au niveau du côlon.**

Les séquences de la famille *Burkholderiaceae* correspondaient au genre *Parasutterella*. Cette précision est importante car le genre *Burkholderia* correspond souvent à des contaminants retrouvés dans les réactifs d'extraction ou d'amplification. Ici, aucun *read* n'a été identifié comme appartenant au genre *Burkholderia*. *Parasutterella* n'a probablement pas d'impact dans notre modèle, étant donné que l'abondance est conservée entre les groupes, mais il s'agit bien d'un taxon retrouvé dans le microbiote digestif murin et humain (243).

Les séquences appartenant à la famille *Desulfovibrionaceae* correspondent au niveau du genre principalement à des bactéries non cultivées, ainsi qu'au genre *Bilophila*. Aucun *read* n'a été identifié comme appartenant au genre *Desulfovibrio*, qui pourrait correspondre à des séquences contaminantes (43). Étant donné que la répartition des *Desulfovibrionaceae* n'est pas homogène entre les groupes, et que *Bilophila* est un genre fréquemment retrouvé au niveau digestif, il est peu probable que les séquences appartenant aux genres non cultivés soient des contaminants.

On observe une augmentation du pourcentage d'*Enterobacteriaceae* dans les groupes EPC et FMT. Le groupe clindamycine présente une abondance d'*Enterobacteriaceae* comparable au groupe contrôle, sauf pour une souris (souris Clinda 4) qui fait figure d'*outlier* et présente l'abondance la plus élevée du jeu de données. Les *Enterobacteriaceae* étaient rarement identifiables au niveau du genre, mais lorsque l'identification était possible on retrouvait principalement *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella* et *Enterobacter*. Les techniques de culture conventionnelles mises en œuvre dans le chapitre 4.3.2 sont plus adaptées pour analyser la composition en entérobactéries.

### Vue d'ensemble du microbiote colique



**Figure 73. Abondance relative des différentes familles au niveau du côlon.**

La Figure 73 donne une vue d'ensemble des 10 familles bactériennes les plus abondantes au niveau du côlon.

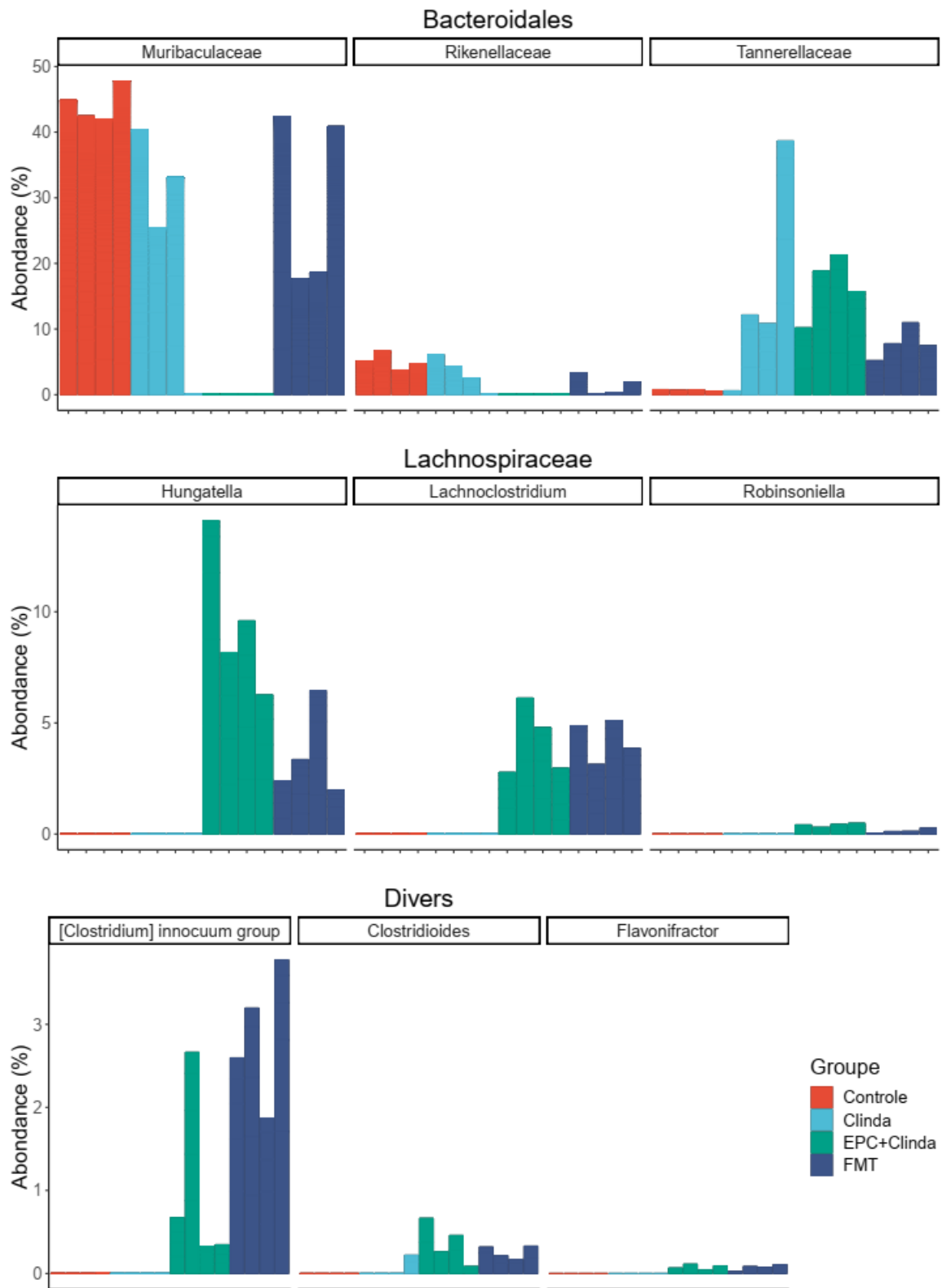
Une analyse statistique de la composition du microbiote colique a été réalisée par la méthode ANCOM. Seuls les 3 groupes Contrôle, EPC+Clinda, et FMT ont été conservés dans l'analyse statistique (exclusion du groupe clindamycine). L'analyse statistique portait uniquement sur les 3 groupes principaux, car le nombre d'individus par groupe

était faible (n=4 par groupe) et le groupe clindamycine n'était pas homogène. La liste complète des genres variant significativement est reprise dans le Tableau 6.

**Tableau 6. Analyse statistique des variations de la composition du microbiote colique par méthode ANCOM (réalisée au niveau du genre bactérien).**

	W	Reject null hypothesis
D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae; <b>D_5_Hungatella</b>	154	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae</b> ;D_5_uncultured bacterium	149	TRUE
D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae; <b>D_5_Robinsoniella</b>	143	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae</b> ;	142	TRUE
D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Peptostreptococcaceae; <b>D_5_Clostridioides</b>	141	TRUE
D_1_Firmicutes;D_2_Erysipelotrichia;D_3_Erysipelotrichales;D_4_Erysipelotrichaceae; <b>D_5_[Clostridium] innocuum group</b>	141	TRUE
D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Ruminococcaceae; <b>D_5_Flavonifractor</b>	140	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae</b> ;D_5_Muribaculum	137	TRUE
D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales;D_4_Lachnospiraceae; <b>D_5_Lachnoclostridium</b>	135	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Tannerellaceae</b> ;D_5_Parabacteroides	134	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;	133	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae</b> ;D_5_mouse gut metagenome	131	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae</b> ;D_5_Gram-negative bacterium cTPY-13	130	TRUE
D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_uncultured;D_5_gut metagenome	126	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Rikenellaceae</b> ;D_5_Alistipes	126	TRUE
D_1_Proteobacteria;D_2_Gammaproteobacteria;D_3_Enterobacteriales;D_4_Enterobacteriaceae;D_5_Klebsiella	125	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales;D_4_Marinifilaceae;D_5_Odoribacter	119	TRUE
D_1_Proteobacteria;D_2_Alphaproteobacteria;D_3_Rhodospirillales;D_4_uncultured;	118	TRUE
D_1_Firmicutes;D_2_Clostridia;D_3_Clostridiales; <b>D_4_Lachnospiraceae</b> ;D_5_Lachnospiraceae NK4A136 group	118	TRUE





**Figure 74. Principaux taxons variant significativement d'après l'analyse ANCOM au niveau du côlon.**

La quasi-extinction des *Muribaculaceae* observée dans le groupe colonisé par EPC est le résultat principal observé dans notre modèle. Les *Muribaculaceae* présentaient une abondance majeure dans le groupe contrôle (44 %), ainsi que dans les groupes clindamycine (25 %) et FMT (30 %). La sévérité de la pneumopathie à *P. aeruginosa* n'étant augmentée que dans le groupe EPC, une famille bactérienne majeure quasi éliminée uniquement dans ce groupe présente donc un intérêt particulier.

Les *read* classés dans le genre *Hungatella* correspondent probablement à *H. hathewayi*. L'autre espèce appartenant au genre *Hungatella*, *H. effluvii*, a été isolée à partir d'une station de traitement d'eaux usées et n'est pas décrite comme appartenant au microbiote digestif murin ou humain (244). *H. hathewayi* était plus connue sous le nom de *Clostridium hathewayi*, mais elle a été reclassée en 2014 (244), comme c'est le cas pour de nombreux *Clostridium*. Il s'agit d'une bactérie fréquemment retrouvée au niveau du tube digestif humain ; 25 % des adultes sains seraient porteurs de *H. hathewayi* (245). Son rôle n'est pas encore clairement défini, cependant le portage de *H. hathewayi* a été associé au cancer colorectal dans une population chinoise (246).

*H. hathewayi* fait partie des bactéries productrices de butyrate, mais contrairement à *Faecalibacterium prausnitzii* elle ne présentait pas d'effet anti-inflammatoire dans un modèle murin de colite (247). La co-incubation de *H. hathewayi* avec des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse provoquait une diminution très importante de la sécrétion d'IL-10. Cette diminution de la sécrétion d'IL-10 était également retrouvée pour des lymphocytes T après restimulation *ex vivo* en présence de *H. hathewayi* (247). L'IL-10 étant une cytokine anti-inflammatoire, la diminution de la sécrétion d'IL-10 associée à l'expansion de *H. hathewayi* pourrait provoquer une tendance proinflammatoire au niveau digestif.

*Hungatella* est également associée à la production de triméthylamine N-oxide (TMAO), un métabolite proathérogène augmentant le risque de mortalité d'origine cardiovasculaire (248, 249). À l'inverse, la famille *Muribaculaceae* était corrélée négativement aux niveaux de TMAO et à la formation de plaque d'athérome dans un autre modèle murin (250). L'association d'une quasi-extinction des *Muribaculaceae* et d'une augmentation majeure des *Lachnospiraceae* (dont *Hungatella*) observée dans notre modèle lors de la colonisation par EPC (mais pas en cas d'injection de clindamycine seule), pourrait

suggérer un impact de la colonisation par *K. pneumoniae* sur le risque cardio-vasculaire. Cependant il ne s'agit que de données préliminaires, et ce n'était pas l'objet du travail réalisé ici.

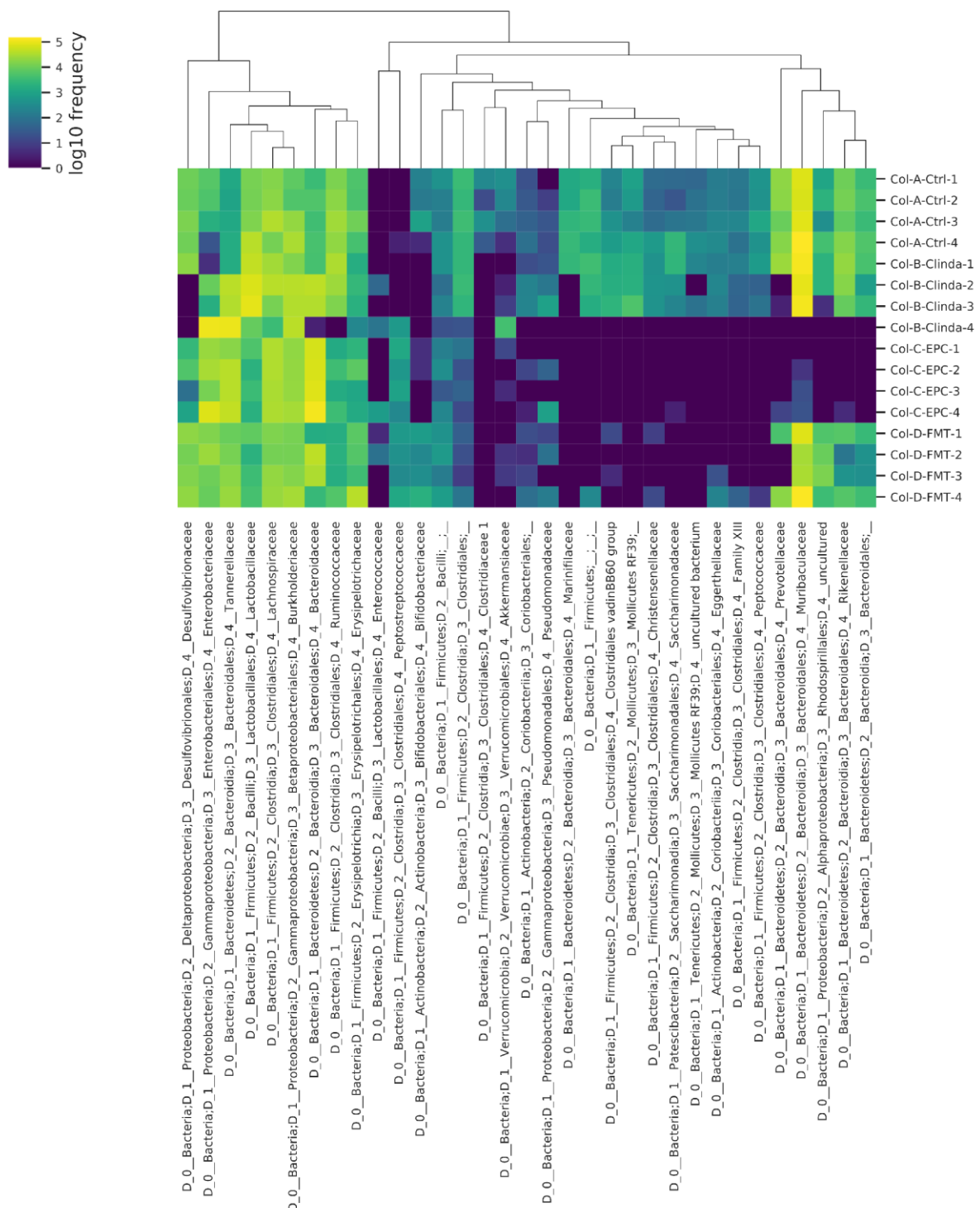


Figure 75. Heatmap des principales familles bactériennes au niveau du côlon.

## Iléon

Les résultats de l'analyse métagénomique réalisée au niveau du contenu iléal présentent moins de différences inter-groupes qu'au niveau colique.

En résumé, on retrouvait une alpha-diversité moins importante dans le groupe colonisé par EPC (Figure 76), une quasi-extinction des *Muribaculaceae* dans le groupe EPC uniquement (Figure 78), et un microbiote dominé par les *Enterobacteriaceae*, notamment dans les groupes clindamycine, EPC et FMT (Figure 80).

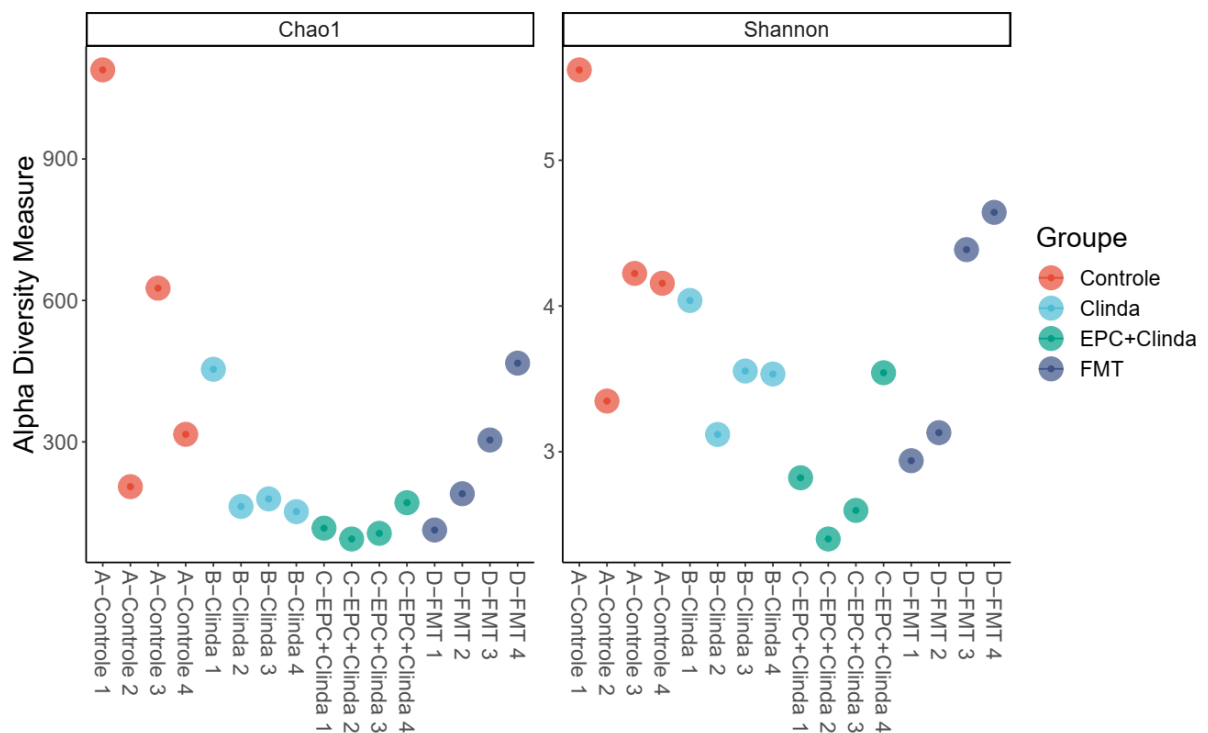
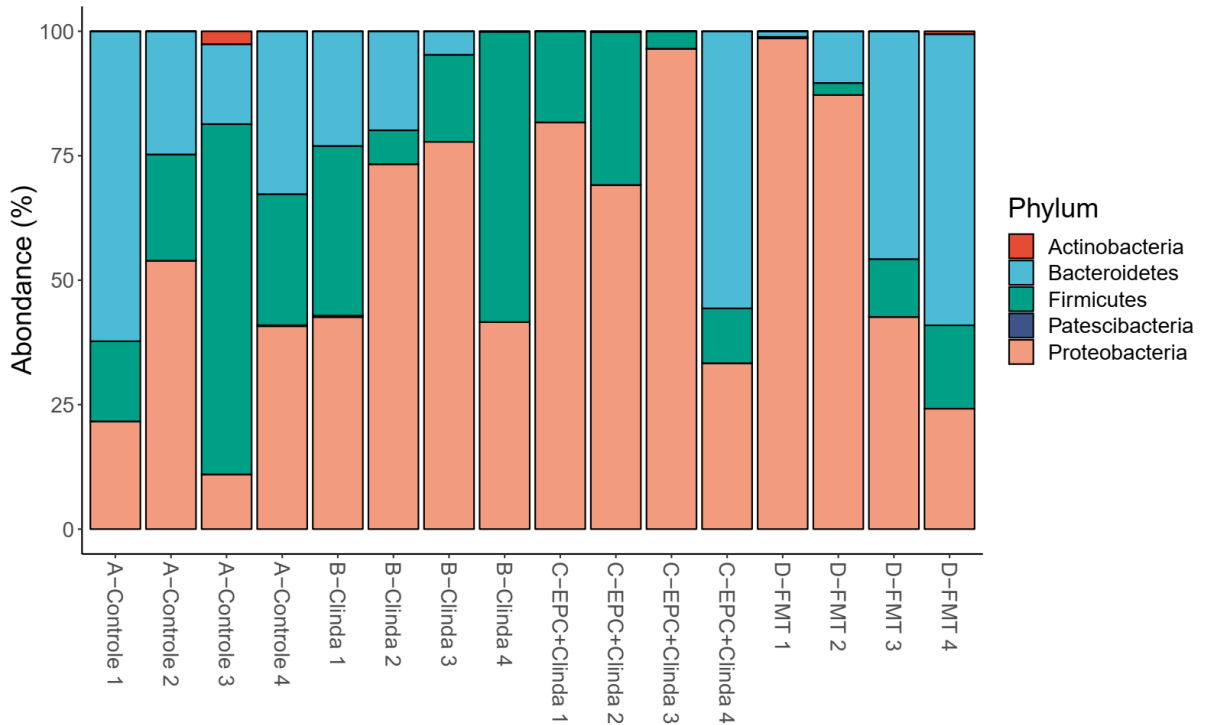
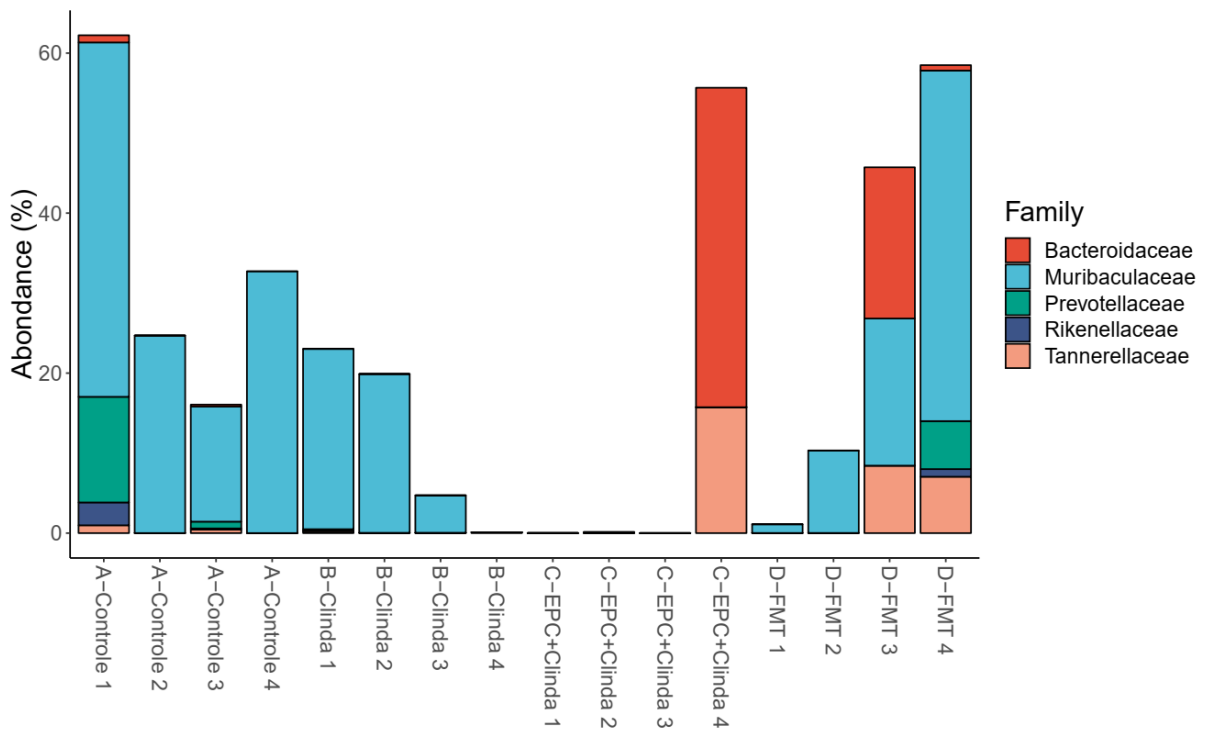


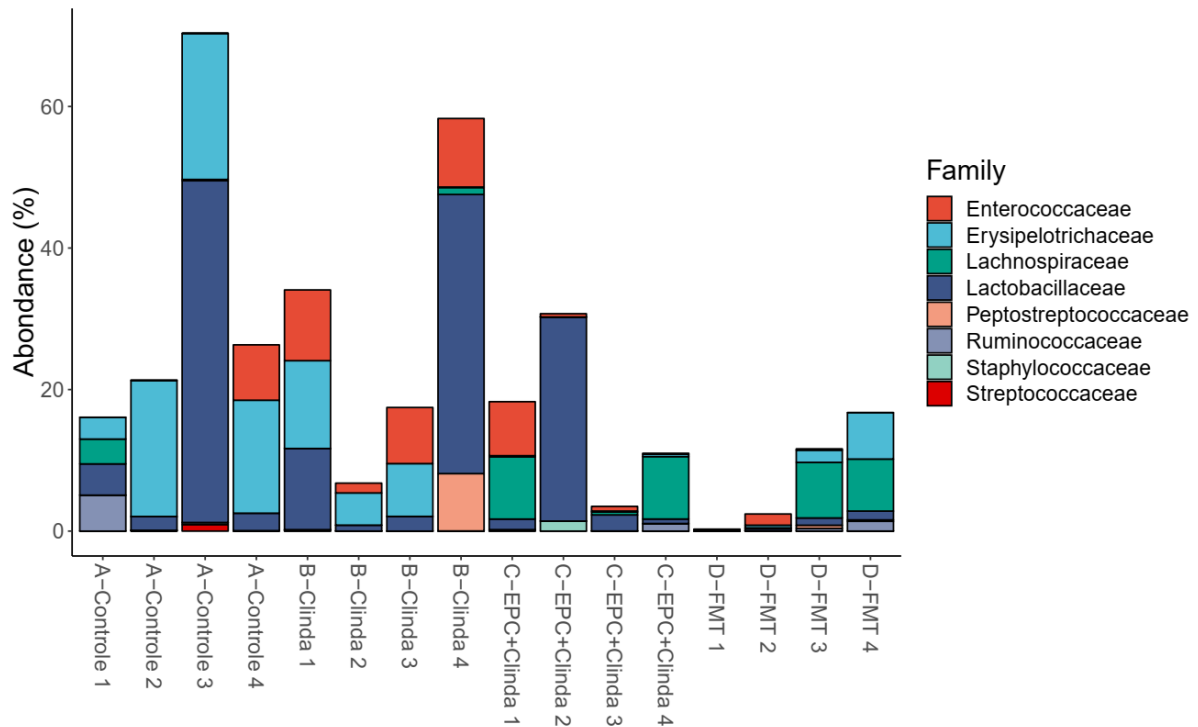
Figure 76. Alpha diversité au niveau de l'iléon. n=4 souris par groupe.



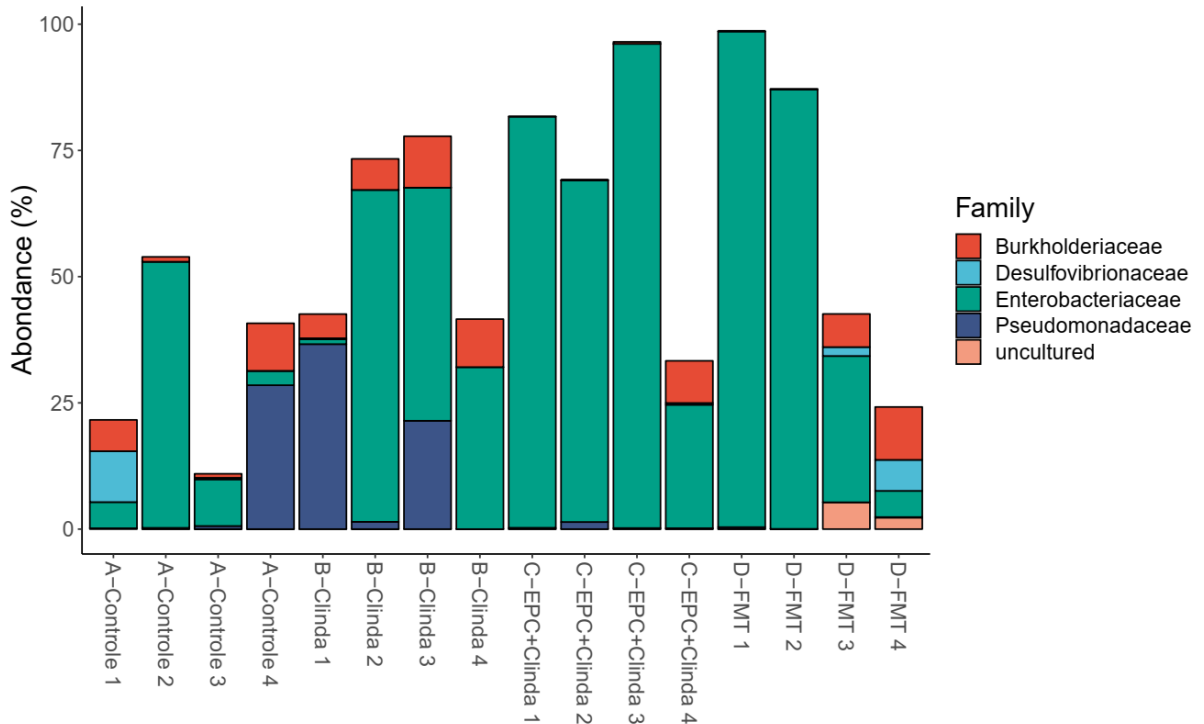
**Figure 77. Abondance relative des différents phyla au niveau de l'iléon.**



**Figure 78. Abondance relative des différentes familles de *Bacteroidetes* au niveau de l'iléon.**

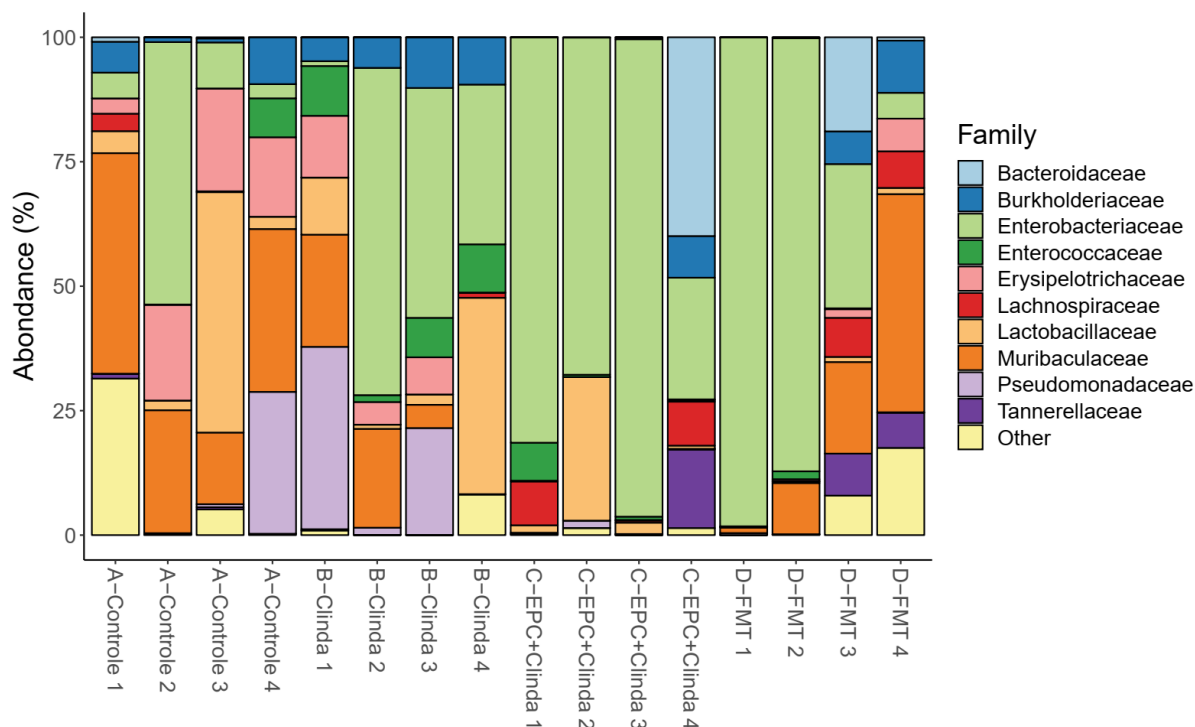


**Figure 79. Abundance relative des différentes familles de *Firmicutes* au niveau de l'iléon.**



**Figure 80. Abundance relative des différentes familles de *Proteobacteria* au niveau de l'iléon.**

## Vue d'ensemble du microbiote iléal



**Figure 81. Abondance relative des différentes familles au niveau de l'iléon.**

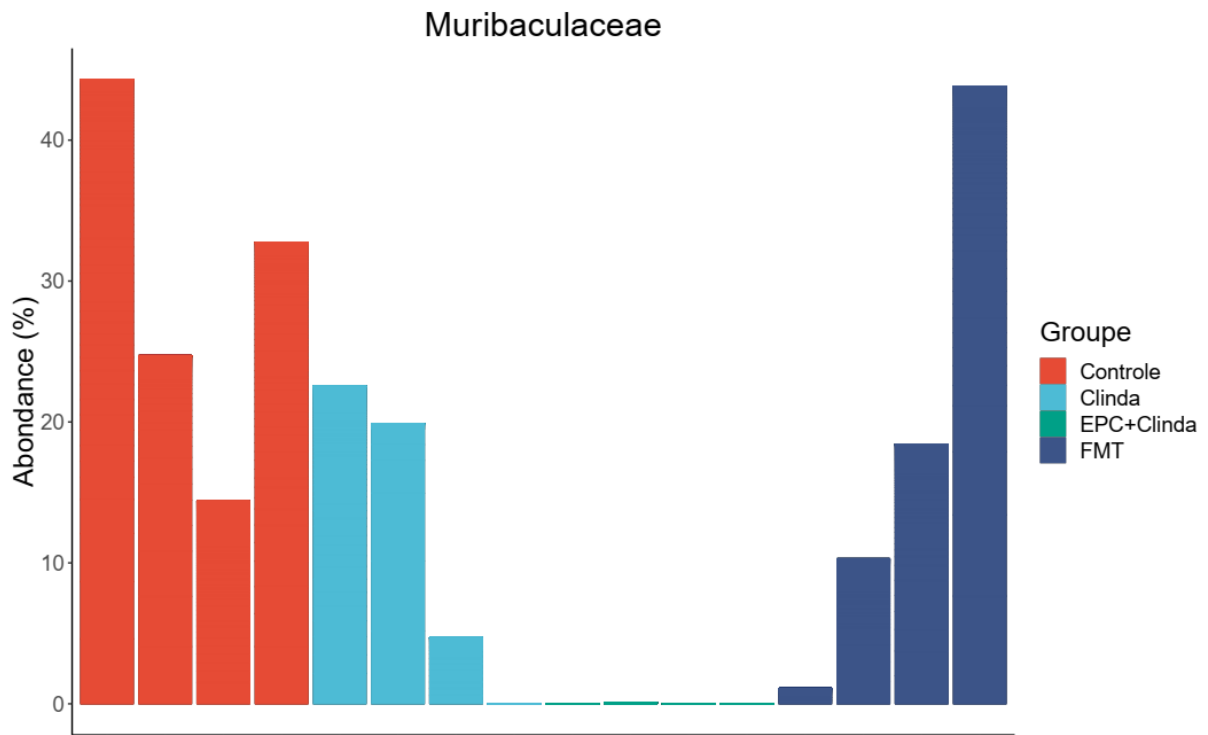
Une analyse statistique de la composition du microbiote colique a été réalisée par la méthode ANCOM portant sur les 3 groupes Contrôle, EPC+Clinda, et FMT (Tableau 7).

**Tableau 7. Analyse statistique des variations du microbiote iléal par méthode ANCOM.**

	W	Reject null hypothesis
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae;</b> D_5_uncultured bacterium	92	TRUE
D_1_Bacteroidetes;D_2_Bacteroidia;D_3_Bacteroidales; <b>D_4_Muribaculaceae;</b> —	91	TRUE

Au niveau de l'iléon, seule la famille *Muribaculaceae* était significativement diminuée dans le groupe EPC (0,02 %), mais son abondance restait élevée dans les groupes contrôle (29 %), clindamycine (12 %) et FMT (18 %) (Figure 82).





**Figure 82. Seul taxon variant significativement d'après l'analyse ANCOM au niveau de l'iléon.**

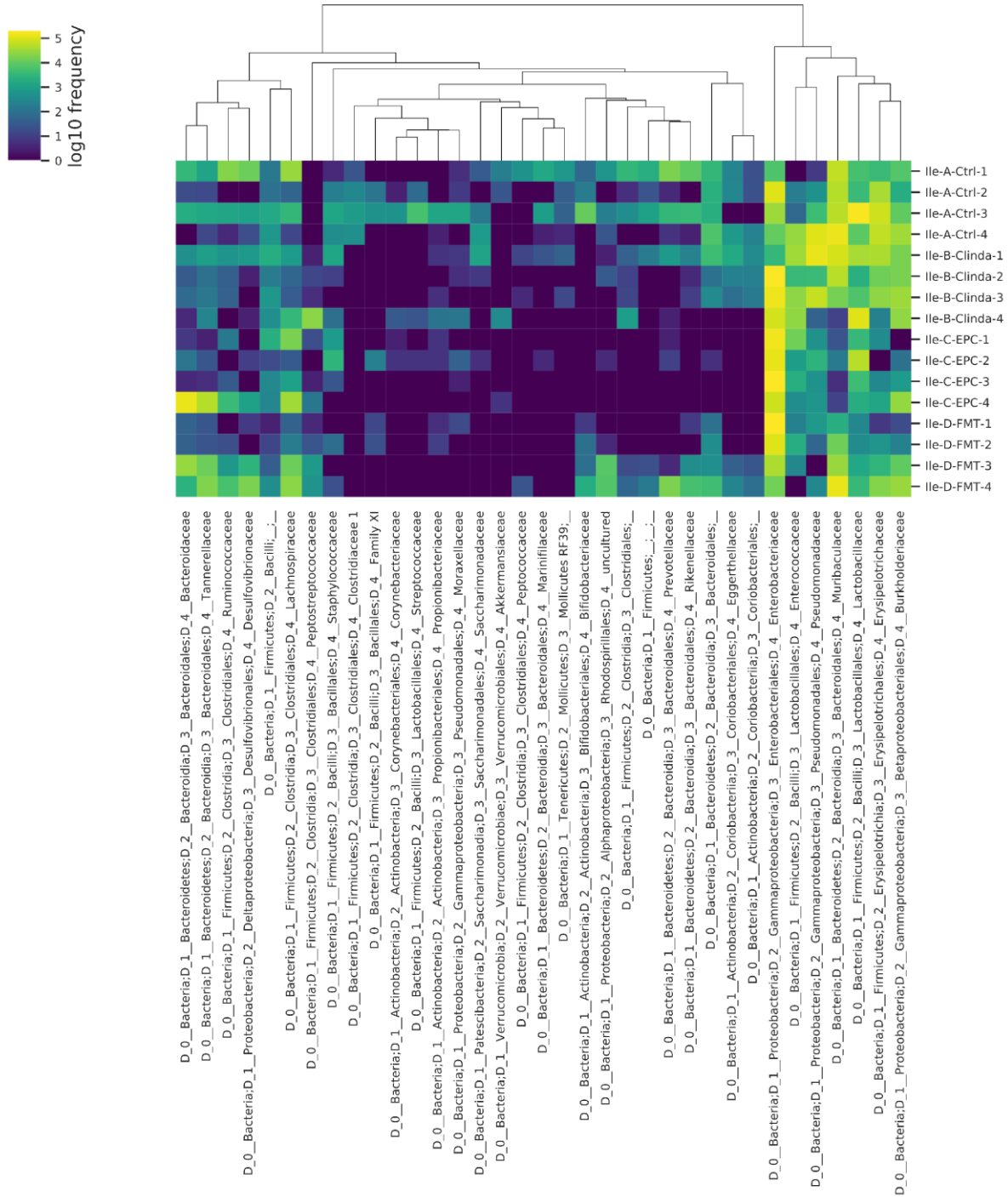


Figure 83. Heatmap des principales familles bactériennes au niveau de l'iléon.

## Importance de la base de données taxonomique utilisée

De nombreuses bases de données sont utilisées pour l'analyse bio-informatique des données de métagénomique. Certaines sont propriétaires (MicroSEQ, utilisée par Ion Reporter), d'autres *open source* (GreenGenes et SILVA, utilisées par Qiime 2). Le choix de la base de données utilisée impacte considérablement les résultats de l'analyse métagénomique.

Initialement une première analyse métagénomique avait été réalisée en utilisant le Ion Reporter Software Metagenomics Workflow, un logiciel propriétaire fourni par Thermo Fisher. L'outil Ion Reporter comporte deux bases de données : Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 et Curated GreenGenes v13.5. Avec Ion Reporter, les *read* sont d'abord mappés sur la base MicroSEQ, puis en cas d'échec sur leur version *curated* de GreenGenes. Ces deux bases de données ont été mises à jour pour la dernière fois en 2013.

En réalisant un diagramme « Krona » du microbiote digestif d'un individu du groupe contrôle, après analyse par Ion Reporter ou alors par Qiime 2 et SILVA, on peut visualiser des différences majeures au sein des *Bacteroidetes* (Figure 84). Pour information les abondances relatives des différentes familles après analyse par Qiime 2 et SILVA ne sont pas strictement identiques à celles indiquées dans les Figures du chapitre 4.3.5, car la Figure 84 a été réalisée sans éliminer les taxons inférieurs à 0,5 % d'abondance, afin de pouvoir être comparée à l'analyse par Ion Reporter.

La famille *Muribaculaceae* semble donc absente de deux bases de données Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 et Curated GreenGenes v13.5 utilisées par Ion Reporter. La famille *Muribaculaceae* semblait particulièrement importante dans notre modèle, car elle représentait 40 à 50 % des séquences des souris contrôles, comme nous l'avons montré précédemment en utilisant SILVA v132. Pourtant, la version officielle de GreenGenes 13.5 inclut bien la famille *Muribaculaceae* (sous l'ancienne dénomination S24-7). Il est probable que sur la version de GreenGenes « curated », utilisée par Thermo Fisher, cette famille ait été exclue pour une raison inconnue.

Ion Reporter classait à tort les séquences correspondant aux *Muribaculaceae* dans les *Porphyromonadaceae* ou dans les *Bacteroidaceae*. Étant donné qu'on observe dans notre

modèle une quasi-extinction des *Muribaculaceae* pour le groupe de souris colonisées par EPC, associée à une expansion des *Tannerellaceae* ou des *Bacteroidaceae*, cette mauvaise classification de la famille *Muribaculaceae* aurait été problématique et nous n'aurions probablement pas observé de différence de composition du microbiote au sein des *Bacteroidetes*.

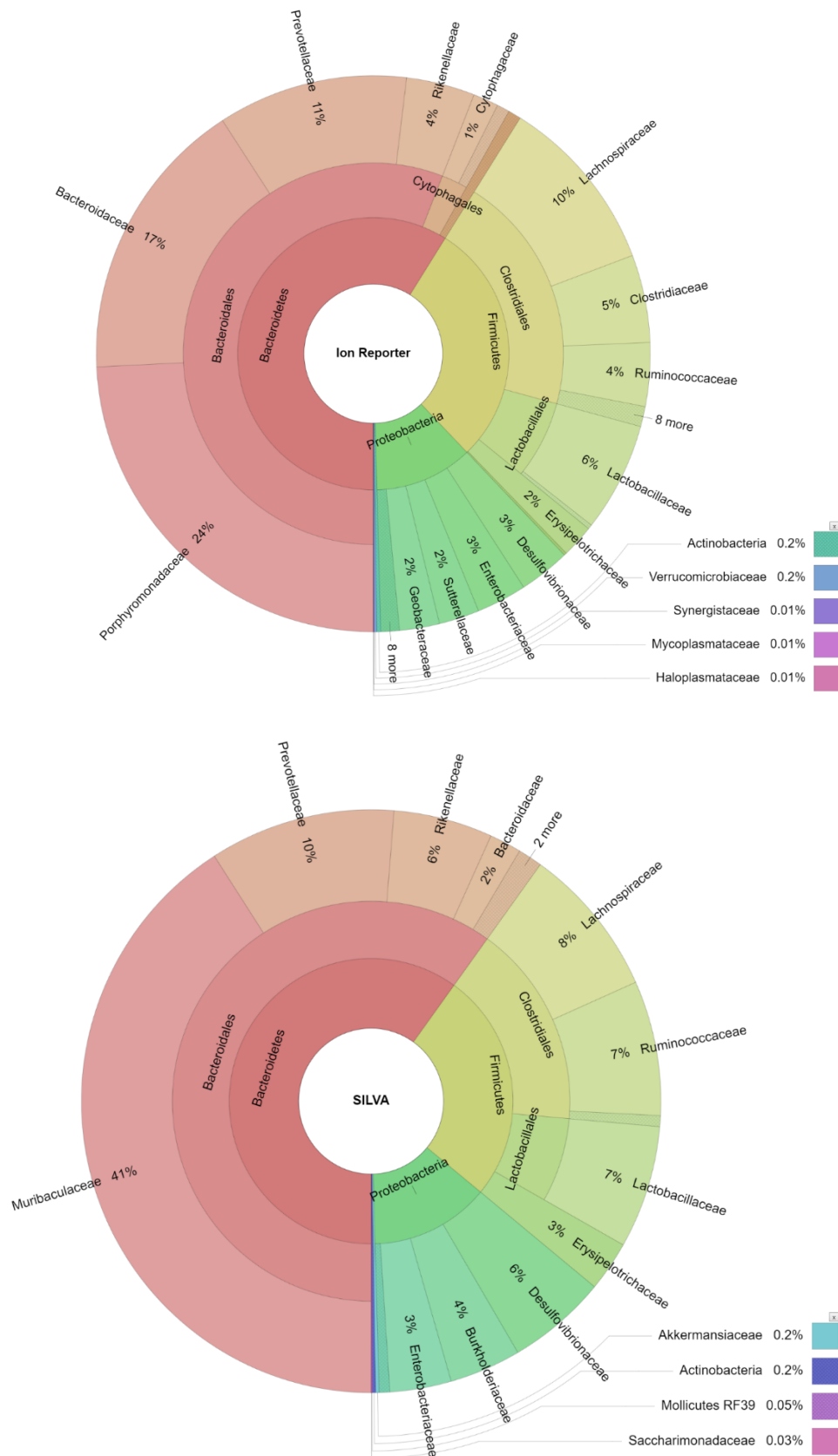


Figure 84. Diagramme Krona du microbiote colique de la souris Contrôle-1, après analyse par Ion Reporter (en haut) ou SILVA (en bas).

Ces problèmes de classification des *Muribaculaceae* liés à l'utilisation de certaines bases de données ont été publiés très récemment par l'équipe ayant décrit les *Muribaculaceae* (153). La base de données Ribosomal Database Project (RDP) semblait concernée (153), mais ce problème n'était pas décrit pour les bases MicroSEQ ainsi que pour la version *curated* de la base GreenGenes utilisée par le logiciel Ion Reporter.

Les deux exemples suivants reprennent des séquences classées à tort en tant que *Porphyromonadaceae* par Ion Reporter, correspondant en fait à des *Muribaculaceae* après vérification sur BLAST (Figure 85).

```
>MG|3|V4|F|92|88.16|Bacteroidetes|Bacteroidia|Bacteroidales|Porphyromonadaceae
CGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGCAGGCGGAATGTCAAG
TCAGCGGTAATAATTTCTGGGGCTCAACCCCGTCGTGCCGTTGAAACTGGCGTTCTTGAGTGAGC
GAGAAGTATGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCACGCAGAACTCCGAT
TGCGAAGGCAGCATACCGGCGCTCAACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGTATCGA
```

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Muribaculum intestinale strain YL27 genome</a>	403	1614	100%	7e-110	96.33%	<a href="#">CP021421.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Muribaculum intestinale strain YL27 chromosome, complete genome</a>	403	1614	100%	7e-110	96.33%	<a href="#">CP015402.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Muribaculum intestinale strain YL27 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	403	403	100%	7e-110	96.33%	<a href="#">NR_144616.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Duncaniella muris strain 129-Nlrp6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	392	392	100%	2e-106	95.51%	<a href="#">MG970328.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Paramuribaculum intestinale strain B1117 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	353	353	100%	7e-95	92.68%	<a href="#">MG970331.1</a>

```
>MG|3|V4|R|335|86.18|Bacteroidetes|Bacteroidia|Bacteroidales|Porphyromonadaceae
TCGATACCCACACTTTTCGTGCATGAGCGTCAGTTGAGCGCCGGTATGCTGCCTTCGCAATCGG
AGTTCTGCGTGATATCTATGCATTTACCGCTACACCACGCATTCCGCATACTTCTCGCTCAC
TCAAGAAAACCAGTTTCAACGGCTCGAAGAGGTTGAGCCTCTCAATTTTACCGCTGACTTGA
TCTTCCGCTGCGCACCCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTCGCATCCTCCG
```

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Duncaniella muris strain 129-Nlrp6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	453	453	100%	7e-125	100.00%	<a href="#">MG970328.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Muribaculum intestinale strain YL27 genome</a>	364	1459	100%	3e-98	93.47%	<a href="#">CP021421.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Muribaculum intestinale strain YL27 chromosome, complete genome</a>	364	1459	100%	3e-98	93.47%	<a href="#">CP015402.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Muribaculum intestinale strain YL27 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	364	364	100%	3e-98	93.47%	<a href="#">NR_144616.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Paramuribaculum intestinale strain B1117 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	353	353	100%	7e-95	92.65%	<a href="#">MG970331.1</a>

**Figure 85. Séquences de *Muribaculaceae* classées à tort dans les *Porphyromonadaceae* par Ion Reporter, résultats de la recherche BLAST.**

Lorsque nous réalisons l'analyse en utilisant la base GreenGenes v13.8 avec Qiime 2 (données non montrées), la plupart des séquences étaient classées correctement, mais avec des noms ne reflétant pas l'évolution de la taxonomie (S24-7 au lieu de *Muribaculaceae*) ainsi qu'une moins bonne discrimination au niveau du genre bactérien. Par exemple on ne mettait pas en évidence la forte augmentation du genre *Hungatella*, car les séquences correspondantes étaient classées comme appartenant au genre *Clostridium* par GreenGenes, ce qui était moins informatif dans notre modèle. La version la plus récente de GreenGenes (v13.8) a été mise à jour pour la dernière fois en 2013, or des remaniements taxonomiques sont réalisés chaque année. Le genre *Hungatella* a été décrit en 2014 (244).

En conclusion, il semble important d'utiliser une base de données *open source* à jour pour l'analyse métagénomique. L'utilisation de bases propriétaires, ou de versions *curated*, est potentiellement problématique, car leur composition n'est pas maîtrisée. L'utilisation de bases qui n'ont pas été mises à jour récemment est également problématique du fait des évolutions de la taxonomie. GreenGenes est toujours très utilisé dans la littérature, notamment du fait des besoins en mémoire RAM inférieurs à SILVA pour classer les séquences à l'aide de Qiime 2. D'après notre expérience, GreenGenes utilisait 10 Go de RAM, ce qui était compatible avec un ordinateur disposant de 16 Go de RAM dans le cadre d'une machine virtuelle. SILVA utilisait 30 Go de RAM, nécessitant un ordinateur disposant de 64 Go de RAM pour fonctionner correctement dans le cadre d'une machine virtuelle.

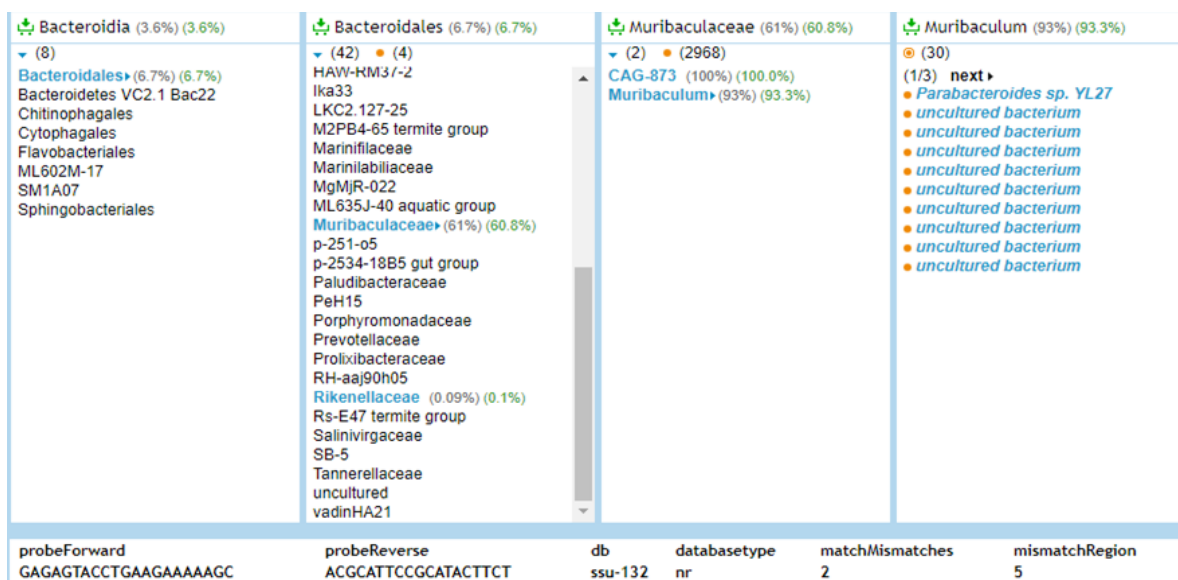
Globalement, SILVA semble être un meilleur choix, la taille de la base de données étant plus importante et les mises à jour plus fréquentes (dernière mise à jour v132 en décembre 2017). En 2018, des chercheurs du Wellcome Trust ont comparé différents classificateurs (MAPseq, mothur, Qiime, Qiime 2) et différentes bases de données (GreenGenes, NCBI, SILVA, RDP). Qiime 2 avec SILVA représentait le meilleur choix pour l'analyse de microbiote digestif humain (251). GreenGenes reste pourtant encore très utilisé dans la littérature, probablement plus que SILVA. À titre d'exemple, dans un article de très bonne qualité publié dans Nature en septembre 2019 (252), l'analyse bio-informatique était réalisée avec GreenGenes v13.5 (mis à jour en mai 2013) et Qiime 1.8 (mis à jour en décembre 2013).

## Mise au point d'une PCR amplifiant les *Muribaculaceae*

Pour réaliser un suivi au cours du temps de la dynamique des *Muribaculaceae* sans avoir à réaliser de métagénomique coûteuse, nous avons souhaité mettre au point une PCR quantitative amplifiant la plupart des *Muribaculaceae*.

Cette PCR a été optimisée sur la souche de référence *Muribaculum intestinale* YL27 isolée du contenu cœcal d'une souris C57BL/6J par Lagkouvardos et coll. (253). Comme aucune amorce n'est publiée dans la littérature pour amplifier les *Muribaculaceae*, nous avons procédé à une analyse *in silico* utilisant la base de données SILVA pour déterminer les régions de l'ADNr 16S spécifiques des *Muribaculaceae*.

Le couple d'amorces Mb-F (GAGAGTACCTGAAGAAAAAGC) et Mb-R (ACGCATTCCGCATACTTCT) a été utilisé. Ce couple d'amorces semblait sensible et spécifique pour la détection des *Muribaculaceae*, en tolérant 2 mésappariements dans la séquence des amorces, dont 0 mésappariement dans les 5 dernières bases (la région où vient se fixer la Taq polymérase). La base de données SILVA a été utilisée pour générer cette analyse (Figure 86).



**Figure 86.** Prédiction du pourcentage de séquences correctement amplifiées avec les amorces choisies au sein de la classe *Bacteroidia*, de l'ordre *Bacteroidales*, de la famille *Muribaculaceae*, et du genre *Muribaculum*.



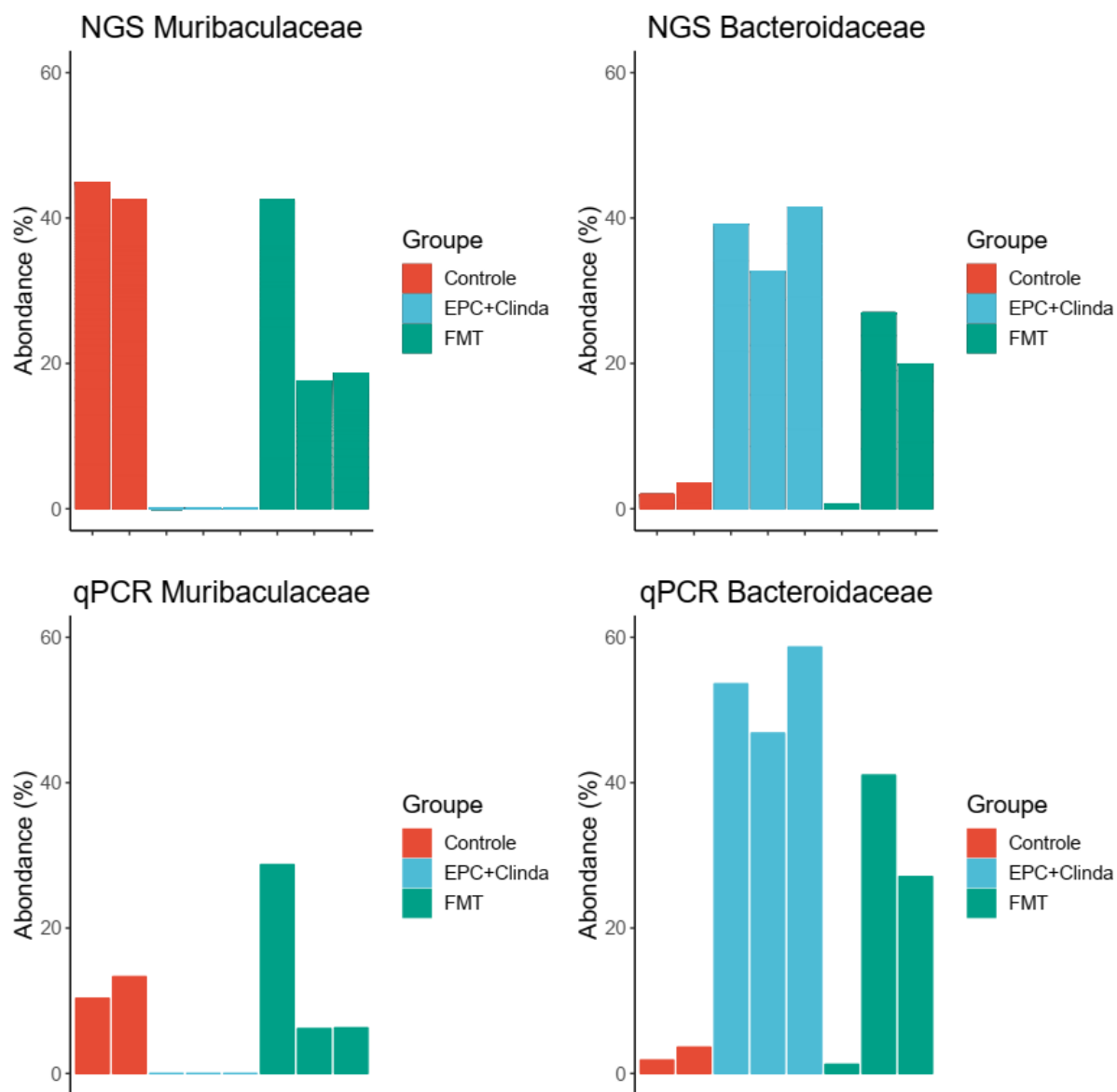
Quatre-vingt-treize pour cent (93 %) des séquences de *Muribaculum*, 61 % des séquences de *Muribaculaceae*, et 6 % des séquences de *Bacteroidales* correspondaient à ces critères pour ce couple d'amorces. Des séquences de référence de souches de *Duncaniella* et *Muribaculum* (appartenant aux *Muribaculaceae*) ainsi que d'espèces phylogénétiquement proches (*Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Parabacteroides*, *Barnesiella*) ont été alignées avec les séquences des deux amorces en utilisant ClustalX.

Après analyse *in silico*, ce couple d'amorces semblait prometteur pour amplifier les bactéries des genres *Muribaculum* et *Duncaniella*. On observe un grand nombre de mésappariements (dont au moins 1 dans les 5 dernières bases) pour des espèces phylogénétiquement proches, mais n'appartenant pas à la famille *Muribaculaceae* (Tableau 8), ce qui garantit la spécificité de ces amorces.

**Tableau 8. Nombre de mésappariements sur les deux amorces Mb-F et Mb-R après alignement avec des souches de référence phylogénétiquement proches des *Muribaculaceae*.**

Famille	Espèce	Genbank	Mismatch Amorce Mb-F	(dont 5 dernière s bases)	Mismatch Amorce Mb-R	(dont 5 dernière s bases)	Mismatch Total	(dont 5 dernière s bases)
<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	NR_119164.1	9	1	4	1	13	2
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	NR_040838.1	5	1	6	2	11	3
<i>Tannerellaceae</i>	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	NR_043317.1	7	1	3	2	10	3
<i>Tannerellaceae</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	NR_074376.1	6	1	3	2	9	3
<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Barnesiella intestihominis</i>	NR_041668.1	3	0	3	1	6	1
<i>Muribaculaceae</i>	<i>Duncaniella muris</i>	MG970328.1	1	0	0	0	1	0
<i>Muribaculaceae</i>	<i>Muribaculum intestinale</i>	NR_144616.1	0	0	0	0	0	0

Des amorces déjà publiées dans la littérature ont été utilisées pour amplifier les *Bacteroidaceae* (205), ainsi que des amorces 16S universelles (204).



**Figure 87. Abondance relative estimée pour la famille *Muribaculaceae* et la famille *Bacteroidaceae*.** Comparaison des résultats obtenus par la méthode référence de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S (en haut), et par la qPCR que nous avons mise au point (en bas) pour 8 échantillons de contenu colique.

La PCR mise au point sous-estime l'abondance des *Muribaculaceae* d'un facteur 2 à 3, mais la même répartition selon les individus est conservée par rapport à la référence (Figure 87). Elle semble donc adaptée pour réaliser un suivi dynamique au cours du temps.

Un suivi de la concentration en *Muribaculaceae* par qPCR normalisée par rapport à l'ADNr 16S a été réalisé pendant 8 jours pour les groupes contrôle, clindamycine et EPC+clindamycine (Figure 88). Chez les souris contrôle, l'abondance relative en *Muribaculaceae* était stable au cours du temps, aux alentours de 20 à 35 %. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment retrouvés par séquençage nouvelle génération estimant la part des *Muribaculaceae* à 44 % (Figure 74). Évidemment, la technique de qPCR mise au point est moins précise que le séquençage nouvelle génération, on observe donc des variations plus importantes (de 20 % à 44 % des séquences pour les 5 individus d'une même cage au point J0, soit un facteur 2).

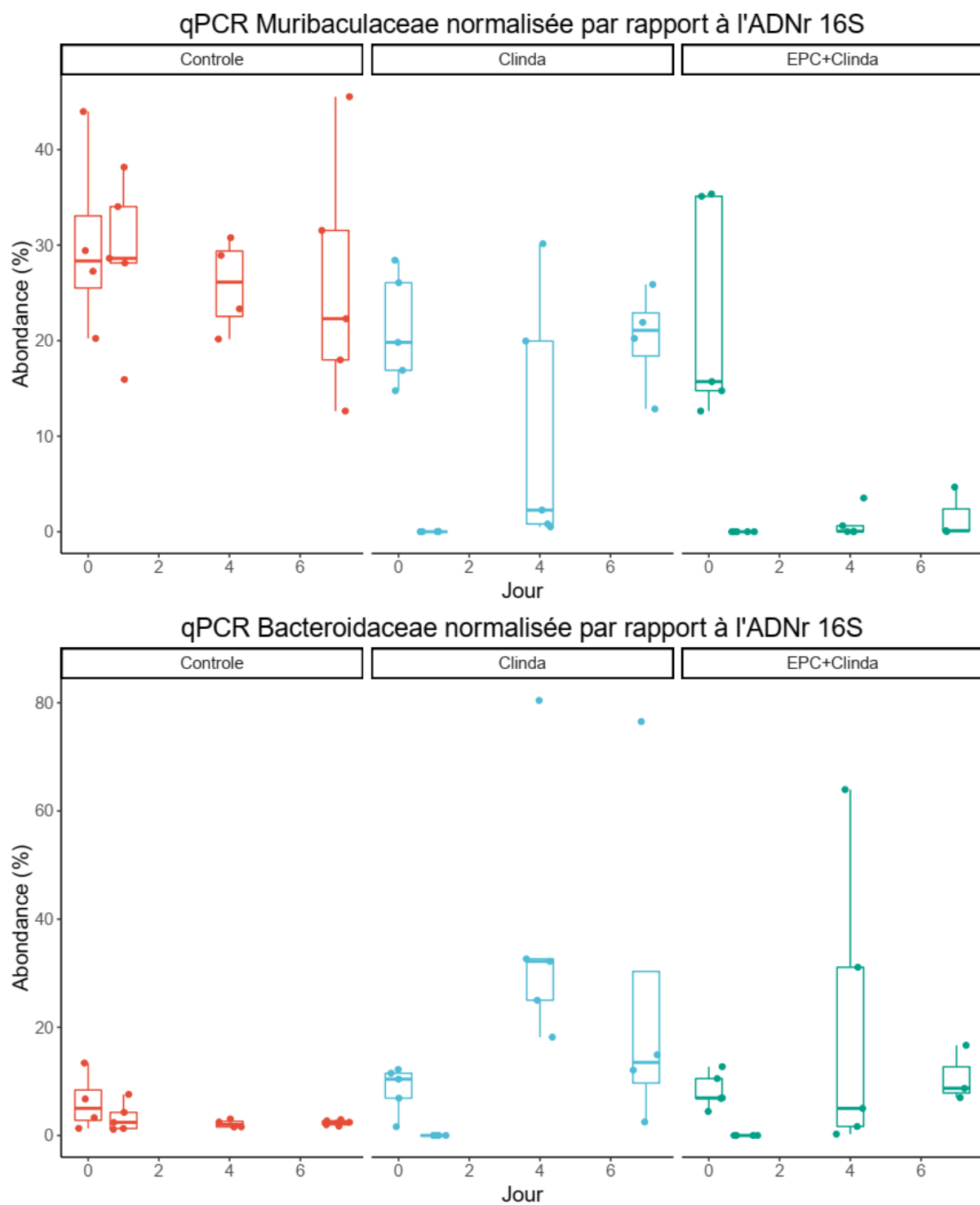
Pour les groupes clindamycine et EPC+clindamycine on observe une diminution majeure des *Muribaculaceae* le lendemain de l'injection de clindamycine (J1), avec une abondance inférieure à 0,01 %. Pour le groupe clindamycine on assiste à un début de reconstitution de l'abondance en *Muribaculaceae* à J4 (moyenne à 10,7 %), mais il est variable selon les individus (de 0,5 % à 30,1 %). À J7 l'abondance en *Muribaculaceae* est similaire à celle des souris contrôle (moyenne à 20,2 %). Pour le groupe EPC+clindamycine, la restauration de l'abondance des *Muribaculaceae* est très faible, avec une abondance moyenne de 0,8 % à J4 et de 1,6 % à J7.

Ainsi, il semblerait que la reconstitution des *Muribaculaceae* soit inhibée par les modifications du microbiote associées à la colonisation par EPC. Cette inhibition pourrait être due soit à la souche de *K. pneumoniae*, soit à un autre taxon variant du fait de la colonisation par EPC. Elle pourrait avoir lieu par effet direct (sécrétion de bactériocine) ou indirect (modification des nutriments disponibles, du pH ou de l'osmolalité). La souche de *Muribaculum intestinale* DSMZ 28989 n'est pas capable de se répliquer lorsque l'osmolalité est élevée, contrairement aux souches de *Bacteroides*, d'*Enterococcus* ou de *Lachnospiraceae* (254).

Au niveau de la qPCR *Bacteroidaceae*, il n'y avait pas de différence entre les groupes clindamycine et EPC+clindamycine au cours du temps. D'après les résultats de séquençage nouvelle génération, on aurait pu s'attendre à ce que l'abondance en *Bacteroidaceae* soit plus élevée dans le groupe EPC+clindamycine que dans le groupe clindamycine. L'analyse *in silico* de la séquence des amorces *Bacteroidaceae* utilisées confirme pourtant leur spécificité vis-à-vis de *Bacteroidaceae* (90 % des séquences de

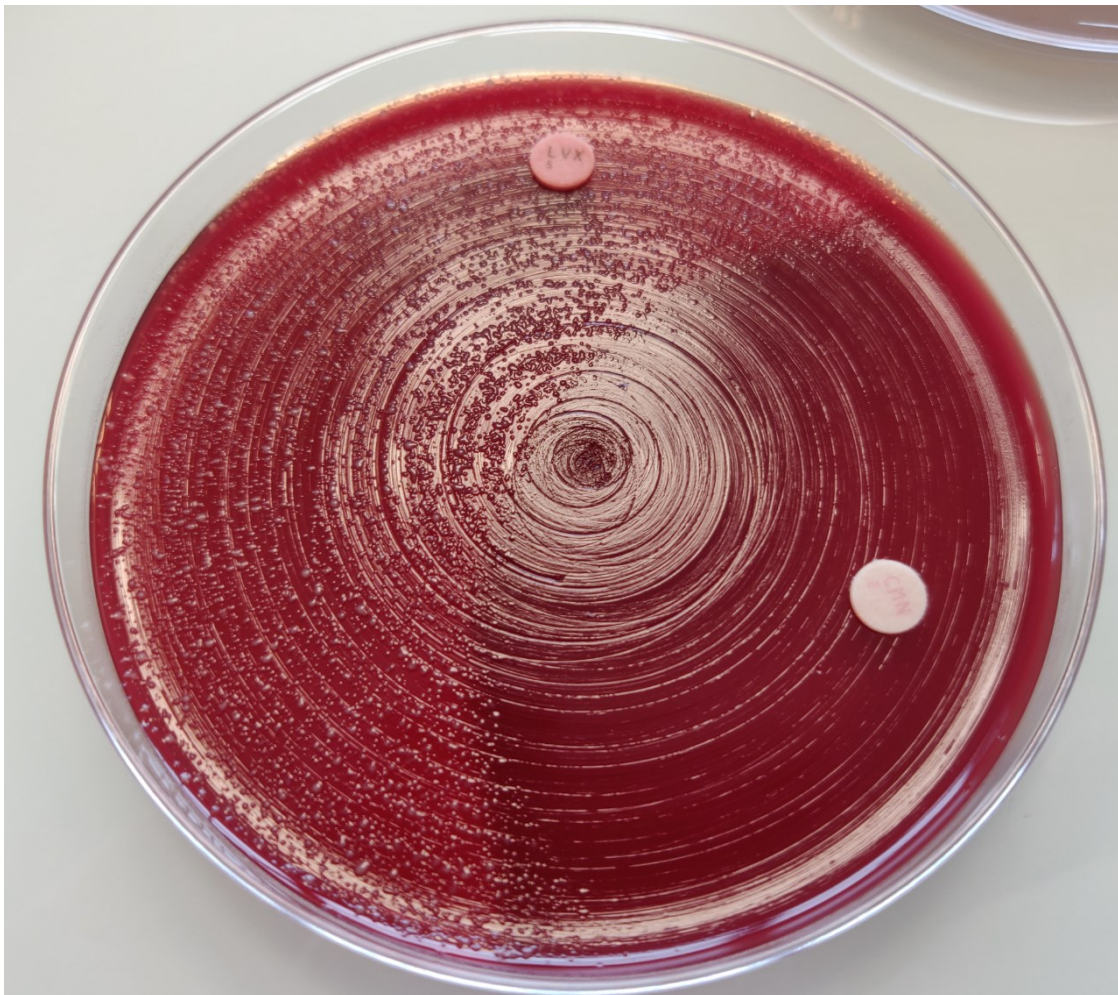
*Bacteroidaceae* présentes dans SILVA devraient en théorie être correctement amplifiées). De plus, l'ADN de bactéries appartenant aux *Tannerellaceae* ne devrait pas être amplifié (99,9 % des souches de *Tannerellaceae* dans SILVA présentent au moins 2 mésappariements, ou au moins un mésappariement dans les 5 dernières bases).

Les souris ayant servi à l'étude métagénomique et celles utilisées pour la qPCR ayant été commandées à un an d'intervalle, il est probable que des modifications existent au niveau de leur microbiote digestif de base. Cette expérimentation confirme toutefois le caractère reproductible de la forte diminution des *Muribaculaceae*, uniquement dans le groupe EPC+clindamycine.



**Figure 88.** Abondance relative en *Muribaculaceae* et *Bacteroidaceae* au cours du temps évaluée par qPCR. n= 5 souris par groupe.

La souche type de *Muribaculum intestinale* DSM 28989, représentant la famille *Muribaculaceae*, est très sensible *in vitro* à l'action de la clindamycine (Figure 89). Cette souche est également multisensible aux  $\beta$ -lactamines, mais résistante aux fluoroquinolones. Elle apparaît sensible *in vitro* à l'action de la vancomycine et résistante à la colistine, bien qu'il s'agisse d'un bacille à Gram négatif. Elle partage cette dernière caractéristique avec les bactéries du genre *Porphyromonas* qui sont phylogénétiquement proches. Dans un modèle murin où l'effet d'une antibiothérapie par vancomycine, par colistine, ou par fluoroquinolone (enrofloxacin) a été étudié, une très forte diminution de la concentration en *Muribaculaceae* était observée dans le groupe vancomycine, mais pas dans les groupes ayant reçu de la colistine ou une fluoroquinolone (255).



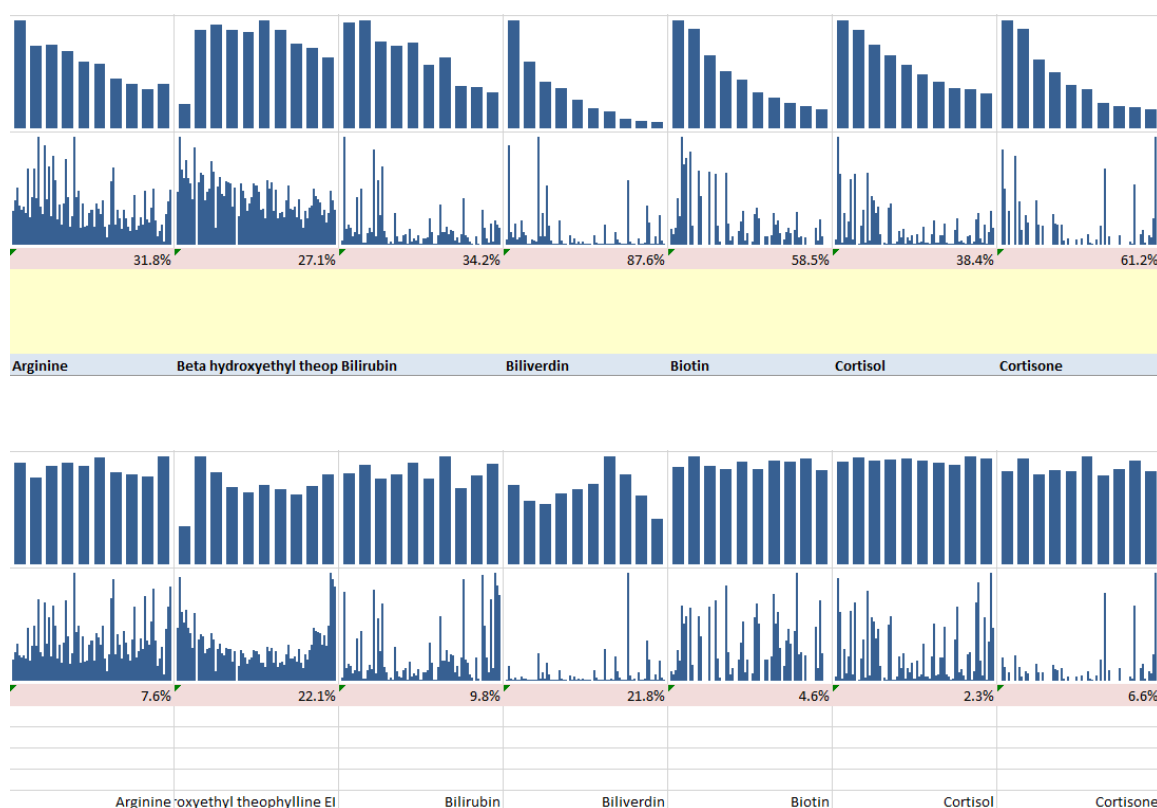
**Figure 89. Sensibilité de la souche de *Muribaculum intestinale* à la clindamycine.** Diamètre d'inhibition de la clindamycine > 70 mm. CMN=clindamycine, LVX = lévofloxacin.

### 4.3.6. Analyse métabolomique

Une analyse métabolomique ciblée a été réalisée. Cette méthode permet potentiellement la détection de 238 métabolites impliqués dans diverses voies métaboliques majeures.

#### Contrôles Qualité et Normalisation

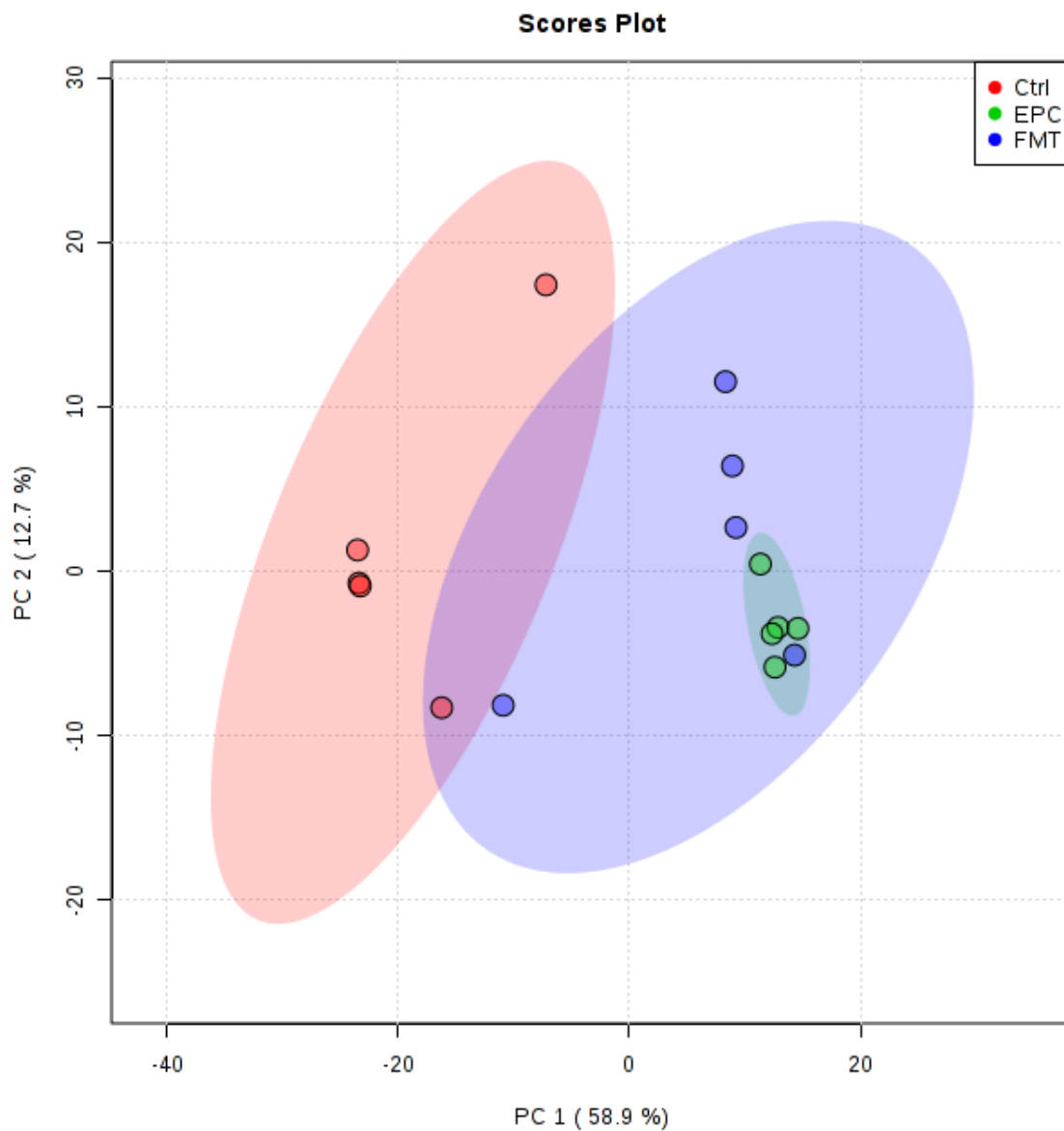
Il était indispensable de corriger la dérive d'intensité au cours du temps propre à chacun des métabolites dosés. Pour cela le même contrôle qualité (mélange de selles de souris contrôle) a été analysé à 12 reprises, tous les 8 échantillons. En effet la dérive d'intensité est fonction de la stabilité du métabolite dosé : elle est majeure pour la biliverdine, mais moins importante pour l'arginine (Figure 90). La normalisation par métabolite a été réalisée à l'aide de MetaboDrift v1.1 (206). Pour limiter les biais liés à cette dérive d'intensité, même si nous avons normalisé les données, les échantillons avaient été randomisés au niveau de leur ordre de passage sur l'automate.



**Figure 90. Drift d'intensité avant correction (en haut) et après correction (en bas).** 1ere ligne = QC au cours du temps, 2<sup>ème</sup> ligne = échantillons selon l'ordre de passage.

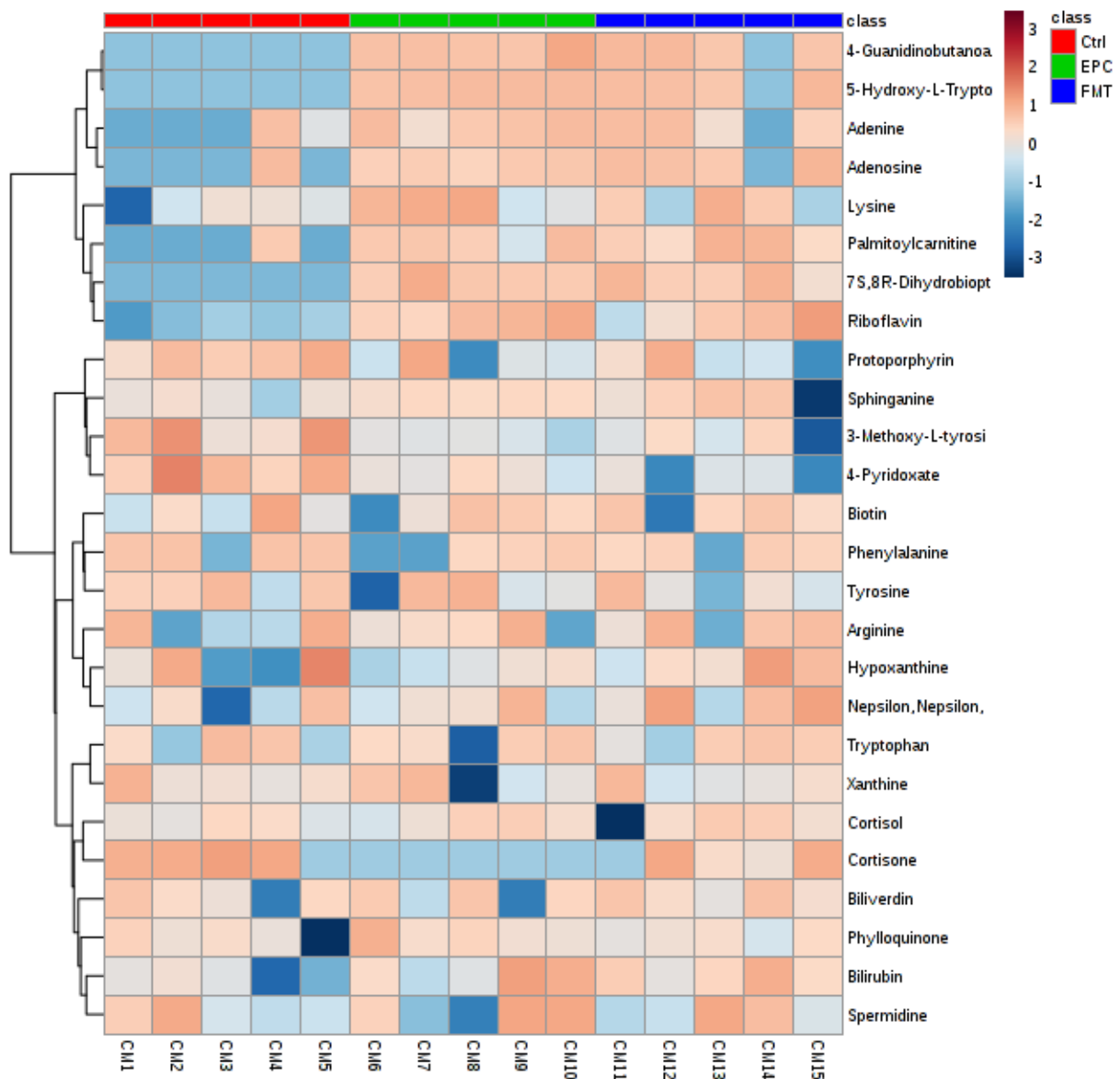
## Cæcum

D'après l'analyse par composantes principales, les groupes contrôle et colonisé par EPC sont distincts, et le groupe FMT se positionne de façon intermédiaire (Figure 91).



**Figure 91. Analyse métabolomique sur le contenu cæcal: analyse par composantes principales. n=5 souris par groupe.**





**Figure 92. Analyse métabolomique sur le contenu cæcal : Heatmap. n=5 souris par groupe.**

Une analyse statistique par méthode ANOVA a été réalisée pour rechercher des différences inter-groupes. Les métabolites significativement différents sont repris dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Analyse métabolomique sur le contenu cæcal : ANOVA.**

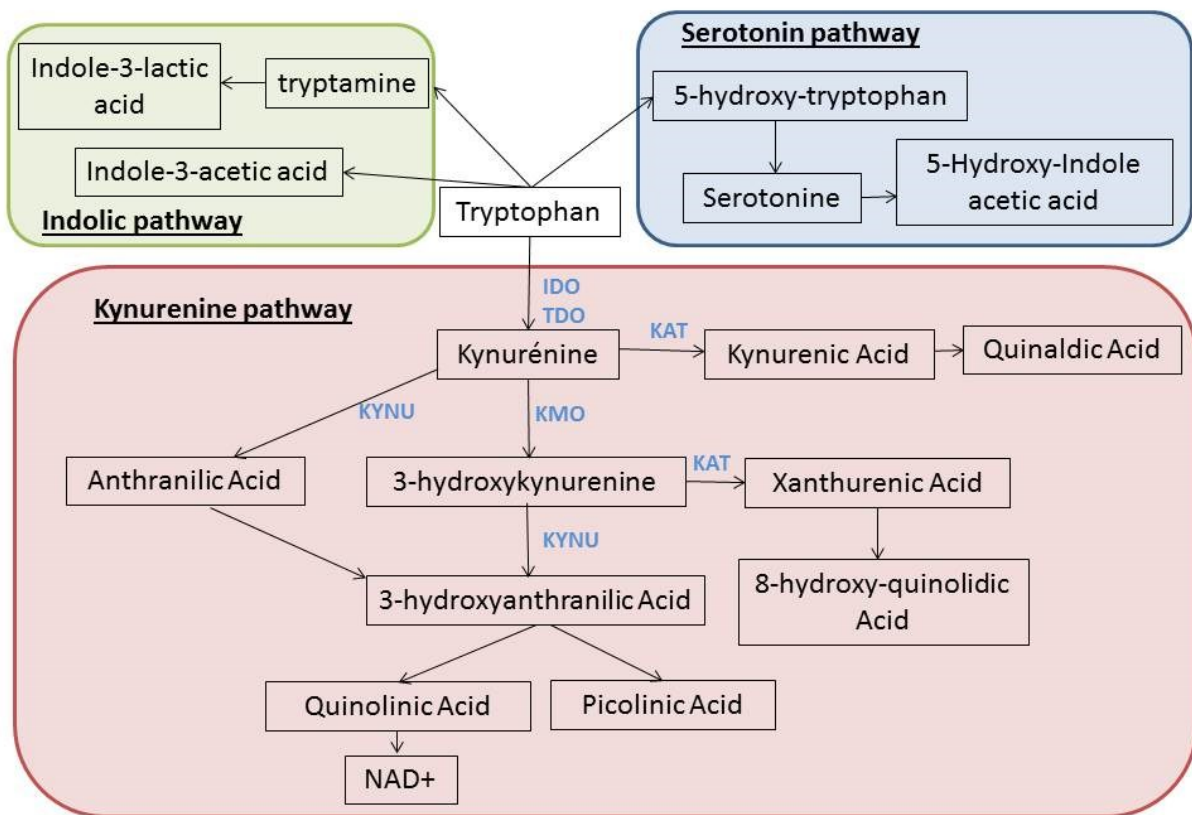
	p.value	Fisher's LSD
7S,8R-Dihydrobiopterin	1,98E-09	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
Riboflavin	6,18E-05	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
5-Hydroxy-L-Tryptophan	0,000124	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
4-Guanidinobutanoate	0,000124	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
Palmitoylcarnitine	0,001648	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
4-Pyridoxate	0,005331	Ctrl - FMT
Cortisone	0,008759	Ctrl - EPC; FMT - EPC

Le 4-Guanidinobutanoate est impliqué dans le métabolisme de l'arginine et de la proline, l'arginine ayant été décrite comme métabolite activateur des macrophages (256). En effet, l'arginine est un précurseur direct du NO. Le 4-Guanidinobutanoate est augmenté dans les groupes EPC et FMT.

La palmitoylcarnitine a été récemment identifiée lors de l'infection à *Salmonella Typhimurium* comme un métabolite possédant soit une action antibactérienne directe, ou comme un métabolite présentant une action immunomodulatrice. Dans un modèle de culture *ex vivo* de cellules isolées de ganglions lymphatiques mésentériques, la palmitoylcarnitine diminuait significativement le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, en induisant l'apoptose par les caspases 3 et 7 (257). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> tués pourraient faire partie des Treg, ce qui pourrait modifier la réponse immunitaire de l'hôte (257). La palmitoylcarnitine est augmentée dans les groupes EPC et FMT.

La cortisone fait partie des glucocorticoïdes, et possède un puissant effet anti-inflammatoire. Des modifications de la concentration digestive en glucocorticoïdes liées au microbiote digestif ont été décrites dans un modèle murin (258).

Le 5-Hydroxy-L-Tryptophan est un métabolite du tryptophane impliqué dans la voie de la sérotonine. La sérotonine présente des effets directs sur les macrophages et cellules dendritiques en augmentant la synthèse d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, et stimule les lymphocytes T (259). L'Hydroxy-L-Tryptophan est augmenté dans les groupes EPC et FMT. Par contre on ne met pas en évidence de différence au niveau du tryptophane, mais l'augmentation du 5-OH tryptophane peut laisser suggérer que des modifications au niveau de métabolites du tryptophane ont lieu. La sérotonine ainsi que les autres métabolites du tryptophane ne sont pas inclus dans l'analyse métabolomique réalisée, et ils seront dosés spécifiquement par une autre méthode (Figure 93) plus précise.



**Figure 93. Métabolites du tryptophane dosés au CHU de Lille.** Schéma réalisé par Benjamin Hennart et Marie Lenski du laboratoire de Toxicologie du CHU de Lille.

Le 5-Hydroxy-L-Tryptophane, le palmitoylcarnitine, ainsi que le 4-Guanidinobutanoate sont très corrélés (Figure 94).

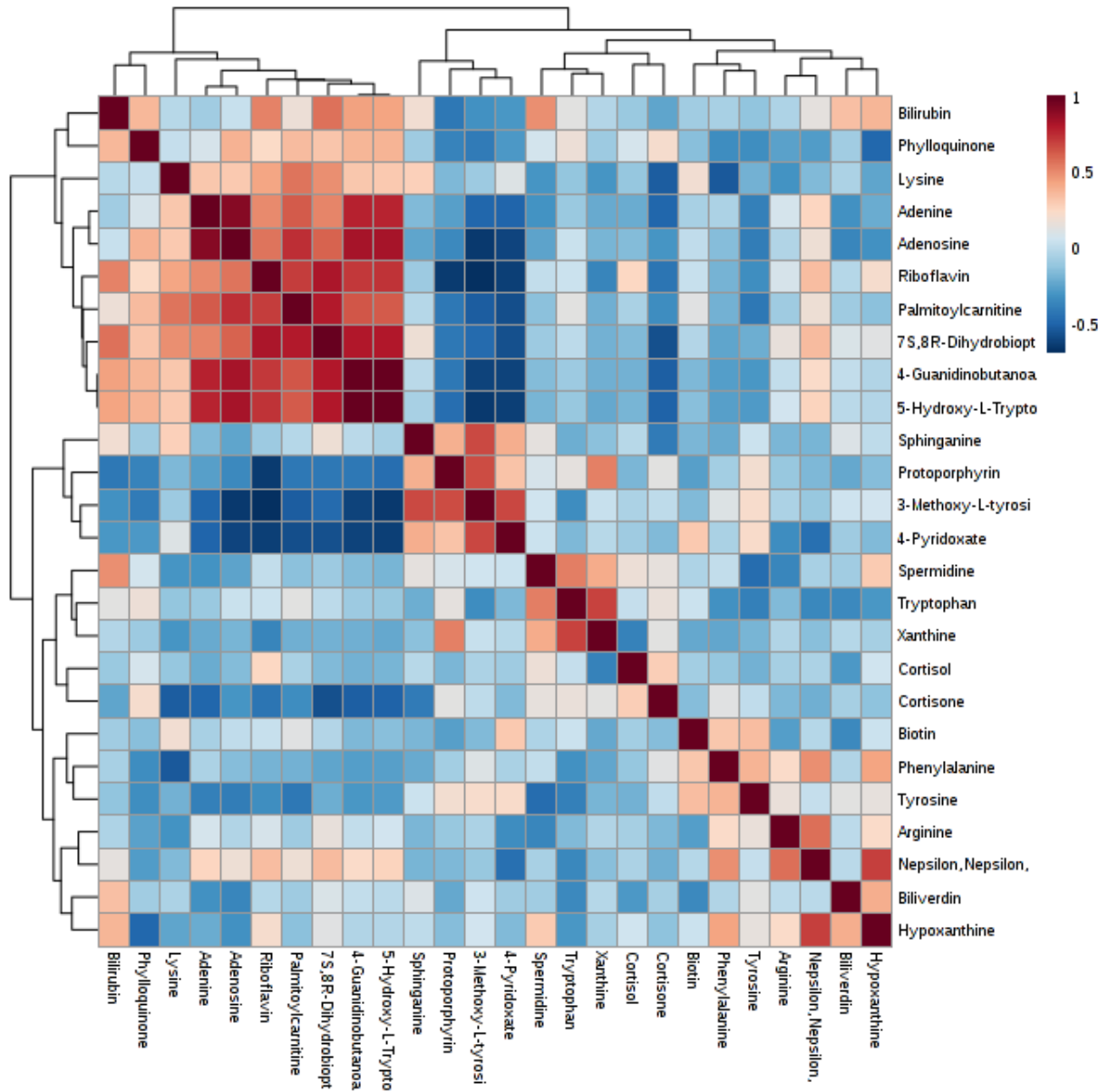


Figure 94. Corrélation des métabolites retrouvés au niveau du contenu cæcal.

## Colon et Iléon

Les résultats de l'analyse métabolomique dans le côlon et l'iléon ne sont pas présentés dans le détail pour ne pas alourdir le manuscrit.

Pour le côlon on retrouve des modifications au niveau d'un des métabolites du tryptophane (5-Hydroxy-L-Tryptophane), de la palmitoylcarnitine, du 4-Guanidinobutanoate, et de la cortisone comme au niveau du cæcum (Tableau 10).

**Tableau 10. Analyse métabolomique sur le contenu colique : ANOVA.**

	p.value	Fisher's LSD
5-Hydroxy-L-Tryptophane	1,18E-07	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
7S,8R-Dihydrobiopterine	9,39E-07	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
Cortisone	9,90E-05	Ctrl - EPC; FMT - EPC
Sphinganine	0,001311	Ctrl - EPC; Ctrl - FMT
Palmitoylcarnitine	0,001682	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl
4-Guanidinobutanoate	0,005201	EPC - Ctrl; FMT - Ctrl

Pour l'iléon on n'observe pas de différence entre les groupes par méthode ANOVA.

Ces premiers résultats de métabolomique devaient être confirmés par une autre technique permettant une quantification précise. De plus, certains métabolites d'intérêt n'étaient pas détectables par cette technique de métabolomique en cours de mise au point.

Nous avons d'abord choisi d'explorer la voie des métabolites du tryptophane. Il serait également souhaitable de doser précisément les principaux SCFA (propionate, acétate, butyrate), étant donné leur rôle pivot permettant l'interaction entre microbiote digestif et système immunitaire de l'hôte. La cortisone est également un candidat intéressant, étant donné son rôle anti-inflammatoire majeur.

### 4.3.7. Métabolites du tryptophane

Il n'existait pas ou peu de différences au niveau des concentrations de tryptophane ainsi qu'au niveau du rapport kynurénine/tryptophane, qui est un reflet de l'activité indolamine 2,3-dioxygénase (Figure 95). Le tryptophane étant apporté par l'alimentation, les souris colonisées par EPC auraient pu moins s'alimenter. En effet, elles souffrent de pneumopathie plus sévère et les prélèvements ont été réalisés 24 heures après infection. Cependant, les concentrations en tryptophane étaient similaires selon les groupes, ce qui nous permet d'écarter cette hypothèse. Nous avons ensuite étudié plus précisément les métabolites des voies de la sérotonine, des kynurénines et de l'indole.

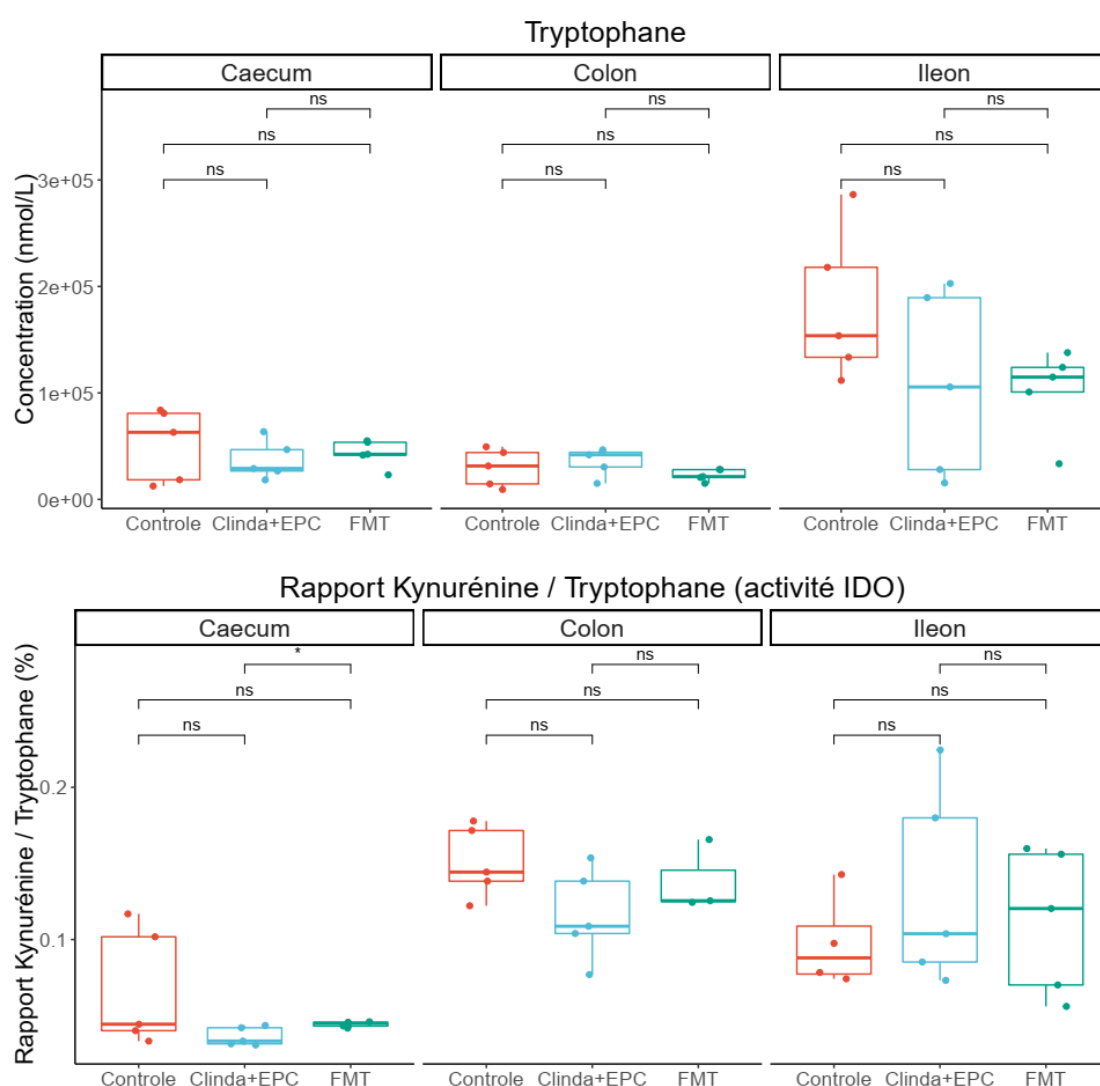


Figure 95. Dosage du tryptophane et calcul du rapport kynurénine sur tryptophane, reflet de l'activité indolamine 2,3-dioxygénase.

## Voie de la sérotonine

On observe une diminution de la sérotonine dans les 3 compartiments (cæcum, côlon et iléon) pour les souris colonisées par EPC, restaurée par la transplantation de microbiote fécal (Figure 96). Cette diminution de la sérotonine est associée à une augmentation modérée du 5-OH Tryptophane (précurseur de la sérotonine) et du 5-OH-indole acide acétique (métabolite de la sérotonine) mais qui n'est pas retrouvée dans les 3 compartiments.

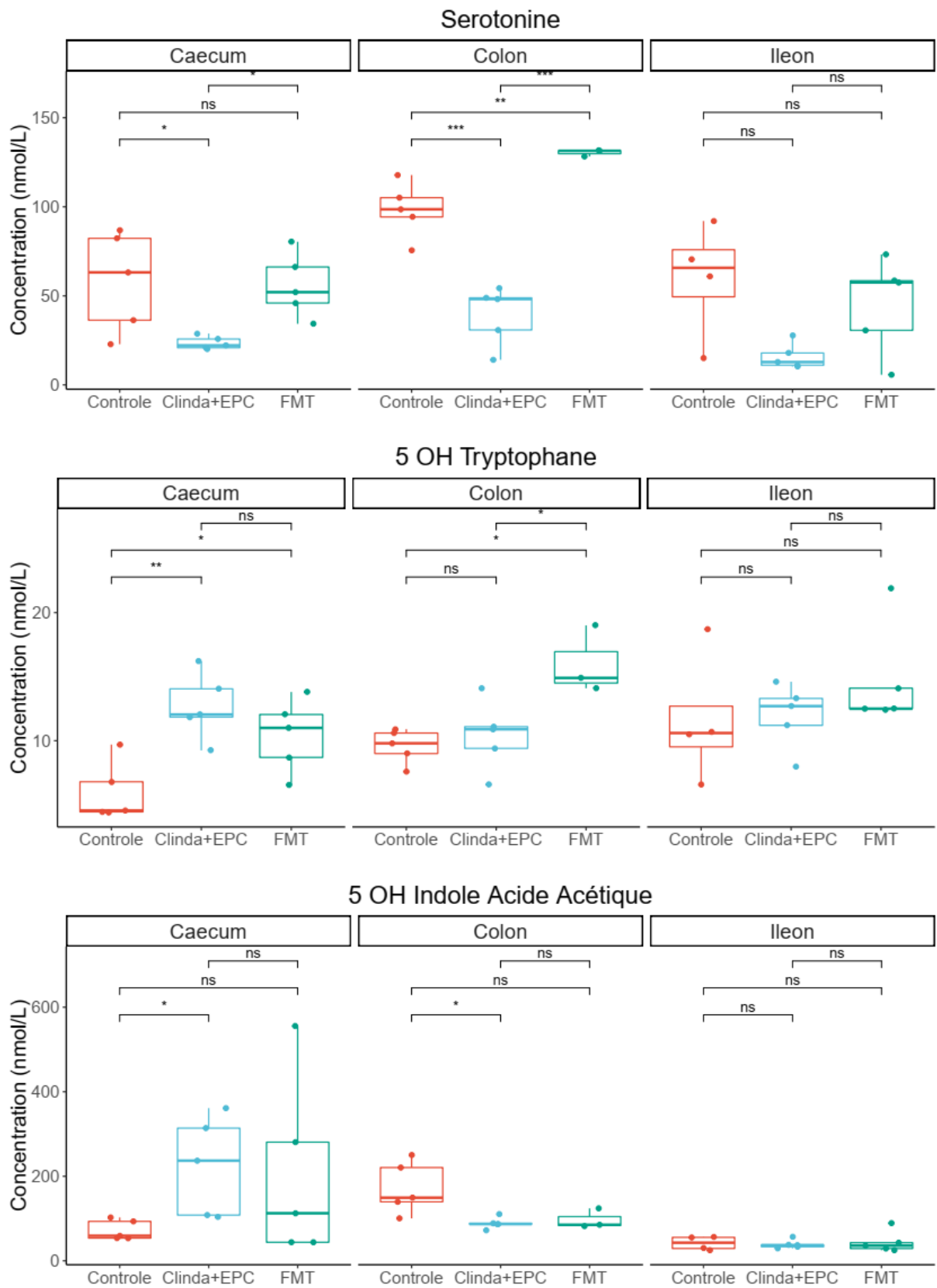
Au niveau digestif, la sérotonine augmente la motilité ainsi que la sécrétion de bicarbonate (260). Une diminution de la concentration luminale en sérotonine dans le groupe EPC pourrait peut-être favoriser la persistance de la colonisation dans le temps. Néanmoins cette hypothèse demanderait à être vérifiée par des expériences complémentaires.

La sérotonine pourrait avoir un effet immunomodulateur à distance. Il serait nécessaire de mesurer la concentration en sérotonine dans le sang et les poumons pour s'en assurer. La plupart de la sérotonine dans le corps est transportée par les granules denses des plaquettes. La sérotonine est relarguée lors de l'activation des plaquettes. Les plaquettes ne peuvent pas synthétiser leur propre sérotonine, elles récupèrent la sérotonine sanguine à travers leur transporteur SERT. La sérotonine sanguine provient en quasi-totalité des cellules entérochromaffines digestives. La sérotonine stimule les lymphocytes NK en augmentant leur production d'IFN- $\gamma$  (261), et agit également sur les cellules dendritiques en augmentant leur production d'IL-1 $\beta$  et en diminuant la production de TNF $\alpha$  (262). La sérotonine induit également un recrutement de cellules dendritiques et de polynucléaires neutrophiles (263). Elle protège les lymphocytes NK de l'apoptose engendrée par un stress oxydatif, en piégeant les formes actives de l'oxygène produites dans les tissus infectés (264). La diminution de la concentration en sérotonine pourrait en partie expliquer les résultats obtenus en cytométrie en flux (baisse des lymphocytes NK et des cellules dendritiques dans les poumons de souris colonisées par EPC et infectées par *P. aeruginosa*).

Les plaquettes semblent également jouer un rôle dans la réponse de l'hôte à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* (265). L'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* induit une thrombopénie périphérique d'ampleur modérée. Des facteurs d'activations plaquettaires tels que le platelet factor-4 et la  $\beta$ -thromboglobuline étaient détectés dans le LBA. Le rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire vis-à-vis d'autres infections bactériennes est également désormais reconnu (266). Des bactéries telles que *Staphylococcus aureus* étaient sensibles à l'action antibactérienne des plaquettes, tandis que *Streptococcus agalactiae* résistait grâce à sa capsule polysaccharidique (267). L'action antibactérienne des plaquettes était médiée par certains effecteurs, comme PF-4 ainsi que la défensine hBD-1.

Pour la suite du travail, il serait donc intéressant de doser la sérotonine au niveau sanguin et pulmonaire, ainsi que d'explorer les plaquettes (nombre et activation).





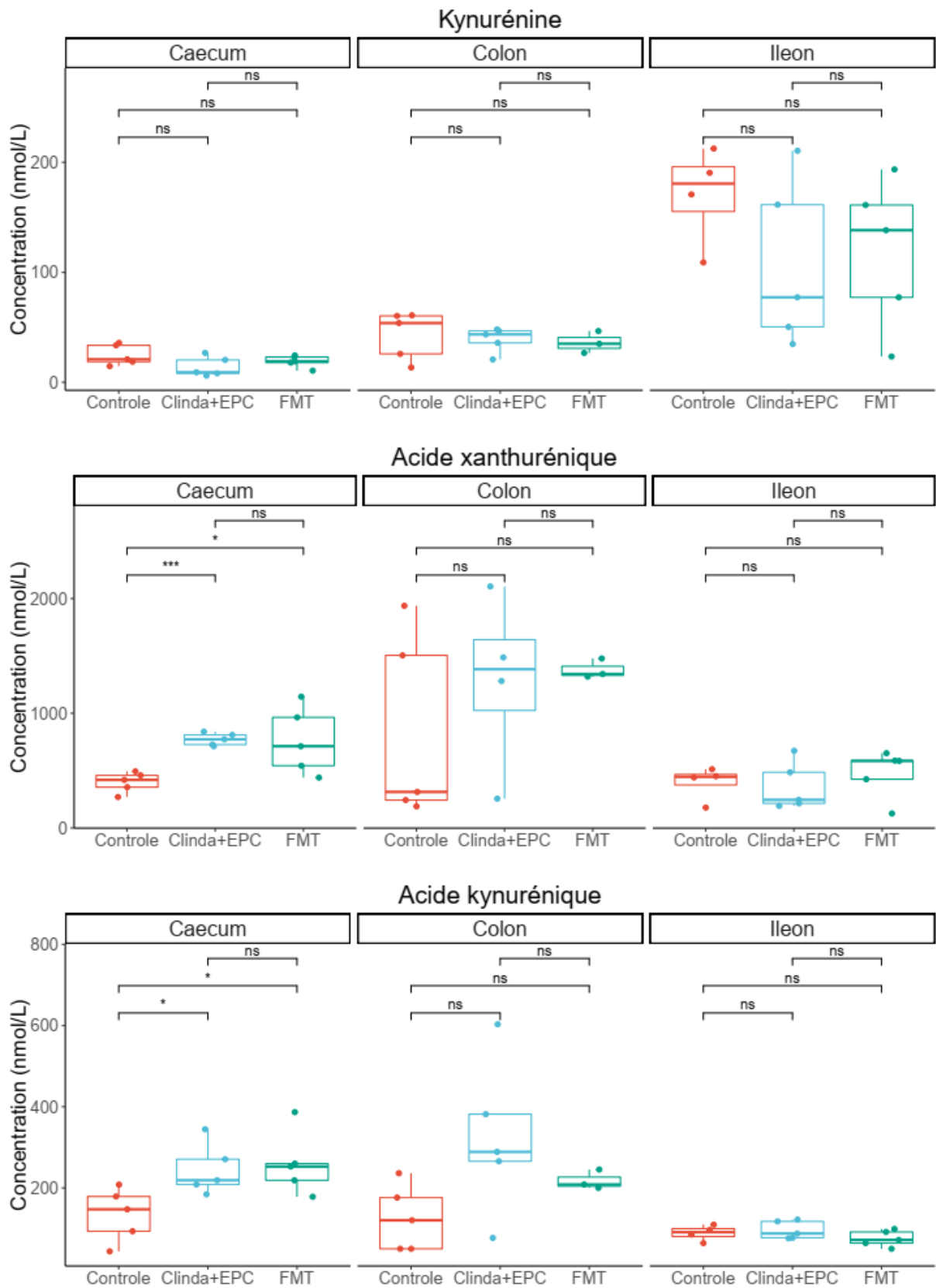
**Figure 96. Voie de la sérotonine.**

## Voie des kynurénines

On observait une augmentation de deux métabolites de la voie des kynurénines chez les souris colonisées par EPC, uniquement au niveau du cæcum. Il s'agissait de l'acide xanthurénique et de l'acide kynurénique. Cette augmentation ne semblait pas restaurée par la transplantation de microbiote fécal. Ces deux métabolites sont des ligands potentiels de AhR.

L'acide quinaldique, le 8-OH acide quinaldique, l'acide anthranilique ainsi que le 3-OH acide anthranilique étaient sous la limite de détection dans tous les échantillons.

L'acide xanthurénique et l'acide kynurénique sont des ligands de AhR. Après activation, AhR augmente la production d'IL-22 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (110). Les ligands d'AhR induisent la différenciation en Treg, luttant contre les réponses hyperinflammatoires délétères (268). Cependant, l'augmentation de l'acide xanthurénique et de l'acide kynurénique est retrouvée au niveau cæcal à la fois dans le groupe EPC et dans le groupe FMT. Au niveau colique on observe la même tendance, qui n'est pas significative car le groupe contrôle est plus variable. L'augmentation de ces métabolites observée dans le groupe EPC ne permet probablement pas d'expliquer le pronostic défavorable, car elle est également retrouvée dans le groupe FMT. Cette augmentation pourrait être due à des modifications du microbiote digestif communes aux groupes EPC et FMT. Une augmentation du xanthurénate a déjà été décrite une semaine après administration de clindamycine dans un modèle murin (167).



**Figure 97. Voie des kynurénines.**

## Voie de l'indole

L'indole acide lactique était augmenté dans le groupe colonisé par EPC, et encore plus augmenté dans le groupe qui a reçu une transplantation de microbiote fécal (Figure 98). Les mêmes résultats étaient retrouvés à la fois dans le cæcum et dans le côlon, mais pas dans l'iléon.

La tryptamine était sous la limite de détection dans tous les échantillons.

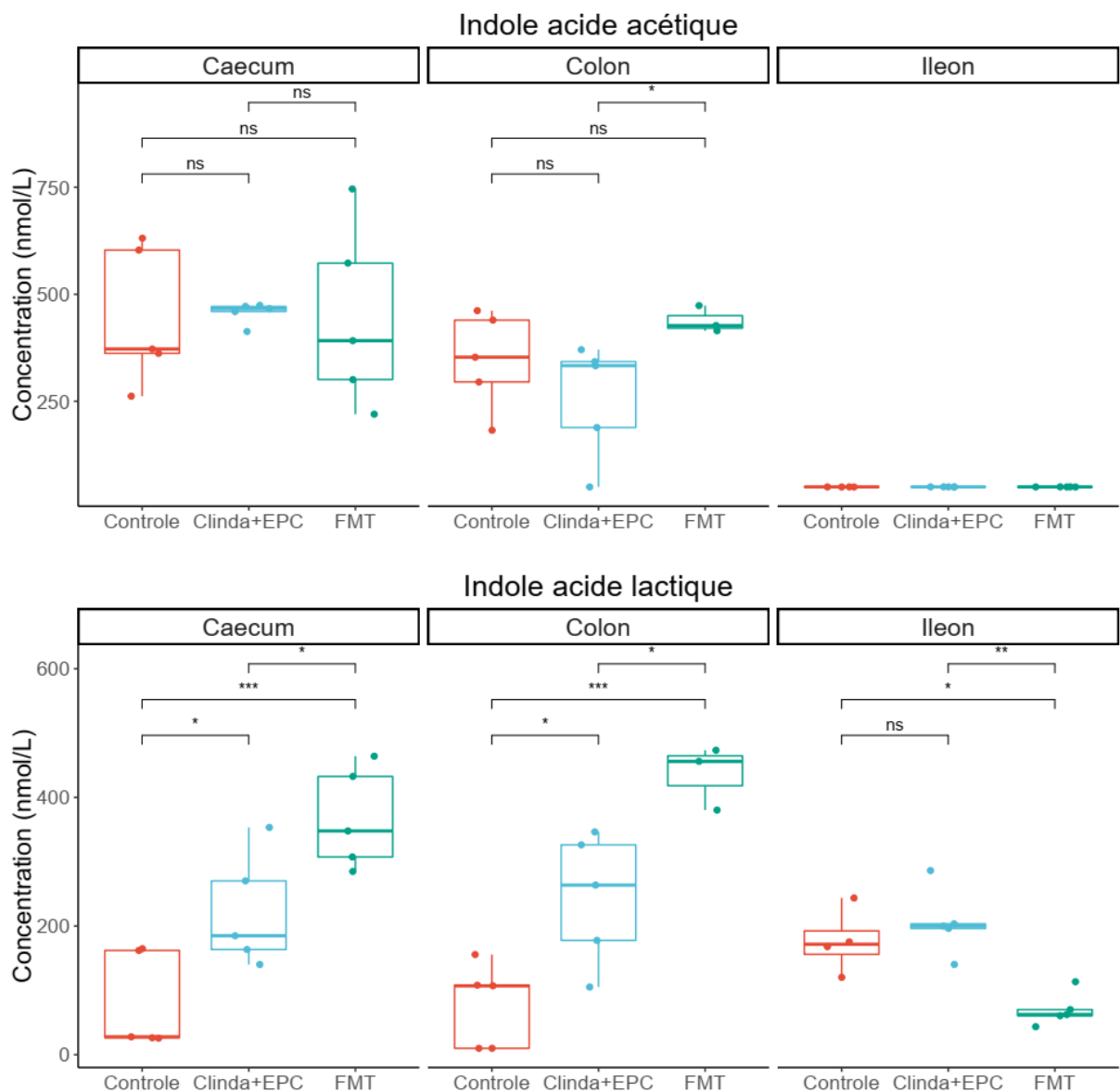


Figure 98. Voie de l'indole.

### **4.3.8. Inférence fonctionnelle à partir de métagénomique ciblée**

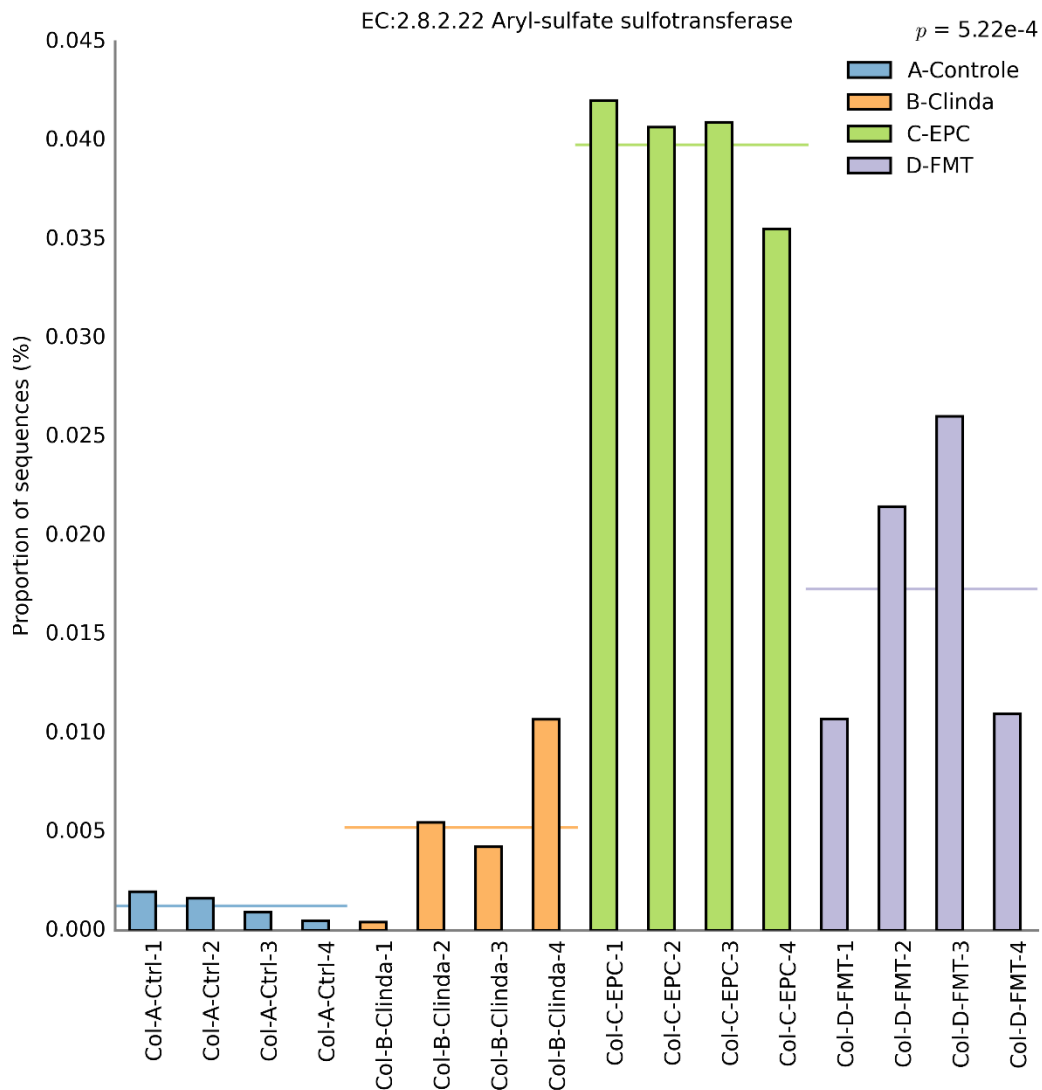
Des algorithmes permettant de réaliser une inférence fonctionnelle à partir de données de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S ont été décrits (269). À partir des données de métagénomique obtenues précédemment, il est possible de prédire le génome des bactéries composant le microbiote, et donc de prédire les fonctions métaboliques de ces bactéries. En effet, phylogénie et fonction sont liées (269). PICRUSt2 est l'algorithme le plus récent permettant de réaliser cette inférence (210). PICRUSt2 utilise des données métagénomiques pas encore classées par rapport à SILVA, et les compare à sa propre base de données, constituée de plus de 40 000 génomes bactériens. Contrairement à Qiime 2, PICRUSt2 ne classe pas les séquences, elles sont simplement insérées dans un arbre phylogénétique préexistant pour prédire des voies métaboliques.

Une analyse statistique a été réalisée par ANOVA suivie d'un test post hoc de Tukey, et une correction de Bonferroni a été appliquée pour tenir compte des comparaisons multiples. Treize fonctions métaboliques ont une valeur de  $p$  inférieure à 0,01 (Tableau 11). Les numéros EC correspondent à la classification de l'Enzyme Commission (270).

**Tableau 11. Fonctions métaboliques variant significativement entre les groupes (inférence à partir des données métagénomiques du côlon).**

Fonction métabolique	p-value
EC:6.1.1.23 Aspartate--tRNA(Asn) ligase	4,66E-04
EC:2.8.2.22 Aryl-sulfate sulfotransferase	5,22E-04
EC:1.1.1.130 3-dehydro-L-gulonate 2-dehydrogenase	8,02E-04
EC:2.7.1.51 L-fuculokinase	1,19E-03
EC:2.3.1.241 Kdo(2)-lipid IV(A) lauroyltransferase	2,10E-03
EC:2.4.1.247 Beta-D-galactosyl-(1->4)-L-rhamnose phosphorylase	3,58E-03
EC:3.2.1.180 Unsaturated chondroitin disaccharide hydrolase	3,84E-03
EC:3.2.1.82 Exo-poly-alpha-galacturonosidase	4,45E-03
EC:4.2.2.1 Hyaluronate lyase	4,64E-03
EC:3.5.1.81 N-acyl-D-amino-acid deacylase	6,18E-03
EC:6.3.2.29 Cyanophycin synthase (L-aspartate-adding)	8,32E-03
EC:6.3.2.30 Cyanophycin synthase (L-arginine-adding)	8,32E-03
EC:2.7.7.38 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	8,71E-03

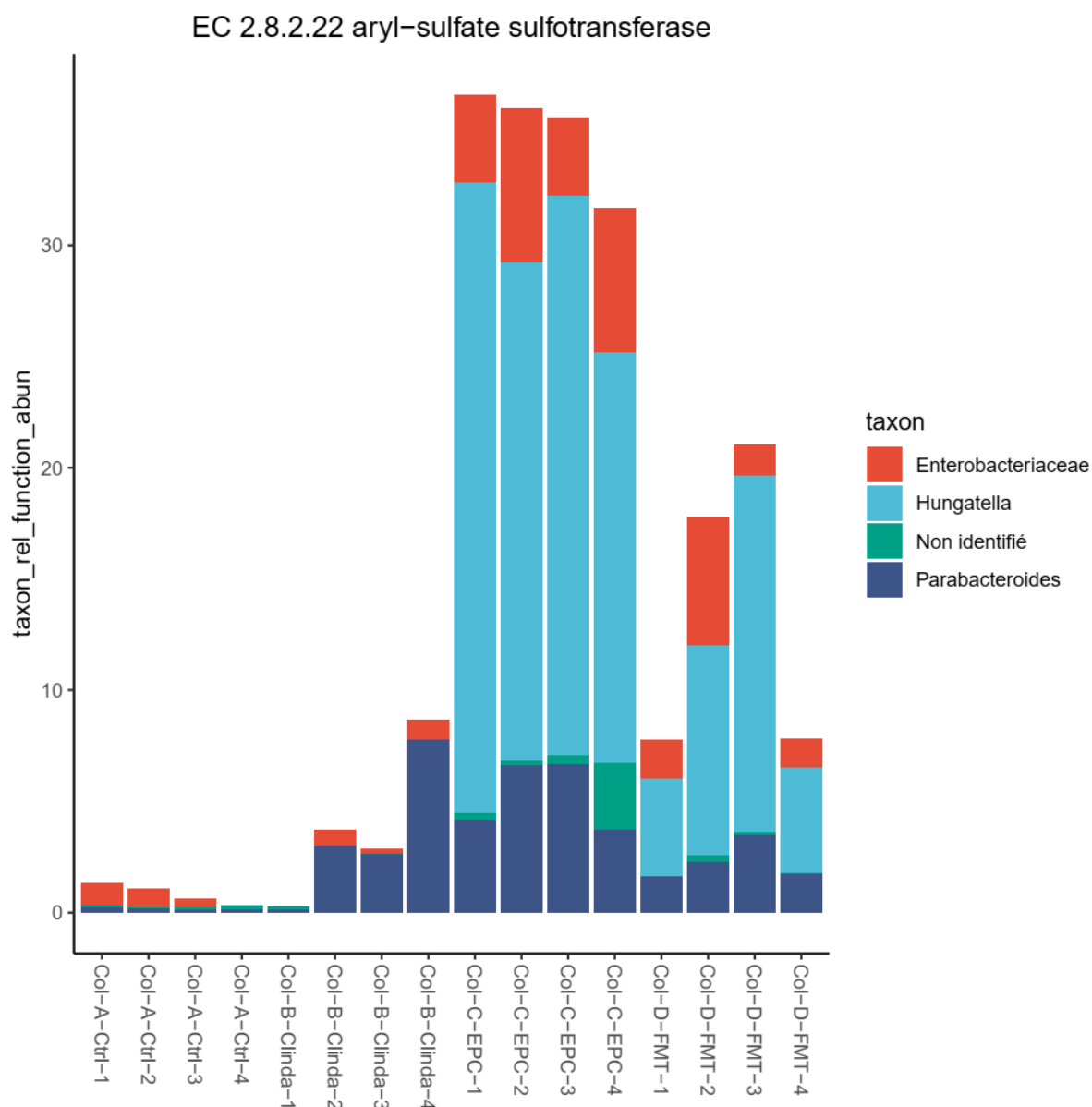
La fonction EC:2.8.2.22 Aryl-sulfate sulfotransférase paraissait intéressante, car les sulfotransférases sont impliquées dans le métabolisme de la sérotonine par transformation en 5-HT-sulfate (271). Les dérivés sulfatés sont généralement inactivés et plus rapidement éliminés du fait de leur caractère hydrophile (271). La présence de 5-HT-sulfate en quantité importante dans des prélèvements intestinaux a été rapportée dans un modèle expérimental de syndrome sérotoninergique chez le rat (272).



**Figure 99. Prédiction de l'abondance relative de la fonction Aryl-sulfate sulfotransférase par échantillon.**

Pour déterminer par quels taxons bactériens est portée la prédiction de la fonction Aryl-sulfate sulfotransférase, une analyse détaillée de la contribution de chaque ASV par échantillon a été réalisée.

À partir d'un tableau de 3 713 588 lignes généré sous PICRUST2, la fonction EC:2.8.2.22 a été extraite et chaque ASV a été matché sous R à la table taxonomique préalablement construite avec Qiime2 et SILVA dans le chapitre 4.3.5. Par exemple, l'ASV « 06971ddd803e9611cce61d1236df766a » correspondait à *Hungatella*. Un faible nombre d'ASV n'ont pas pu être identifiés.



**Figure 100. Abondance relative de chaque ASV (normalisée par le nombre de copies d'ADNr 16S) multiplié par la prédiction du nombre de copies de gènes correspondant à une fonction aryl-sulfate sulfotransférase.**

L'augmentation de la fonction Aryl-sulfate sulfotransférase dans le groupe EPC, et dans une moindre mesure dans le groupe FMT, semble portée en grande partie par le genre *Hungatella*. En effet, 10 protéines du génome de *H. hathewayi* DSM 13479 auraient une activité sulfotransférase, d'après la base de données de PICRUSt2. C'est également vérifié sur l'annotation automatique de la souche type de *H. hathewayi* (d'après la requête « [[Clostridium] hathewayi DSM 13479] » + « sulfotransferase » sur NCBI Protein). Certaines entérobactéries possèdent 1 à 3 copies de gènes codant pour des



sulfotransférases. La souche de *K. pneumoniae* KPL0.2 utilisée pour la colonisation n'en possède pas d'après l'annotation automatique de son génome (213). Certains *Parabacteroides* possèdent une seule copie d'un gène codant pour des sulfotransférases.

L'analyse réalisée par PICRUSt2 est normalisée par rapport au nombre de copies d'ADNr 16S et par rapport au nombre de copies de chaque fonction métabolique présentes sur le génome prédit. Le nombre de copies d'ADNr 16S est variable selon l'espèce bactérienne, compris entre 1 et 15 (273). L'abondance retrouvée par analyse métagénomique de chaque ASV, est donc divisée par le nombre de copies d'ADNr 16S pour chaque espèce. Par exemple, le nombre de copies d'ADNr 16S estimé pour les ASV correspondant à *Hungatella* était de 1, contre 6 pour certains ASV correspondant à *Parabacteroides*. Au total, pour obtenir les résultats de la Figure 100, l'abondance de chaque ASV sera divisée par le nombre de copies estimé d'ADNr 16S, et multipliée par le nombre de copies estimées des gènes correspondant à chaque fonction métabolique.

En analysant des données de métagénomique iléale la fonction Aryl-sulfate sulfotransférase est prédite comme étant plus abondante dans le groupe colonisé par EPC, mais la différence n'était pas significative.

Ces résultats d'inférence fonctionnelle à partir de données de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S suggèrent que la diminution de la concentration en sérotonine observée au niveau digestif dans le groupe EPC pourrait être liée à l'augmentation de l'abondance relative du genre *Hungatella*, par métabolisation en 5-HT-sulfate. En effet, sur les 2095 fonctions métaboliques étudiées sans *a priori*, la fonction aryl-sulfate sulfotransférase était une des plus significativement associées au groupe colonisé par EPC. Cette hypothèse demande toutefois à être vérifiée, du fait du caractère inférentiel de l'analyse réalisée. Elle pourrait être vérifiée par métagénomique fonctionnelle (séquençage direct de l'ADN dans un échantillon, non ciblé sur l'ADNr 16S), ou par dosage direct de la 5-HT-sulfate.

## 5. Discussion et perspectives

Nous avons montré l'existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC évaluée à une semaine avant ou après une injection de clindamycine. La colonisation par EPC était associée à une moindre résilience du microbiote : l'alpha-diversité était diminuée dans le groupe colonisé par EPC, par rapport au groupe ayant juste reçu de la clindamycine. Cet état de dysbiose, toujours présent 7 jours après la dernière administration d'antibiotique, était caractérisé par une quasi-extinction de la famille *Muribaculaceae* accompagnée d'une expansion des genres *Hungatella* et *Lachnoclostridium*. La dysbiose digestive induite par la colonisation par EPC aggravait la sévérité de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, ce qui était en partie restauré par la transplantation de microbiote fécal. L'aggravation de la pneumopathie pourrait faire intervenir les cellules dendritiques, les macrophages alvéolaires, et les lymphocytes T NK et CD4 au niveau pulmonaire. Une diminution de la sérotonine a été mise en évidence au niveau digestif, dont le rôle précis reste à déterminer.

### Fenêtre de susceptibilité à la colonisation encadrant une administration de clindamycine

L'existence d'une fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC encadrant la prise d'un antibiotique souligne l'importance de lutter contre toute prescription d'antibiotique non justifiée. C'est probablement d'autant plus vrai pour les antibiotiques présentant une forte activité anti-anaérobie et excrétés par voie biliaire, tels que la clindamycine.

La clindamycine est principalement prescrite en cas d'allergie à la pénicilline, notamment dans le cadre d'antibioprophylaxie. En effet, la clindamycine, seule ou associée à la gentamicine ou à la vancomycine, est recommandée par la société française d'anesthésie et de réanimation à la place de la céfazoline en cas d'allergie à la pénicilline (274). Cependant en pratique, 90 % des patients se disant allergiques à la pénicilline ne le sont pas en réalité et pourraient recevoir de la céfazoline (275). Très peu d'allergies croisées entre les pénicillines et la céfazoline sont retrouvées, car la céfazoline ne possède pas la chaîne latérale R1 responsable de 90 % des réactions allergiques IgE-médiées (276). L'antibioprophylaxie par clindamycine consiste en une seule injection de 900 mg

en IV lente, avec éventuellement une réinjection de 600 mg si la durée de l'intervention est supérieure à 6 heures. Ce schéma thérapeutique est très similaire à celui utilisé dans le modèle murin de colonisation par EPC que nous avons mis au point. En effet, nous avons montré qu'une seule injection de clindamycine (10 mg/kg) suffisait à créer une fenêtre de susceptibilité à la colonisation par EPC évaluée à au moins 7 jours, et que lorsque cette colonisation était installée, elle persistait plus de 3 mois.

En parallèle de ce travail de thèse, nous avons participé à une action éducative pour essayer d'optimiser la prescription d'antibiotiques chez les femmes enceintes qui se déclaraient allergiques à la pénicilline, mais dont les symptômes rapportés à l'interrogatoire autoriseraient la prescription de céfazoline. Si les patientes se déclarant allergiques à la pénicilline n'ont pas présenté de symptômes laissant suspecter une allergie sévère (choc anaphylactique, œdème de Quincke, atteinte respiratoire...), il est recommandé de leur prescrire de la céfazoline au lieu de la clindamycine ou de la vancomycine (277). Cependant, ces recommandations émanant des Centers for Disease Control sont peu appliquées, car en pratique clinique seulement 14 % des antibiothérapies étaient adaptées au niveau de risque allergique dans une étude publiée en 2009 (278). En particulier, la plupart des patientes à bas risque d'anaphylaxie recevaient de façon erronée de la clindamycine. Nous avons donc mené une action éducative sur une période de 6 mois, ciblant tous les prescripteurs potentiels, en collaboration avec des gynécologues, anesthésistes, infectiologues, hygiénistes et allergologues du CHU de Lille. Le taux de prescriptions d'antibiotiques conformes chez les patientes se disant allergiques à la pénicilline a été amélioré suite à cette action, avec 17 % d'antibiothérapies conformes avant intervention contre 67 % après ( $p < 0,001$ ). La prescription de clindamycine chez les femmes enceintes se disant allergiques à la pénicilline était diminuée dans le groupe à bas risque d'anaphylaxie. Ce travail a récemment été publié dans un journal d'anesthésie obstétrique (234).

Nous souhaitons dans un second temps généraliser dans tous les secteurs d'anesthésie l'application d'algorithmes de prescription en fonction des symptômes d'allergie à la pénicilline rapportés par les patients (279). Cela permettrait de limiter la prescription de clindamycine, qui présente un impact à long terme sur le microbiote et qui présente une efficacité moindre sur la prévention des infections postopératoires (280). Pour cela,

l'utilisation du système informatique de l'hôpital en complément d'interventions éducatives représente une piste intéressante (281).

L'impact d'autres antibiotiques possédant une forte activité anti-anaérobie comme l'amoxicilline-clavulanate ou la pipéracilline-Tazobactam n'a pas été évalué dans notre modèle. Pourtant, ces antibiotiques sont également décrits pour altérer fortement le microbiote digestif et permettre une colonisation prolongée par des bactéries multirésistantes (174). Nous souhaitons évaluer dans notre modèle murin l'impact d'autres antibiotiques sur le microbiote digestif, et de déterminer la fenêtre de susceptibilité à la colonisation associée. Les antibiotiques les plus prescrits en France au moment de l'enquête nationale de prévalence de juin 2017 étaient par ordre décroissant les céphalosporines injectables, l'amoxicilline-clavulanate, les fluoroquinolones, l'amoxicilline, les imidazolés, la pipéracilline-Tazobactam (282). Ces antibiotiques fréquemment prescrits présentent des spectres d'action différents, notamment au niveau de leur activité anti-anaérobie, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre le processus de résistance à la colonisation et son altération par des antibiotiques. De plus, cela pourrait permettre d'identifier des antibiotiques plus à risque que d'autres au niveau de leur impact sur la résistance à la colonisation. Il est par contre plus délicat d'agir sur la prescription de ces antibiotiques, fréquemment utilisés dans le cadre d'antibiothérapie probabiliste. Des composés dérivés du charbon actif, tels que le DAV132, permettent de se lier aux antibiotiques présents au niveau digestif et diminueraient l'impact des antibiotiques sur la composition du microbiote sans modifier les taux sériques (283).

Dans notre modèle, la fenêtre de susceptibilité encadrant la prise de clindamycine était présente aussi bien avant qu'après l'exposition par EPC. Il s'agit d'un paramètre important, qui est rarement pris en compte dans les études cherchant à identifier des facteurs de risque de colonisation par EPC. En effet, habituellement seule l'administration d'antibiotique précédant l'exposition à une EPC, ou concomitante à la période d'exposition est recherchée. Il est en fait probable qu'une administration d'antibiotique suivant l'exposition à une EPC constitue également un facteur de risque de colonisation, en altérant la résistance à la colonisation médiée par le microbiote digestif normal. Auquel cas, il pourrait être important de limiter les prescriptions d'antibiotiques non nécessaires chez les patients étiquetés comme « contact » d'un patient porteur d'EPC.

## Dysbiose associée à la colonisation par EPC

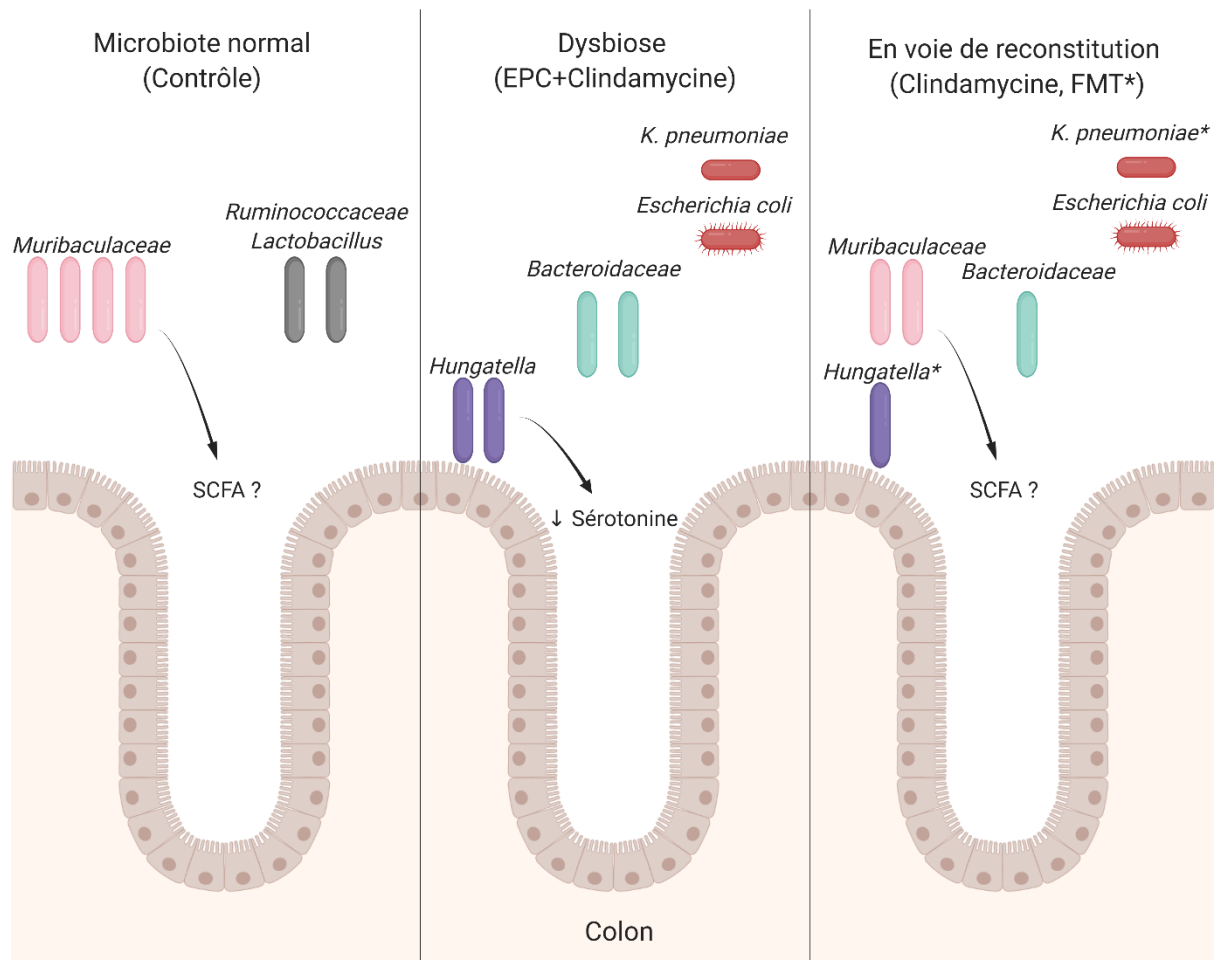
Sept jours après injection de clindamycine, le microbiote digestif était en cours de reconstitution. Une alpha-diversité intermédiaire était observée pour le groupe clindamycine, comprise entre celle du groupe contrôle et celle du groupe colonisé par EPC. Cependant, cette reconstitution était variable selon les individus avec un groupe clindamycine très hétérogène. De plus, la reconstitution n'était pas tout à fait complète à 7 jours, car les souris exposées à l'EPC 7 jours après administration de clindamycine devenaient durablement colonisées, contrairement aux souris exposées 14 jours après.

Les différences au niveau du microbiote digestif entre le groupe clindamycine et le groupe colonisé par EPC étaient marquées par la quasi-extinction des *Muribaculaceae* dans le groupe EPC, alors que dans le groupe clindamycine l'abondance tendait à se rapprocher des contrôles. La reconstitution en *Muribaculaceae* dans le groupe clindamycine a été vérifiée après mise au point d'une PCR spécifique pour évaluer leur abondance relative de façon dynamique le temps. Dès le quatrième jour après administration de clindamycine, une reconstitution partielle débutait, puis une abondance en *Muribaculaceae* se rapprochant des contrôles était atteinte au septième jour. Par contre, la colonisation par EPC inhibait ce retour vers l'état initial après administration de clindamycine en s'opposant à la résilience du microbiote. L'autre différence majeure est l'abondance des genres *Hungatella* et *Lachnoclostridium* (appartenant aux *Lachnospiraceae*) qui était plus élevée dans le groupe EPC.

La famille *Muribaculaceae* avait déjà été identifiée par Pamer comme associée à la résistance à colonisation par *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (2). Dans le modèle que nous avons mis au point, la famille *Muribaculaceae* semble également jouer un rôle important, au moins comme marqueur de la dysbiose transitoire engendrée par une injection de clindamycine (en cas de diminution de l'abondance en *Muribaculaceae*). Cependant, une fois que la colonisation par EPC est installée, une restauration partielle de l'abondance en *Muribaculaceae* par FMT ne permettait pas dans un délai court de décoloniser les souris. Il semblerait qu'une fois que la colonisation par *K. pneumoniae* NDM-1 ait débuté, il soit difficile d'éliminer cette bactérie s'étant installée dans la niche écologique libérée par l'administration de clindamycine.

Récemment Ng et coll. se sont intéressés à la reconstitution du microbiote digestif suite à 4 jours d'antibiothérapie par ciprofloxacine dans un modèle murin (284). Une quasi-extinction des *Muribaculaceae* (S24-7) était observée sous antibiothérapie, suivie d'une reconstitution progressive observée 2 à 7 jours après l'arrêt de l'antibiothérapie. La reconstitution était variable selon les cages de souris (« effet cage »). L'explication avancée par les auteurs était que dans leur modèle chaque souris présentait chaque jour une probabilité faible de se recoloniser par *Muribaculaceae*. Lorsqu'un individu s'était recolonisé, alors le reste de la cage se recolonisait rapidement. De plus, la recolonisation était favorisée par le *co-housing* avec des souris contrôles, suggérant un rôle de l'environnement. Cet article suggère également qu'une compétition entre les *Muribaculaceae* et les *Bacteroidaceae* a lieu pour occuper la même niche écologique. Dans notre modèle murin, nous retrouvons également une restauration spontanée des *Muribaculaceae* après une administration de clindamycine, associée à une compétition avec les *Bacteroidaceae*. Cependant, cette restauration était diminuée ou retardée chez les souris colonisées par EPC. Le mécanisme exact n'est pas encore élucidé, mais pourrait faire intervenir la souche de *K. pneumoniae* implantée, ou peut-être les taxons *Hungatella* et *Lachnoclostridium* dont l'abondance était plus élevée chez les souris colonisées par EPC. Cette inhibition de la restauration pourrait se faire par un mécanisme direct (compétition vis-à-vis de nutriments essentiels, production de bactériocines, système de sécrétion de type VI) ou indirect (production de peptides antimicrobiens par l'hôte, effet sur le mucus, effet de différents métabolites) (49, 285).

Nous proposons un schéma récapitulatif des effets sur le microbiote digestif de la dysbiose induite par la colonisation par EPC dans notre modèle (Figure 101).



**Figure 101. Schéma récapitulatif des principales modifications observées au niveau colique dans notre modèle murin.** \* : taxons retrouvés dans le groupe FMT, mais pas dans le groupe clindamycine.

La dysbiose digestive a été décrite comme associée à un pronostic défavorable chez les patients hospitalisés en réanimation : risque accru d'infection, de sepsis, et de syndrome de défaillance multiviscérale (286). Dans les jours ou les semaines suivant la fin d'une antibiothérapie, un nouveau microbiote se reconstitue, mais sa composition peut différer par rapport au microbiote préantibiothérapie (287). La transplantation de microbiote fécal (FMT) permettait sur un faible nombre de patients (n=2) de diminuer la diarrhée et le syndrome de dysfonction multiorganes associés à la dysbiose intestinale (288). Chez ces deux patients, on observait initialement une abondance relative élevée en *Bacteroidaceae* et *Enterobacteriaceae*, qui diminuait après FMT. Une revue de la littérature reprend 5 cas de patients admis en réanimation qui ont vu leur état s'améliorer après FMT (hors infection à *C. difficile*), dès J1 ou J2 après FMT (289).

La dysbiose digestive a également été associée à une mortalité à 180 jours plus élevée chez 98 patients admis dans un service de réanimation neurologique (290). Une augmentation en *Enterobacteriaceae* observée pendant la première semaine après l'admission en réanimation était associée à une augmentation du risque de mortalité à 180 jours de 92 %. Une autre étude, ayant inclus 115 patients admis en réanimation, retrouvait une augmentation de la famille des *Enterobacteriaceae* entre leur entrée dans le service et soit leur sortie, soit au dixième jour d'hospitalisation en réanimation (291). De plus, des taxons réputés « anti-inflammatoires » étaient diminués, comme *Faecalibacterium*.

Le modèle murin que nous avons développé retrouve des résultats assez similaires, avec une pneumopathie à *P. aeruginosa* plus sévère chez les souris présentant une dysbiose intestinale, chez qui les *Bacteroidaceae* et les *Enterobacteriaceae* sont plus abondantes.

### **Mécanismes potentiellement impliqués au niveau de l'axe intestin-poumon**

Dans la littérature, quelques modèles murins de pneumopathie retrouvaient un rôle du microbiote digestif dans la modulation de la réponse de l'hôte. Dans un modèle de pneumopathie à *S. pneumoniae*, la sévérité était augmentée après altération du microbiote digestif par 3 semaines d'antibiothérapie (ampicilline, néomycine, métronidazole et vancomycine) (6). Le mécanisme semblait faire intervenir les macrophages alvéolaires, qui présentaient de moins bonnes capacités de phagocytose. Dans un modèle de pneumopathie à *P. aeruginosa*, une antibiothérapie par vancomycine pendant 14 jours conduisait à une augmentation de la charge bactérienne pulmonaire en *P. aeruginosa*, et à une lésion pulmonaire plus importante d'après une analyse anatomopathologique (292). L'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-10 était augmentée dans le liquide broncho-alvéolaire des souris ayant été exposées à la vancomycine, bien qu'aucune différence ne soit observée au niveau du recrutement des cellules dendritiques.



Dans notre modèle, des modifications importantes des populations cellulaires pulmonaires étaient observées en cytométrie en flux. Dans le groupe colonisé par EPC, le nombre de cellules dendritiques, macrophages alvéolaires, lymphocytes T NK et CD4 était diminué par rapport aux groupes contrôle et FMT.

Plusieurs hypothèses sont en cours d'exploration pour expliquer ce phénomène. Les SCFA ont un rôle d'interface entre le microbiote digestif et le système immunitaire de l'hôte bien décrit dans la littérature. Les modifications majeures de composition du microbiote digestif suggèrent un rôle potentiel des SCFA. En effet, une corrélation entre *Muribaculaceae* et propionate a déjà été montrée dans la littérature (134). Les *Muribaculaceae* présentant une abondance proche de zéro dans le groupe colonisé par EPC, associée à une expansion de *Lachnospiraceae* on peut s'attendre à des modifications en SCFA entre les groupes. De plus, la restauration partielle en *Muribaculaceae* dans les groupes clindamycine et FMT pourrait être corrélée à la restauration du pronostic lors d'une pneumopathie à *P. aeruginosa*. Pour explorer cette hypothèse, en plus du dosage des SCFA qui est en cours, nous souhaitons tenter de restaurer l'abondance en *Muribaculaceae* par gavage de la souche *M. intestinale* DSM 28989 et évaluer la modification de la réponse de l'hôte suite à une pneumopathie à *P. aeruginosa*.

Une autre voie bien décrite dans la littérature est celle des métabolites du tryptophane. Parmi ceux-ci, une diminution importante de la sérotonine au niveau digestif était observée dans le groupe EPC. Pour explorer cette hypothèse, nous souhaitons doser la sérotonine dans le sang et le poumon, et explorer les plaquettes qui sont clairement associées à la sérotonine et impliquées dans la défense vis-à-vis de la pneumopathie à *P. aeruginosa* (265). Cette hypothèse peut potentiellement expliquer l'effet à distance d'une dysbiose digestive sur la réponse de l'hôte lors d'une pneumopathie à *P. aeruginosa*. En effet, la sérotonine est transportée par les plaquettes, depuis le compartiment digestif où elle est produite jusqu'au site de l'infection où elle sera relarguée lors de l'activation plaquettaire. De multiples synergies entre plaquettes et sérotonine ont été décrites. Dans la dengue, la thrombocytopénie est provoquée par le relargage de sérotonine (293). Dans l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, une thrombocytopénie périphérique a également été décrite (265). Le rôle du microbiote digestif dans la régulation de la biosynthèse de sérotonine a été mis en évidence (294). Cependant, l'existence d'un lien entre le

microbiote digestif, la concentration digestive en sérotonine, et l'effet de l'activation plaquettaire sur une pneumopathie bactérienne n'a pas encore été explorée.

Une inférence métabolique fonctionnelle à partir des données de métagénomique ciblée sur l'ADNr 16S à l'aide de PICRUSt2 permettait d'associer dans notre modèle la diminution de la sérotonine à une abondance relative prédite en aryl-sulfotransférase plus importante dans le groupe EPC. Cette augmentation prédite en aryl-sulfotransférase semblait liée à l'expansion du genre *Hungatella* observée dans le groupe EPC. En effet, *Hungatella hathewayi* posséderait 10 protéines correspondant à une fonction aryl-sulfotransférase après annotation automatique. Pour explorer cette hypothèse, nous souhaitons rechercher la présence du métabolite de la sérotonine 5-HT-sulfate au niveau digestif, et évaluer la capacité de *H. hathewayi* à dégrader la sérotonine *in vitro*.

Finalement, des dosages en glucocorticoïdes au niveau digestif pourraient être réalisés pour confirmer la diminution de concentration en cortisone observée chez les souris colonisées par EPC. Il est important de confirmer ces résultats par une autre méthode, car la technique de métabolomique utilisée dans le chapitre 4.3.6 étant en cours de mise au point, elle n'est pas suffisante à elle seule.

Une meilleure compréhension de la contribution des microbiotes digestifs et pulmonaires dans l'axe intestin-poumon pourrait aboutir à l'identification d'espèces ou de métabolites d'intérêt. La transplantation de microbiote fécal a un effet protecteur bien démontré, mais utiliser une fraction isolée (microorganisme spécifique ou métabolite associé) présentant un effet similaire pour une situation clinique donnée représenterait un grand progrès (195). En effet, des risques liés à la FMT existent, comme le transfert de bactéries multirésistantes, ainsi que la survenue de pneumopathie d'aspiration (295). Pour ces raisons, et pour un souci de standardisation lors d'essais cliniques futurs, des stratégies basées sur l'administration de microorganismes ou de leurs métabolites sont à privilégier (296).

En conclusion, nous avons montré que la colonisation digestive par *K. pneumoniae* NDM-1 altérerait le pronostic d'une infection aiguë à *P. aeruginosa*. Le mécanisme était lié à l'installation d'une dysbiose digestive durable, s'opposant à la résilience naturelle du

microbiote digestif. Un des principaux marqueurs de cette dysbiose dans le modèle murin mis au point était la diminution d'abondance en *Muribaculaceae*. Le mécanisme précis de l'altération du pronostic est en cours d'exploration, néanmoins des axes de recherche ont été identifiés. L'analyse des concentrations en sérotonine et de l'activation des plaquettes, ainsi que des concentrations digestives en SCFA semble présenter un intérêt particulier. Ce travail suggère que la colonisation asymptomatique par des bactéries multirésistantes, telles que la souche de *K. pneumoniae* NDM-1 utilisée, ne constitue pas uniquement un problème écologique de moindre efficacité des antibiotiques en cas d'infection intercurrente. En effet, cette colonisation digestive asymptomatique peut favoriser l'installation d'une dysbiose venant moduler l'immunité de l'hôte et altérer le pronostic d'une infection aiguë.

## 6. Bibliographie

1. **Jacobson A, Lam L, Rajendram M, Tamburini F, Honeycutt J, Pham T, Van Treuren W, Pruss K, Stabler SR, Lugo K, Bouley DM, Vilches-Moure JG, Smith M, Sonnenburg JL, Bhatt AS, Huang KC, Monack D.** 2018. A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to Salmonella Infection. *Cell Host Microbe* **24**:296-307 e7.
2. **Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Susac B, Miller L, Kim GJ, Ling L, Pamer EG.** 2017. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium. *Cell Host Microbe* **21**:592-602 e4.
3. **Hilliquin D, Le Guern R, Thepot Seegers V, Neulier C, Lomont A, Marie V, Legeay C, Merrer J, Lepelletier D, Rogues AM, Grandbastien B, Lucet JC, Zahar JR.** 2018. Risk factors for acquisition of OXA-48-producing Klebsiella pneumonia among contact patients: a multicentre study. *J Hosp Infect* **98**:253-259.
4. **Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Liang S, Feng Q, Zhang C, Pyl PT, Coelho LP, Yang H, Wang J, Typas A, Nielsen MF, Nielsen HB, Bork P, Wang J, Vilsboll T, Hansen T, Knop FK, Arumugam M, Pedersen O.** 2018. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* **3**:1255-1265.
5. **Wypych TP, Wickramasinghe LC, Marsland BJ.** 2019. The influence of the microbiome on respiratory health. *Nat Immunol* doi:10.1038/s41590-019-0451-9.
6. **Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, de Sousa e Melo F, Roelofs JJ, de Boer JD, Hoogendijk AJ, de Beer R, de Vos A, Belzer C, de Vos WM, van der Poll T, Wiersinga WJ.** 2016. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. *Gut* **65**:575-83.
7. **Gauguet S, D'Ortona S, Ahnger-Pier K, Duan B, Surana NK, Lu R, Cywes-Bentley C, Gadjeva M, Shan Q, Priebe GP, Pier GB.** 2015. Intestinal Microbiota of Mice Influences Resistance to Staphylococcus aureus Pneumonia. *Infect Immun* **83**:4003-14.
8. **Sender R, Fuchs S, Milo R.** 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **14**:e1002533.
9. **Nardone G, Compare D, Rocco A.** 2017. A microbiota-centric view of diseases of the upper gastrointestinal tract. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **2**:298-312.
10. **Worsoe J, Fynne L, Gregersen T, Schlageter V, Christensen LA, Dahlerup JF, Rijkhoff NJ, Laurberg S, Krogh K.** 2011. Gastric transit and small intestinal

transit time and motility assessed by a magnet tracking system. *BMC Gastroenterol* **11**:145.

11. **Booijink CC, El-Aidy S, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Troost FJ, Smidt H, Kleerebezem M, De Vos WM, Zoetendal EG.** 2010. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environ Microbiol* **12**:3213-27.
12. **Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, et al.** 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**:59-65.
13. **Metcalf AM, Phillips SF, Zinsmeister AR, MacCarty RL, Beart RW, Wolff BG.** 1987. Simplified assessment of segmental colonic transit. *Gastroenterology* **92**:40-7.
14. **Almeida A, Mitchell AL, Boland M, Forster SC, Gloor GB, Tarkowska A, Lawley TD, Finn RD.** 2019. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* **568**:499-504.
15. **Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, Ross MC, Lloyd RE, Doddapaneni H, Metcalf GA, Muzny D, Gibbs RA, Vatanen T, Huttenhower C, Xavier RJ, Rewers M, Hagopian W, Toppari J, Ziegler AG, She JX, Akolkar B, Lernmark A, Hyoty H, Vehik K, Krischer JP, Petrosino JF.** 2018. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* **562**:583-588.
16. **Gasparrini AJ, Wang B, Sun X, Kennedy EA, Hernandez-Leyva A, Ndao IM, Tarr PI, Warner BB, Dantas G.** 2019. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nat Microbiol* doi:10.1038/s41564-019-0550-2.
17. **Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D.** 2012. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)* **36**:817-25.
18. **Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugere JF.** 2014. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol* **20**:16062-78.
19. **Kalantar-Zadeh K, Berean KJ, Burgell RE, Muir JG, Gibson PR.** 2019. Intestinal gases: influence on gut disorders and the role of dietary manipulations. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* doi:10.1038/s41575-019-0193-z.

20. **Mukherjee PK, Sendid B, Hoarau G, Colombel JF, Poulain D, Ghannoum MA.** 2015. Mycobiota in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**:77-87.
21. **Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD.** 2013. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* **8**:e66019.
22. **Richard ML, Sokol H.** 2019. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**:331-345.
23. **Columpsi P, Sacchi P, Zuccaro V, Cima S, Sarda C, Mariani M, Gori A, Bruno R.** 2016. Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. *J Med Virol* **88**:1467-72.
24. **Martens EC, Chiang HC, Gordon JI.** 2008. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* **4**:447-57.
25. **Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E.** 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* **3**:289-306.
26. **Topping DL, Clifton PM.** 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* **81**:1031-64.
27. **Duncan SH, Louis P, Flint HJ.** 2004. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* **70**:5810-7.
28. **Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, Zhang M, Oh PL, Nehrenberg D, Hua K, Kachman SD, Moriyama EN, Walter J, Peterson DA, Pomp D.** 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:18933-8.
29. **Hugenholtz F, de Vos WM.** 2018. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell Mol Life Sci* **75**:149-160.
30. **Ebino KY, Yoshinaga K, Suwa T, Kuwabara Y, Takahashi KW.** 1989. Effects of prevention of coprophagy on pregnant mice--is coprophagy beneficial on a balanced diet? *Jikken Dobutsu* **38**:245-52.
31. **Riva A, Kuzyk O, Forsberg E, Siuzdak G, Pfann C, Herbold C, Daims H, Loy A, Warth B, Berry D.** 2019. A fiber-deprived diet disturbs the fine-scale spatial architecture of the murine colon microbiome. *Nat Commun* **10**:4366.

32. **Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR.** 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**:485-98.
33. **Chen B, Chen H, Shu X, Yin Y, Li J, Qin J, Chen L, Peng K, Xu F, Gu W, Zhao H, Jiang L, Li L, Song J, Elitsur Y, Yu HD, Jiang M, Wang X, Xiang C.** 2018. Presence of Segmented Filamentous Bacteria in Human Children and Its Potential Role in the Modulation of Human Gut Immunity. *Front Microbiol* **9**:1403.
34. **Tan TG, Sefik E, Geva-Zatorsky N, Kua L, Naskar D, Teng F, Pasmán L, Ortiz-Lopez A, Jupp R, Wu HJ, Kasper DL, Benoist C, Mathis D.** 2016. Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:E8141-E8150.
35. **Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne SB, Xia Z, Qiu X, Li X, Long H, Zhang J, Zhang D, Liu C, Fang Z, Chou J, Glanville J, Hao Q, Kotowska D, Colding C, Licht TR, Wu D, Yu J, Sung JJ, Liang Q, Li J, Jia H, Lan Z, Tremaroli V, Dworzynski P, Nielsen HB, Backhed F, Dore J, Le Chatelier E, Ehrlich SD, Lin JC, Arumugam M, Wang J, Madsen L, Kristiansen K.** 2015. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotechnol* **33**:1103-8.
36. **Woese CR.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**:221-71.
37. **Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM.** 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun* **10**:5029.
38. **Yang B, Wang Y, Qian PY.** 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* **17**:135.
39. **Chen Z, Hui PC, Hui M, Yeoh YK, Wong PY, Chan MCW, Wong MCS, Ng SC, Chan FKL, Chan PKS.** 2019. Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling. *mSystems* **4**.
40. **Hallmaier-Wacker LK, Lueert S, Roos C, Knauf S.** 2018. The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. *Sci Rep* **8**:6292.
41. **Panek M, Cipicic Paljetak H, Baresic A, Peric M, Matijasic M, Lojkic I, Vranesic Bender D, Krznaric Z, Verbanac D.** 2018. Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci Rep* **8**:5143.
42. **Lauder AP, Roche AM, Sherrill-Mix S, Bailey A, Laughlin AL, Bittinger K, Leite R, Elovitz MA, Parry S, Bushman FD.** 2016. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome* **4**:29.

43. **de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, Parkhill J, Charnock-Jones DS, Smith GCS.** 2019. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* doi:10.1038/s41586-019-1451-5.
44. **Malla MA, Dubey A, Kumar A, Yadav S, Hashem A, Abd Allah EF.** 2018. Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Front Immunol* **9**:2868.
45. **Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR.** 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* **17**:333-51.
46. **Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP.** 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* **11**:2639-2643.
47. **Callahan BJ, Wong J, Heiner C, Oh S, Theriot CM, Gulati AS, McGill SK, Dougherty MK.** 2019. High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Res* doi:10.1093/nar/gkz569.
48. **Hebert PDN, Braukmann TWA, Prosser SWJ, Ratnasingham S, deWaard JR, Ivanova NV, Janzen DH, Hallwachs W, Naik S, Sones JE, Zakharov EV.** 2018. A Sequel to Sanger: amplicon sequencing that scales. *BMC Genomics* **19**:219.
49. **Kim S, Covington A, Pamer EG.** 2017. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* **279**:90-105.
50. **Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A.** 2016. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* **65**:1906-1915.
51. **Brown RB, Martyak SN, Barza M, Curtis L, Weinstein L.** 1976. Penetration of clindamycin phosphate into the abnormal human biliary tract. *Ann Intern Med* **84**:168-70.
52. **Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, Ubeda C, Xavier J, Pamer EG.** 2012. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect Immun* **80**:62-73.
53. **Sorgel F, Kinzig M.** 1993. The chemistry, pharmacokinetics and tissue distribution of piperacillin/tazobactam. *J Antimicrob Chemother* **31 Suppl A**:39-60.
54. **Harrison MP, Haworth SJ, Moss SR, Wilkinson DM, Featherstone A.** 1993. The disposition and metabolic fate of <sup>14</sup>C-meropenem in man. *Xenobiotica* **23**:1311-23.



55. **Parry MF, Smego DA, Digiovanni MA.** 1988. Hepatobiliary kinetics and excretion of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **32**:982-5.
56. **Stein GE, Goldstein EJ.** 2006. Fluoroquinolones and anaerobes. *Clin Infect Dis* **42**:1598-607.
57. **Ooijevaar RE, van Beurden YH, Terveer EM, Goorhuis A, Bauer MP, Keller JJ, Mulder CJJ, Kuijper EJ.** 2018. Update of treatment algorithms for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* **24**:452-462.
58. **Schaad UB, McCracken GH, Jr., Nelson JD.** 1980. Clinical pharmacology and efficacy of vancomycin in pediatric patients. *J Pediatr* **96**:119-26.
59. **Citron DM, Tyrrell KL, Merriam CV, Goldstein EJ.** 2012. In vitro activities of CB-183,315, vancomycin, and metronidazole against 556 strains of *Clostridium difficile*, 445 other intestinal anaerobes, and 56 Enterobacteriaceae species. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:1613-5.
60. **Dethlefsen L, Relman DA.** 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**:4554-61.
61. **Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK.** 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* **1**:56-66.
62. **Isaac S, Scher JU, Djukovic A, Jimenez N, Littman DR, Abramson SB, Pamer EG, Ubeda C.** 2017. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *J Antimicrob Chemother* **72**:128-136.
63. **Doan T, Hinterwirth A, Worden L, Arzika AM, Maliki R, Abdou A, Kane S, Zhong L, Cummings SL, Sakar S, Chen C, Cook C, Lebas E, Chow ED, Nachamkin I, Porco TC, Keenan JD, Lietman TM.** 2019. Gut microbiome alteration in MORDOR I: a community-randomized trial of mass azithromycin distribution. *Nat Med* doi:10.1038/s41591-019-0533-0.
64. **Shaw LP, Bassam H, Barnes CP, Walker AS, Klein N, Balloux F.** 2019. Modelling microbiome recovery after antibiotics using a stability landscape framework. *ISME J* **13**:1845-1856.
65. **Rooney AM, Timberlake K, Brown KA, Bansal S, Tomlinson C, Lee KS, Science M, Coburn B.** 2019. Each Additional Day of Antibiotics is Associated with Lower Gut Anaerobes in Neonatal Intensive Care Unit Patients. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciz698.
66. **Vital M, Howe AC, Tiedje JM.** 2014. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio* **5**:e00889.

67. **Vital M, Karch A, Pieper DH.** 2017. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. *mSystems* **2**.
68. **Taur Y, Coyte K, Schluter J, Robilotti E, Figueroa C, Gjonbalaj M, Littmann ER, Ling L, Miller L, Gyaltsen Y, Fontana E, Morjaria S, Gyurkocza B, Perales MA, Castro-Malaspina H, Tamari R, Ponce D, Koehne G, Barker J, Jakubowski A, Papadopoulos E, Dahi P, Sauter C, Shaffer B, Young JW, Peled J, Meagher RC, Jenq RR, van den Brink MRM, Giralt SA, Pamer EG, Xavier JB.** 2018. Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Sci Transl Med* **10**.
69. **Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T.** 2016. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis* **34**:260-8.
70. **Crosnier C, Stamataki D, Lewis J.** 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**:349-59.
71. **Gehart H, Clevers H.** 2019. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**:19-34.
72. **Ohno H.** 2016. Intestinal M cells. *J Biochem* **159**:151-60.
73. **Belkaid Y, Hand TW.** 2014. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**:121-41.
74. **Johansson ME, Sjovall H, Hansson GC.** 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**:352-61.
75. **Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Buller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW.** 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* **131**:117-29.
76. **Blander JM, Longman RS, Iliev ID, Sonnenberg GF, Artis D.** 2017. Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat Immunol* **18**:851-860.
77. **Mahon M, Xu J, Yi X, Liu X, Gao N, Zhang L.** 2016. Paneth Cell in Adenomas of the Distal Colorectum Is Inversely Associated with Synchronous Advanced Adenoma and Carcinoma. *Sci Rep* **6**:26129.
78. **Salzman NH.** 2010. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: detente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* **1**:401-6.
79. **Elphick DA, Mahida YR.** 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* **54**:1802-9.
80. **Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko HJ, Bock J, Martinez-Naves E, Glickman JN, Tschurtschenthaler M, Hartwig J, Hosomi S, Flak MB, Cusick JL,**

- Kohno K, Iwawaki T, Billmann-Born S, Raine T, Bharti R, Lucius R, Kweon MN, Marciniak SJ, Choi A, Hagen SJ, Schreiber S, Rosenstiel P, Kaser A, Blumberg RS.** 2013. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* **503**:272-6.
81. **Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL.** 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **422**:522-6.
82. **Ting HA, von Moltke J.** 2019. The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. *J Immunol* **202**:1321-1329.
83. **Yoo SK, Starnes TW, Deng Q, Huttenlocher A.** 2011. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* **480**:109-12.
84. **Mortaz E, Alipour SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L.** 2018. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol* **9**:2171.
85. **Ohkubo T, Tsuda M, Suzuki S, El Borai N, Yamamura M.** 1999. Peripheral blood neutrophils of germ-free rats modified by in vivo granulocyte-colony-stimulating factor and exposure to natural environment. *Scand J Immunol* **49**:73-7.
86. **Mowat AM, Scott CL, Bain CC.** 2017. Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nat Med* **23**:1258-1270.
87. **Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R.** 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:2247-52.
88. **Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A.** 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* **31**:563-604.
89. **Cerovic V, Bain CC, Mowat AM, Milling SW.** 2014. Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends Immunol* **35**:270-7.
90. **Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F.** 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **204**:1757-64.
91. **Walch M, Dotiwala F, Mulik S, Thiery J, Kirchhausen T, Clayberger C, Krensky AM, Martinvalet D, Lieberman J.** 2014. Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. *Cell* **157**:1309-23.
92. **Ganal SC, Sanos SL, Kallfass C, Oberle K, Johner C, Kirschning C, Lienenklaus S, Weiss S, Staeheli P, Aichele P, Diefenbach A.** 2012. Priming of natural killer

cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity* **37**:171-86.

93. **Kim SH, Cho BH, Kiyono H, Jang YS.** 2017. Microbiota-derived butyrate suppresses group 3 innate lymphoid cells in terminal ileal Peyer's patches. *Sci Rep* **7**:3980.
94. **Tomasi TB, Jr., Tan EM, Solomon A, Prendergast RA.** 1965. Characteristics of an Immune System Common to Certain External Secretions. *J Exp Med* **121**:101-24.
95. **Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, Shaw DG, Meisel M, McDonald BD, Ishizuka IE, Dent AL, Wilson PC, Jabri B, Antonopoulos DA, Bendelac A.** 2015. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* **43**:541-53.
96. **Palm NW, de Zoete MR, Cullen TW, Barry NA, Stefanowski J, Hao L, Degnan PH, Hu J, Peter I, Zhang W, Ruggiero E, Cho JH, Goodman AL, Flavell RA.** 2014. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**:1000-1010.
97. **Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK.** 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* **14**:20-32.
98. **Annunziato F, Romagnani C, Romagnani S.** 2015. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol* **135**:626-35.
99. **Littman DR, Rudensky AY.** 2010. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* **140**:845-58.
100. **Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C.** 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* **282**:9358-63.
101. **Wu J, Chen J, Tian ZQ, Zhang H, Gong RL, Chen TX, Hong L.** 2017. Clinical Manifestations and Genetic Analysis of 17 Patients with Autosomal Dominant Hyper-IgE Syndrome in Mainland China: New Reports and a Literature Review. *J Clin Immunol* **37**:166-179.
102. **Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK.** 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **194**:519-27.
103. **Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK.** 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* **202**:761-9.

104. **Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL.** 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* **453**:620-5.
105. **Wing K, Sakaguchi S.** 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* **11**:7-13.
106. **Le Bras S, Geha RS.** 2006. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* **116**:1473-5.
107. **Ivanov, II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR.** 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4**:337-49.
108. **Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov, II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K.** 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**:337-41.
109. **Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K.** 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* **500**:232-6.
110. **Gao J, Xu K, Liu H, Liu G, Bai M, Peng C, Li T, Yin Y.** 2018. Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* **8**:13.
111. **Levy M, Blacher E, Elinav E.** 2017. Microbiome, metabolites and host immunity. *Curr Opin Microbiol* **35**:8-15.
112. **Roager HM, Licht TR.** 2018. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun* **9**:3294.
113. **Spohn SN, Mawe GM.** 2017. Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**:412-420.
114. **Martin-Gallausiaux C, Larraufie P, Jarry A, Beguet-Crespel F, Marinelli L, Ledue F, Reimann F, Blottiere HM, Lapaque N.** 2018. Butyrate Produced by Commensal Bacteria Down-Regulates Indolamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) Expression via a Dual Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol* **9**:2838.
115. **Arsenescu R, Arsenescu V, Zhong J, Nasser M, Melinte R, Dingle RW, Swanson H, de Villiers WJ.** 2011. Role of the xenobiotic receptor in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **17**:1149-62.

116. **Qiu J, Heller JJ, Guo X, Chen ZM, Fish K, Fu YX, Zhou L.** 2012. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity* **36**:92-104.
117. **Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L.** 2013. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* **39**:372-85.
118. **Hubbard TD, Murray IA, Perdew GH.** 2015. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metab Dispos* **43**:1522-35.
119. **Rooks MG, Garrett WS.** 2016. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* **16**:341-52.
120. **Manzella C, Singhal M, Alrefai WA, Saksena S, Dudeja PK, Gill RK.** 2018. Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Sci Rep* **8**:6103.
121. **Islam J, Sato S, Watanabe K, Watanabe T, Ardiansyah, Hirahara K, Aoyama Y, Tomita S, Aso H, Komai M, Shirakawa H.** 2017. Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice. *J Nutr Biochem* **42**:43-50.
122. **Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y.** 2017. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* **52**:1-8.
123. **Macfarlane S, Macfarlane GT.** 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* **62**:67-72.
124. **Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ.** 2010. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environ Microbiol* **12**:304-14.
125. **Liu H, Wang J, He T, Becker S, Zhang G, Li D, Ma X.** 2018. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Adv Nutr* **9**:21-29.
126. **Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP.** 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**:397-403.
127. **Artis D.** 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* **8**:411-20.
128. **Burger-van Paassen N, Vincent A, Puiman PJ, van der Sluis M, Bouma J, Boehm G, van Goudoever JB, van Seuningen I, Renes IB.** 2009. The regulation

of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem J* **420**:211-9.

129. **Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Soderholm JD, Sherman PM, McKay DM.** 2010. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis* **16**:1138-48.
130. **Raqib R, Sarker P, Mily A, Alam NH, Arifuzzaman AS, Rekha RS, Andersson J, Gudmundsson GH, Cravioto A, Agerberth B.** 2012. Efficacy of sodium butyrate adjunct therapy in shigellosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *BMC Infect Dis* **12**:111.
131. **den Besten G, Bleeker A, Gerding A, van Eunen K, Havinga R, van Dijk TH, Oosterveer MH, Jonker JW, Groen AK, Reijngoud DJ, Bakker BM.** 2015. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPARgamma-Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* **64**:2398-408.
132. **Lin L, Zhang J.** 2017. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol* **18**:2.
133. **Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Wang J, Sailer M, Theis S, Verbeke K, Raes J.** 2017. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut* **66**:1968-1974.
134. **Smith BJ, Miller RA, Ericsson AC, Harrison DC, Strong R, Schmidt TM.** 2019. Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice. *BMC Microbiol* **19**:130.
135. **Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS.** 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**:569-73.
136. **Nicolas GR, Chang PV.** 2019. Deciphering the Chemical Lexicon of Host-Gut Microbiota Interactions. *Trends Pharmacol Sci* **40**:430-445.
137. **Rivera-Chavez F, Zhang LF, Faber F, Lopez CA, Byndloss MX, Olsan EE, Xu G, Velazquez EM, Lebrilla CB, Winter SE, Baumler AJ.** 2016. Depletion of Butyrate-Producing Clostridia from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of Salmonella. *Cell Host Microbe* **19**:443-54.
138. **Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chavez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, Torres TP, Byndloss AJ, Faber F, Gao Y, Litvak Y, Lopez CA, Xu G, Napoli E, Giulivi C, Tsohis RM, Revzin A, Lebrilla CB, Baumler AJ.** 2017. Microbiota-activated PPAR-gamma signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* **357**:570-575.

139. **Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G.** 2013. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. *Int J Med Microbiol* **303**:484-91.
140. **Bliven KA, Maurelli AT.** 2012. Antivirulence genes: insights into pathogen evolution through gene loss. *Infect Immun* **80**:4061-70.
141. **Kibe R, Kurihara S, Sakai Y, Suzuki H, Ooga T, Sawaki E, Muramatsu K, Nakamura A, Yamashita A, Kitada Y, Takeyama M, Benno Y, Matsumoto M.** 2014. Upregulation of colonic luminal polyamines produced by intestinal microbiota delays senescence in mice. *Sci Rep* **4**:4548.
142. **Surana NK, Kasper DL.** 2014. Deciphering the tete-a-tete between the microbiota and the immune system. *J Clin Invest* **124**:4197-203.
143. **Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL.** 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* **122**:107-18.
144. **An D, Oh SF, Olszak T, Neves JF, Avci FY, Erturk-Hasdemir D, Lu X, Zeissig S, Blumberg RS, Kasper DL.** 2014. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* **156**:123-33.
145. **Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC.** 2015. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* **33**:257-90.
146. **Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, Croitoru K, Girardin SE.** 2014. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* **14**:9-23.
147. **Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E.** 2019. Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol* doi:10.1038/s41579-019-0256-8.
148. **Budden KF, Gellatly SL, Wood DL, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, Hansbro PM.** 2017. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol* **15**:55-63.
149. **Keely S, Talley NJ, Hansbro PM.** 2012. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal Immunol* **5**:7-18.
150. **Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF.** 2010. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol* **160**:1-9.
151. **Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Bjorksten B, Engstrand L, Jenmalm MC.** 2014. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age. *Clin Exp Allergy* **44**:842-50.
152. **Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, Blanchard C, Junt T, Nicod LP, Harris NL, Marsland BJ.** 2014. Gut



- microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* **20**:159-66.
153. **Lagkouvardos I, Lesker TR, Hitch TCA, Galvez EJC, Smit N, Neuhaus K, Wang J, Baines JF, Abt B, Stecher B, Overmann J, Strowig T, Clavel T.** 2019. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. *Microbiome* **7**:28.
  154. **Thorburn AN, McKenzie CI, Shen S, Stanley D, Macia L, Mason LJ, Roberts LK, Wong CH, Shim R, Robert R, Chevalier N, Tan JK, Marino E, Moore RJ, Wong L, McConville MJ, Tull DL, Wood LG, Murphy VE, Mattes J, Gibson PG, Mackay CR.** 2015. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat Commun* **6**:7320.
  155. **Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, Pessoa-Lopes P, Mathew CG, Sanderson J, Hart AL, Kamm MA, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Lindsay JO, Whelan K.** 2012. Smokers with active Crohn's disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **18**:1092-100.
  156. **Clarke TB.** 2014. Early innate immunity to bacterial infection in the lung is regulated systemically by the commensal microbiota via nod-like receptor ligands. *Infect Immun* **82**:4596-606.
  157. **Segal LN, Alekseyenko AV, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Gao Z, Chen H, Berger KI, Goldring RM, Rom WN, Blaser MJ, Weiden MD.** 2013. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome* **1**:19.
  158. **Mathieu E, Escribano-Vazquez U, Descamps D, Cherbuy C, Langella P, Riffault S, Remot A, Thomas M.** 2018. Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Front Physiol* **9**:1168.
  159. **Hery-Arnaud G, Boutin S, Cuthbertson L, Elborn SJ, Tunney MM.** 2019. The lung and gut microbiome: what has to be taken into consideration for cystic fibrosis? *J Cyst Fibros* **18**:13-21.
  160. **Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, Curtis JL.** 2015. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc* **12**:821-30.
  161. **Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleesschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL, Burden of AMRCG.** 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European

- Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* **19**:56-66.
162. **David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, Abudahab K, Goater R, Giani T, Errico G, Aspbury M, Sjunnebo S, Eu SWG, Group ES, Feil EJ, Rossolini GM, Aanensen DM, Grundmann H.** 2019. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* doi:10.1038/s41564-019-0492-8.
  163. **Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques.** Rapport d'activité 2018.
  164. **Stiefel U, Pultz NJ, Helfand MS, Donskey CJ.** 2004. Increased susceptibility to vancomycin-resistant *Enterococcus* intestinal colonization persists after completion of anti-anaerobic antibiotic treatment in mice. *Infect Control Hosp Epidemiol* **25**:373-9.
  165. **Trevino M, Areses P, Penalver MD, Cortizo S, Pardo F, del Molino ML, Garcia-Riestra C, Hernandez M, Llovo J, Regueiro BJ.** 2012. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group and characterisation of carbapenemase-producing strains by automated REP-PCR and MALDI TOF. *Anaerobe* **18**:37-43.
  166. **Pultz NJ, Stiefel U, Subramanyan S, Helfand MS, Donskey CJ.** 2005. Mechanisms by which anaerobic microbiota inhibit the establishment in mice of intestinal colonization by vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J Infect Dis* **191**:949-56.
  167. **Jump RL, Polinkovsky A, Hurless K, Sitzlar B, Eckart K, Tomas M, Deshpande A, Nerandzic MM, Donskey CJ.** 2014. Metabolomics analysis identifies intestinal microbiota-derived biomarkers of colonization resistance in clindamycin-treated mice. *PLoS One* **9**:e101267.
  168. **Ormerod KL, Wood DL, Lachner N, Gellatly SL, Daly JN, Parsons JD, Dal'Molin CG, Palfreyman RW, Nielsen LK, Cooper MA, Morrison M, Hansbro PM, Hugenholtz P.** 2016. Genomic characterization of the uncultured *Bacteroidales* family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome* **4**:36.
  169. **Hertz FB, Lobner-Olesen A, Frimodt-Moller N.** 2014. Antibiotic selection of *Escherichia coli* sequence type 131 in a mouse intestinal colonization model. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:6139-44.
  170. **Stiefel U, Pultz NJ, Donskey CJ.** 2007. Effect of carbapenem administration on establishment of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci and *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:372-5.
  171. **Wong BK, Sahly Y, Mistry G, Waldman S, Musson D, Majumdar A, Xu X, Yu S, Lin JH, Singh R, Holland S.** 2004. Comparative disposition of [<sup>14</sup>C]ertapenem, a novel carbapenem antibiotic, in rat, monkey and man. *Xenobiotica* **34**:379-89.

172. **Norrby SR, Rogers JD, Ferber F, Jones KH, Zacchei AG, Weidner LL, Demetriades JL, Gravalles DA, Hsieh JY.** 1984. Disposition of radiolabeled imipenem and cilastatin in normal human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **26**:707-14.
173. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1151-61.
174. **Perez F, Pultz MJ, Endimiani A, Bonomo RA, Donskey CJ.** 2011. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:2585-9.
175. **Lepelletier D, Berthelot P, Lucet JC, Fournier S, Jarlier V, Grandbastien B, National Working G.** 2015. French recommendations for the prevention of 'emerging extensively drug-resistant bacteria' (eXDR) cross-transmission. *J Hosp Infect* **90**:186-95.
176. **Chiotos K, Tamma PD, Flett KB, Naumann M, Karandikar MV, Bilker WB, Zaoutis T, Han JH.** 2017. Multicenter Study of the Risk Factors for Colonization or Infection with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Children. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.
177. **Poole K, George R, Decraene V, Shankar K, Cawthorne J, Savage N, Welfare W, Dodgson A.** 2016. Active case finding for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a teaching hospital: prevalence and risk factors for colonization. *J Hosp Infect* **94**:125-9.
178. **Okamoto K, Lin MY, Haverkate M, Lolans K, Moore NM, Weiner S, Lyles RD, Blom D, Rhee Y, Kemble S, Fogg L, Hines DW, Weinstein RA, Hayden MK.** 2017. Modifiable Risk Factors for the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Among Long-Term Acute-Care Hospital Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **38**:670-677.
179. **Muggeo A, Guillard T, Barbe C, Thierry A, Bajolet O, Vernet-Garnier V, Limelette A, Brasme L, De Champs C, Group C.** 2017. Factors associated with carriage of carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in North-Eastern France and outcomes of infected patients. *J Antimicrob Chemother* **72**:1496-1501.
180. **Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, Hutton-Thomas RA, Whalen CC, Bonomo RA, Rice LB.** 2000. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* **343**:1925-32.
181. **Bhalla A, Pultz NJ, Ray AJ, Hoyen CK, Eckstein EC, Donskey CJ.** 2003. Antianaerobic antibiotic therapy promotes overgrowth of antibiotic-resistant,

gram-negative bacilli and vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**:644-9.

182. **Ubeda C, Bucci V, Caballero S, Djukovic A, Toussaint NC, Equinda M, Lipuma L, Ling L, Gobourne A, No D, Taur Y, Jenq RR, van den Brink MR, Xavier JB, Pamer EG.** 2013. Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* **81**:965-73.
183. **George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier FJ, Revol-Junelles AM, Borges F, Foligne B.** 2018. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front Microbiol* **9**:2899.
184. **Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA.** 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **16**:605-616.
185. **Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, Zur M, Regev-Lehavi D, Ben-Zeev Brik R, Federici S, Horn M, Cohen Y, Moor AE, Zeevi D, Korem T, Kotler E, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Pevsner-Fischer M, Shapiro H, Sharon I, Halpern Z, Segal E, Elinav E.** 2018. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* **174**:1406-1423 e16.
186. **Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, Kotler E, Zur M, Regev-Lehavi D, Brik RB, Federici S, Cohen Y, Linevsky R, Rothschild D, Moor AE, Ben-Moshe S, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Shapiro H, Pevsner-Fischer M, Sharon I, Halpern Z, Segal E, Elinav E.** 2018. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* **174**:1388-1405 e21.
187. **Agarwal R, Sharma N, Chaudhry R, Deorari A, Paul VK, Gewolb IH, Panigrahi P.** 2003. Effects of oral *Lactobacillus GG* on enteric microflora in low-birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **36**:397-402.
188. **Panigrahi P, Parida S, Pradhan L, Mohapatra SS, Misra PR, Johnson JA, Chaudhry R, Taylor S, Hansen NI, Gewolb IH.** 2008. Long-term colonization of a *Lactobacillus plantarum* synbiotic preparation in the neonatal gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **47**:45-53.
189. **Panigrahi P, Parida S, Nanda NC, Satpathy R, Pradhan L, Chandel DS, Baccaglini L, Mohapatra A, Mohapatra SS, Misra PR, Chaudhry R, Chen HH, Johnson JA, Morris JG, Paneth N, Gewolb IH.** 2017. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature* **548**:407-412.

190. **Youn HN, Lee DH, Lee YN, Park JK, Yuk SS, Yang SY, Lee HJ, Woo SH, Kim HM, Lee JB, Park SY, Choi IS, Song CS.** 2012. Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Res* **93**:138-43.
191. **Alexandre Y, Le Berre R, Barbier G, Le Blay G.** 2014. Screening of *Lactobacillus* spp. for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *BMC Microbiol* **14**:107.
192. **Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E.** 2019. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat Med* **25**:716-729.
193. **Mahieu R, Cassisa V, Sanderink D, Chenouard R, Pailhories H, Kempf M, Dubee V, Eveillard M.** 2017. Iterative Fecal Microbiota Transplantations for Eradicating Digestive Colonization With Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Is It Worth It? *Infect Control Hosp Epidemiol* **38**:1265-1266.
194. **Mahieu R, Cassisa V, Hilliquin D, Coron N, Pailhories H, Kempf M, Joly-Guillou ML, Eveillard M.** 2017. Impact of faecal microbiota transplantation on mouse digestive colonization with two extensively resistant bacteria. *J Infect* **75**:75-77.
195. **Lynch SV, Ng SC, Shanahan F, Tilg H.** 2019. Translating the gut microbiome: ready for the clinic? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* doi:10.1038/s41575-019-0204-0.
196. **Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, Mullish BH, Allegretti JR, Kassam Z, Putignani L, Fischer M, Keller JJ, Costello SP, Sokol H, Kump P, Satokari R, Kahn SA, Kao D, Arkkila P, Kuijper EJ, Vehreschild MJG, Pintus C, Lopetuso L, Masucci L, Scaldaferri F, Terveer EM, Nieuwdorp M, López-Sanromán A, Kupcinskis J, Hart A, Tilg H, Gasbarrini A.** 2019. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* doi:10.1136/gutjnl-2019-319548:gutjnl-2019-319548.
197. **Tacconelli E, Mazzaferri F, de Smet AM, Bragantini D, Eggimann P, Huttner BD, Kuijper EJ, Lucet JC, Mutters NT, Sanguinetti M, Schwaber MJ, Souli M, Torre-Cisneros J, Price JR, Rodriguez-Bano J.** 2019. ESCMID-EUCIC clinical guidelines on decolonization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria carriers. *Clin Microbiol Infect* **25**:807-817.
198. **Hvas CL, Dahl Jorgensen SM, Jorgensen SP, Storgaard M, Lemming L, Hansen MM, Erikstrup C, Dahlerup JF.** 2019. Fecal Microbiota Transplantation Is Superior to Fidaxomicin for Treatment of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* **156**:1324-1332 e3.
199. **Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Gruning BA, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltemann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A, Blankenberg D.** 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and

collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res*  
doi:10.1093/nar/gky379.

200. **Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodriguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, et al.** 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **37**:852-857.
201. **Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO.** 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**:D590-6.
202. **Beckers B, Op De Beeck M, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J.** 2016. Performance of 16s rDNA Primer Pairs in the Study of Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes in Metabarcoding Studies. *Front Microbiol* **7**:650.
203. **Mandal S, Van Treuren W, White RA, Eggesbo M, Knight R, Peddada SD.** 2015. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis* **26**:27663.
204. **Mohammadi T, Reesink HW, Vandembroucke-Grauls CM, Savelkoul PH.** 2003. Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates. *J Clin Microbiol* **41**:4796-8.
205. **Liu C, Song Y, McTeague M, Vu AW, Wexler H, Finegold SM.** 2003. Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* **222**:9-16.
206. **Thonusin C, IglayReger HB, Soni T, Rothberg AE, Burant CF, Evans CR.** 2017. Evaluation of intensity drift correction strategies using MetaboDrift, a normalization tool for multi-batch metabolomics data. *J Chromatogr A* **1523**:265-274.
207. **Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J.** 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res* **46**:W486-W494.
208. **Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D, Volk HD, Schuett C, Reinke P.** 2009. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients

with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant* **24**:1901-8.

209. **Zhu W, Stevens AP, Dettmer K, Gottfried E, Hoves S, Kreutz M, Holler E, Canelas AB, Kema I, Oefner PJ.** 2011. Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **401**:3249-61.
210. **Douglas GM, Maffei VJ, Zaneveld J, Yurgel SN, Brown JR, Taylor CM, Huttenhower C, Langille MGI.** 2019. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *bioRxiv* doi:10.1101/672295:672295.
211. **Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG.** 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* **30**:3123-4.
212. **R Core Team.** 2013. R: A language and environment for statistical computing.
213. **Le Guern R, Grandjean T, Faure K, Bauduin M, Kipnis E, Dessein R.** 2018. Draft genome sequences of two carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood cultures. *Microbiol Resour Announc* **7**:e01057-18.
214. **Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, Holt KE.** 2016. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom* **2**:e000102.
215. **Bartolini A, Basso M, Franchin E, Menegotto N, Ferrari A, De Canale E, Andreis S, Scaggiante R, Stefani S, Palu G, Parisi SG.** 2017. Prevalence, molecular epidemiology and intra-hospital acquisition of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases in an Italian teaching hospital from January 2015 to September 2016. *Int J Infect Dis* **59**:103-109.
216. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV.** 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* **67**:2640-4.
217. **Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, Brisse S, Holt KE.** 2018. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom* **4**.
218. **Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, Holt KE.** 2018. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med* **10**:77.
219. **Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD.** 2013. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:130-6.

220. **Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y.** 2019. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev* **33**.
221. **Holden VI, Bachman MA.** 2015. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics* **7**:986-95.
222. **Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN.** 2012. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *MBio* **3**.
223. **Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL.** 2007. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect Immun* **75**:1463-72.
224. **Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lepine F, Dozois CM, Weiser JN.** 2011. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect Immun* **79**:3309-16.
225. **Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz MB, Edwards DJ, Nguyen KV, Nguyen TV, Dao TT, Mensink M, Minh VL, Nhu NT, Schultsz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA, Thomson NR.** 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E3574-81.
226. **Argimon S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, Feil EJ, Holden MTG, Yeats CA, Grundmann H, Spratt BG, Aanensen DM.** 2016. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microb Genom* **2**:e000093.
227. **Le Guern R, Grandjean T, Bauduin M, Figeac M, Millot G, Loquet A, Faure K, Kipnis E, Dessein R.** 2019. Impact of the Timing of Antibiotic Administration on Digestive Colonization with Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother* **63**.
228. **Hofmann AF, Eckmann L.** 2006. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4333-4.
229. **van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk L-v.** 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* **69**:405-11.
230. **Ruppe E, Armand-Lefevre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, Goujon C, Ralaimazava P, Campa P, Girard PM, Wyplosz B, Vittecoq D, Bouchaud O, Le Loup G, Pialoux G, Perrier M, Wieder I, Moussa N, Esposito-Farese M, Hoffmann I, Coignard B, Lucet JC, Andremont A, Matheron S.** 2015. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis* **61**:593-600.



231. **Kantele A, Mero S, Kirveskari J, Laaveri T.** 2016. Increased Risk for ESBL-Producing Bacteria from Co-administration of Loperamide and Antimicrobial Drugs for Travelers' Diarrhea. *Emerg Infect Dis* **22**:117-20.
232. **Ruppe E, Andremont A, Armand-Lefevre L.** 2018. Digestive tract colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in travellers: An update. *Travel Med Infect Dis* **21**:28-35.
233. **Takesue Y, Yokoyama T, Akagi S, Ohge H, Imamura Y, Murakami Y, Sueda T.** 2002. Changes in the intestinal flora after the administration of prophylactic antibiotics to patients undergoing a gastrectomy. *Surg Today* **32**:581-6.
234. **Thellier C, Subtil D, Pelletier de Chambure D, Grandbastien B, Catteau C, Beaugendre A, Poitrenaud D, Prevotat A, Richart P, Faure K, Le Guern R.** 2019. An educational intervention about the classification of penicillin allergies: effect on the appropriate choice of antibiotic therapy in pregnant women. *Int J Obstet Anesth* doi:10.1016/j.ijoa.2019.07.005.
235. **Spaulding CN, Klein RD, Ruer S, Kau AL, Schreiber HL, Cusumano ZT, Dodson KW, Pinkner JS, Fremont DH, Janetka JW, Remaut H, Gordon JI, Hultgren SJ.** 2017. Selective depletion of uropathogenic E. coli from the gut by a FimH antagonist. *Nature* **546**:528-532.
236. **Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, Moltzau-Anderson J, Bharti R, Grasis JA, Cassidy L, Tholey A, Fickenscher H, Seegert D, Rosenstiel P, Schreiber S.** 2017. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection. *Gastroenterology* **152**:799-811 e7.
237. **Leinonen R, Sugawara H, Shumway M, International Nucleotide Sequence Database C.** 2011. The sequence read archive. *Nucleic Acids Res* **39**:D19-21.
238. **Cani PD, de Vos WM.** 2017. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of Akkermansia muciniphila. *Front Microbiol* **8**:1765.
239. **Lopetuso LR, Petito V, Graziani C, Schiavoni E, Paroni Sterbini F, Poscia A, Gaetani E, Franceschi F, Cammarota G, Sanguinetti M, Masucci L, Scaldaferrri F, Gasbarrini A.** 2018. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig Dis* **36**:56-65.
240. **Cox LM, Sohn J, Tyrrell KL, Citron DM, Lawson PA, Patel NB, Iizumi T, Perez-Perez GI, Goldstein EJC, Blaser MJ.** 2017. Description of two novel members of the family Erysipelotrichaceae: Ileibacterium valens gen. nov., sp. nov. and Dubosiella newyorkensis, gen. nov., sp. nov., from the murine intestine, and emendation to the description of Faecalibaculum rodentium. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**:1247-1254.

241. **Chia JH, Wu TS, Wu TL, Chen CL, Chuang CH, Su LH, Chang HJ, Lu CC, Kuo AJ, Lai HC, Chiu CH.** 2018. Clostridium innocuum is a vancomycin-resistant pathogen that may cause antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* **24**:1195-1199.
242. **Alexander CJ, Citron DM, Brazier JS, Goldstein EJ.** 1995. Identification and antimicrobial resistance patterns of clinical isolates of Clostridium clostridioforme, Clostridium innocuum, and Clostridium ramosum compared with those of clinical isolates of Clostridium perfringens. *J Clin Microbiol* **33**:3209-15.
243. **Ju T, Kong JY, Stothard P, Willing BP.** 2019. Defining the role of Parasutterella, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota. *ISME J* **13**:1520-1534.
244. **Kaur S, Yawar M, Kumar PA, Suresh K.** 2014. Hungatella effluvii gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium isolated from an effluent treatment plant, and reclassification of Clostridium hathewayi as Hungatella hathewayi gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**:710-8.
245. **Manzoor SE, McNulty CAM, Nakiboneka-Ssenabulya D, Lecky DM, Hardy KJ, Hawkey PM.** 2017. Investigation of community carriage rates of Clostridium difficile and Hungatella hathewayi in healthy volunteers from four regions of England. *J Hosp Infect* **97**:153-155.
246. **Liang Q, Chiu J, Chen Y, Huang Y, Higashimori A, Fang J, Brim H, Ashktorab H, Ng SC, Ng SSM, Zheng S, Chan FKL, Sung JY, Yu J.** 2017. Fecal Bacteria Act as Novel Biomarkers for Noninvasive Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **23**:2061-2070.
247. **Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, Duncan SH, Flint HJ, Harmsen HJ, Langella P, Samsom JN, Wells JM.** 2016. Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep* **6**:18507.
248. **Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D, Rey FE.** 2015. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio* **6**:e02481.
249. **Genoni A, Christophersen CT, Lo J, Coghlan M, Boyce MC, Bird AR, Lyons-Wall P, Devine A.** 2019. Long-term Paleolithic diet is associated with lower resistant starch intake, different gut microbiota composition and increased serum TMAO concentrations. *Eur J Nutr* doi:10.1007/s00394-019-02036-y.
250. **Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, Gu X, Huang Y, Zamanian-Daryoush M, Culley MK, DiDonato AJ, Fu X, Hazen JE, Krajcik D, DiDonato JA, Lusic AJ, Hazen SL.** 2015. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial

- Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* **163**:1585-95.
251. **Almeida A, Mitchell AL, Tarkowska A, Finn RD.** 2018. Benchmarking taxonomic assignments based on 16S rRNA gene profiling of the microbiota from commonly sampled environments. *Gigascience* **7**.
252. **Fung TC, Vuong HE, Luna CDG, Pronovost GN, Aleksandrova AA, Riley NG, Vavilina A, McGinn J, Rendon T, Forrest LR, Hsiao EY.** 2019. Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut. *Nat Microbiol* doi:10.1038/s41564-019-0540-4.
253. **Lagkouvardos I, Pukall R, Abt B, Foesel BU, Meier-Kolthoff JP, Kumar N, Bresciani A, Martinez I, Just S, Ziegler C, Brugiroux S, Garzetti D, Wenning M, Bui TP, Wang J, Hugenholtz F, Plugge CM, Peterson DA, Hornef MW, Baines JF, Smidt H, Walter J, Kristiansen K, Nielsen HB, Haller D, Overmann J, Stecher B, Clavel T.** 2016. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nat Microbiol* **1**:16131.
254. **Tropini C, Moss EL, Merrill BD, Ng KM, Higginbottom SK, Casavant EP, Gonzalez CG, Fremin B, Bouley DM, Elias JE, Bhatt AS, Huang KC, Sonnenburg JL.** 2018. Transient Osmotic Perturbation Causes Long-Term Alteration to the Gut Microbiota. *Cell* **173**:1742-1754 e17.
255. **Sun L, Zhang X, Zhang Y, Zheng K, Xiang Q, Chen N, Chen Z, Zhang N, Zhu J, He Q.** 2019. Antibiotic-Induced Disruption of Gut Microbiota Alters Local Metabolomes and Immune Responses. *Front Cell Infect Microbiol* **9**:99.
256. **Bordbar A, Mo ML, Nakayasu ES, Schrimpe-Rutledge AC, Kim YM, Metz TO, Jones MB, Frank BC, Smith RD, Peterson SN, Hyduke DR, Adkins JN, Palsson BO.** 2012. Model-driven multi-omic data analysis elucidates metabolic immunomodulators of macrophage activation. *Mol Syst Biol* **8**:558.
257. **Hulme HE, Meikle LM, Wessel H, Strittmatter N, Swales J, Thomson C, Nilsson A, Nibbs RJB, Milling S, Andren PE, Mackay CL, Dexter A, Bunch J, Goodwin RJA, Burchmore R, Wall DM.** 2017. Mass spectrometry imaging identifies palmitoylcarnitine as an immunological mediator during Salmonella Typhimurium infection. *Sci Rep* **7**:2786.
258. **Mukherji A, Kobiita A, Ye T, Chambon P.** 2013. Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell* **153**:812-27.
259. **Herr N, Bode C, Duerschmied D.** 2017. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front Cardiovasc Med* **4**:48.
260. **Mawe GM, Hoffman JM.** 2013. Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**:473-86.

261. **Hellstrand K, Hermodsson S.** 1987. Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *J Immunol* **139**:869-75.
262. **Idzko M, Panther E, Stratz C, Muller T, Bayer H, Zissel G, Durk T, Sorichter S, Di Virgilio F, Geissler M, Fiebich B, Herouy Y, Elsner P, Norgauer J, Ferrari D.** 2004. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *J Immunol* **172**:6011-9.
263. **Shajib MS, Khan WI.** 2015. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)* **213**:561-74.
264. **Betten A, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K.** 2001. Serotonin protects NK cells against oxidatively induced functional inhibition and apoptosis. *J Leukoc Biol* **70**:65-72.
265. **Amison RT, O'Shaughnessy BG, Arnold S, Cleary SJ, Nandi M, Pitchford SC, Bragonzi A, Page CP.** 2018. Platelet Depletion Impairs Host Defense to Pulmonary Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **58**:331-340.
266. **Yeaman MR.** 2014. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol* **12**:426-37.
267. **Uchiyama S, Sun J, Fukahori K, Ando N, Wu M, Schwarz F, Siddiqui SS, Varki A, Marth JD, Nizet V.** 2019. Dual actions of group B *Streptococcus capsular sialic acid* provide resistance to platelet-mediated antimicrobial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**:7465-7470.
268. **Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, Biciato S, Mazza EM, Macchiarulo A, Vacca C, Iannitti R, Tissi L, Volpi C, Belladonna ML, Orabona C, Bianchi R, Lanz TV, Platten M, Della Fazia MA, Piobbico D, Zelante T, Funakoshi H, Nakamura T, Gilot D, Denison MS, Guillemin GJ, DuHadaway JB, Prendergast GC, Metz R, Geffard M, Boon L, Pirro M, Iorio A, Veyret B, Romani L, Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P.** 2014. Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* **511**:184-90.
269. **Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C.** 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* **31**:814-21.
270. **Martinez Cuesta S, Rahman SA, Furnham N, Thornton JM.** 2015. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys J* **109**:1082-6.
271. **Bairam AF, Rasool MI, Alherz FA, Abunnaja MS, El Daibani AA, Gohal SA, Kurogi K, Sakakibara Y, Suiko M, Liu MC.** 2018. Sulfation of catecholamines and serotonin by SULT1A3 allozymes. *Biochem Pharmacol* **151**:104-113.

272. **Squires LN, Talbot KN, Rubakhin SS, Sweedler JV.** 2007. Serotonin catabolism in the central and enteric nervous systems of rats upon induction of serotonin syndrome. *J Neurochem* **103**:174-80.
273. **Stoddard SF, Smith BJ, Hein R, Roller BR, Schmidt TM.** 2015. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res* **43**:D593-8.
274. **SFAR.** 2018. Antibioprophylaxie en chirurgie et médecine interventionnelle.
275. **Blumenthal KG, Shenoy ES, Varughese CA, Hurwitz S, Hooper DC, Banerji A.** 2015. Impact of a clinical guideline for prescribing antibiotics to inpatients reporting penicillin or cephalosporin allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* **115**:294-300 e2.
276. **Campagna JD, Bond MC, Schabelman E, Hayes BD.** 2012. The use of cephalosporins in penicillin-allergic patients: a literature review. *J Emerg Med* **42**:612-20.
277. **Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases NCFI, Respiratory Diseases CfDC, Prevention.** 2010. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* **59**:1-36.
278. **Van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R, Thomas AR, Arnold KE, Craig AS, Mohle-Boetani J, Gershman K, Schaffner W, Petit S, Zansky SM, Morin CA, Spina NL, Wymore K, Harrison LH, Shutt KA, Bareta J, Bulens SN, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ.** 2009. Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. *N Engl J Med* **360**:2626-36.
279. **Hermanides J, Lemkes BA, Prins JM, Hollmann MW, Terreehorst I.** 2018. Presumed beta-Lactam Allergy and Cross-reactivity in the Operating Theater: A Practical Approach. *Anesthesiology* **129**:335-342.
280. **Kawakita T, Huang CC, Landy HJ.** 2018. Choice of Prophylactic Antibiotics and Surgical Site Infections After Cesarean Delivery. *Obstet Gynecol* **132**:948-955.
281. **Krishna MT, Huissoon AP, Li M, Richter A, Pillay DG, Sambanthan D, Raman SC, Nasser S, Misbah SA.** 2017. Enhancing antibiotic stewardship by tackling "spurious" penicillin allergy. *Clin Exp Allergy* **47**:1362-1373.
282. **Santé publique France.** 2019. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017.
283. **de Gunzburg J, Ghozlane A, Ducher A, Le Chatelier E, Duval X, Ruppe E, Armand-Lefevre L, Sablier-Gallis F, Burdet C, Alavoine L, Chachaty E, Augustin V, Varastet M, Levenez F, Kennedy S, Pons N, Mentre F, Andremont**

- A. 2018. Protection of the Human Gut Microbiome From Antibiotics. *J Infect Dis* **217**:628-636.
284. **Ng KM, Aranda-Diaz A, Tropini C, Frankel MR, Van Treuren W, O'Laughlin CT, Merrill BD, Yu FB, Pruss KM, Oliveira RA, Higginbottom SK, Neff NF, Fischbach MA, Xavier KB, Sonnenburg JL, Huang KC.** 2019. Recovery of the Gut Microbiota after Antibiotics Depends on Host Diet, Community Context, and Environmental Reservoirs. *Cell Host Microbe* **26**:650-665 e4.
285. **Sorbara MT, Pamer EG.** 2019. Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunol* **12**:1-9.
286. **Wischmeyer PE, McDonald D, Knight R.** 2016. Role of the microbiome, probiotics, and 'dysbiosis therapy' in critical illness. *Curr Opin Crit Care* **22**:347-53.
287. **Ruppe E, Martin-Loeches I, Rouze A, Levast B, Ferry T, Timsit JF.** 2018. What's new in restoring the gut microbiota in ICU patients? Potential role of faecal microbiota transplantation. *Clin Microbiol Infect* **24**:803-805.
288. **Wei Y, Yang J, Wang J, Yang Y, Huang J, Gong H, Cui H, Chen D.** 2016. Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis. *Crit Care* **20**:332.
289. **Limketkai BN, Hendler S, Ting PS, Parian AM.** 2019. Fecal Microbiota Transplantation for the Critically Ill Patient. *Nutr Clin Pract* **34**:73-79.
290. **Xu R, Tan C, Zhu J, Zeng X, Gao X, Wu Q, Chen Q, Wang H, Zhou H, He Y, Pan S, Yin J.** 2019. Dysbiosis of the intestinal microbiota in neurocritically ill patients and the risk for death. *Crit Care* **23**:195.
291. **McDonald D, Ackermann G, Khailova L, Baird C, Heyland D, Kozar R, Lemieux M, Derenski K, King J, Vis-Kampen C, Knight R, Wischmeyer PE.** 2016. Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. *mSphere* **1**.
292. **Rosa CP, Pereira JA, Cristina de Melo Santos N, Brancaglioni GA, Silva EN, Tagliati CA, Novaes RD, Corsetti PP, de Almeida LA.** 2019. Vancomycin-induced gut dysbiosis during *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in a mice model. *J Leukoc Biol* doi:10.1002/JLB.4AB0919-432R.
293. **Masri MFB, Mantri CK, Rathore APS, John ALS.** 2019. Peripheral serotonin causes dengue virus-induced thrombocytopenia through 5HT<sub>2</sub> receptors. *Blood* **133**:2325-2337.
294. **Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, Ismagilov RF, Mazmanian SK, Hsiao EY.** 2015. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* **161**:264-76.

295. **Baxter M, Ahmad T, Colville A, Sheridan R.** 2015. Fatal Aspiration Pneumonia as a Complication of Fecal Microbiota Transplant. *Clin Infect Dis* **61**:136-7.
296. **Giles EM, D'Adamo GL, Forster SC.** 2019. The future of faecal transplants. *Nat Rev Microbiol* doi:10.1038/s41579-019-0271-9.

## 7. Annexes

### 7.1. Annexe 1 : Analyse réalisée avec Qiime 2, phyloseq et PICRUST2

Suite au séquençage avec le kit Ion 16S Metagenomics, un export au format fastq a été réalisé.

#### 7.1.1. Analyse avec Qiime 2

```
#Import des données brutes au format FastQ
qiime tools import \
--type 'SampleData[SequencesWithQuality]' \
--input-path colon-manifest \
--output-path single-end-demux.qza \
--input-format SingleEndFastqManifestPhred33

#Filtrer les séquences de mauvaise qualité

qiime quality-filter q-score \
--i-demux single-end-demux.qza \
--o-filtered-sequences demux-filtered.qza \
--o-filter-stats demux-filter-stats.qza

#Élimination des erreurs de séquençage. Il est recommandé d'utiliser la fonction denoise-
pyro avec trim-left à 15 pour la technologie Ion Torrent. La taille de troncage des read
dépend du produit d'amplification et de la qualité.

qiime dada2 denoise-pyro \
--i-demultiplexed-seqs demux-filtered.qza \
--p-trunc-len 209 \
--p-trim-left 15 \
--o-representative-sequences rep-seqs-dada2.qza \
--o-table table-dada2.qza \
--o-denoising-stats stats-dada2.qza \
--p-n-threads 0

mv rep-seqs-dada2.qza rep-seqs.qza

mv table-dada2.qza table.qza

#Classification avec le réseau bayésien naïf « Silva 132 99 % OTUs full-length sequences »
```



```
qiime feature-classifier classify-sklearn \  
--i-classifier silva-132-99-nb-classifier.qza \  
--i-reads rep-seqs.qza \  
--o-classification taxonomy.qza
```

#Visualisation des taxa

```
qiime taxa barplot \  
--i-table table.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--m-metadata-file colon-sample-metadata.tsv \  
--o-visualization taxa-bar-plots.qzv
```

#Etape optionnelle : il existe un bug connu dans Qiime2 persistant depuis plus d'un an. Au niveau taxonomique, certaines espèces non-cultivées ont un espace en trop à la fin dans leur nom, ce qui empêche de filtrer les données. En cas d'erreur à l'étape suivante de filtrage des données, il convient d'utiliser cette commande et de continuer l'analyse avec le fichier « taxonomy-without-spaces.qza ».

```
qiime tools export \  
--input-path taxonomy.qza \  
--output-path taxonomy-with-spaces
```

```
qiime metadata tabulate \  
--m-input-file taxonomy-with-spaces/taxonomy.tsv \  
--o-visualization taxonomy-as-metadata.qzv
```

```
qiime tools export \  
--input-path taxonomy-as-metadata.qzv \  
--output-path taxonomy-as-metadata
```

```
qiime tools import \  
--type 'FeatureData[Taxonomy]' \  
--input-path taxonomy-as-metadata/metadata.tsv \  
--output-path taxonomy-without-spaces.qza
```

#Exclusion des séquences contaminantes : cyanobactéries, mitochondries, chloroplastes, eukaryotes. Ne conserver que ce qui est classé au moins au niveau du phylum.

```
qiime taxa filter-table \  
--i-table table.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-include D_1__ \  
--p-exclude Cyanobacteria,Mitochondria,Chloroplast,Eukaryota \  
--o-filtered-table table-filtered.qza
```

#Visualisation des taxa

```
qiime taxa barplot \
--i-table table-filtered.qza \
--i-taxonomy taxonomy.qza \
--m-metadata-file colon-sample-metadata.tsv \
--o-visualization taxa-bar-plots-filtered.qzv
```

#Export au format BIOM

```
qiime tools export --input-path table-filtered.qza --output-path exported
```

```
qiime tools export --input-path taxonomy.qza --output-path exported
```

A cette étape, il est nécessaire de modifier manuellement les titres des colonnes du fichier « taxonomy.tsv » en respectivement « #OTUID, taxonomy, confidence » pour pouvoir exporter les données au format BIOM à l'étape suivante.

```
biom add-metadata -i exported/feature-table.biom -o table-with-taxonomy.biom --
observation-metadata-fp exported/taxonomy.tsv --sc-separated taxonomy
```

## Demultiplexed sequence length summary

Forward Reads

<b>Total Sequences Sampled</b>	10000
2%	85 nts
9%	187 nts
25%	211 nts
<b>50% (Median)</b>	256 nts
75%	264 nts
91%	290 nts
98%	296 nts

**Figure 102. Répartition de la taille des *read* après démultiplexage.**

Les *read* de moins de 209 paires de bases ont été exclus, les *read* de plus de 209 paires de bases ont été tronqués à 209 paires de bases. Cela a induit la perte de 20 % des *read* qui ont été exclus, ainsi qu'une perte d'information sur les *read* plus longs qui ont dû être tronqués. Une taille limite à 209 paires de bases semblait présenter un bon compromis en termes de nombre de *read* exclus (si la taille choisie était trop élevée, beaucoup de *read* étaient exclus), et de perte d'information liée au nombre de *read* tronqués (si la taille choisie était trop petite, cela engendrait une perte d'information importante sur les *read*

tronqués) (Figure 102). D'après la brochure du kit Ion 16S Metagenomics, les 6 régions amplifiées ont des tailles comprises entre 209 et 295 paires de bases. Il s'agit d'une limite inhérente à l'utilisation du kit Ion 16S Metagenomics avec Qiime 2, qui est optimisé pour l'analyse de produits d'amplification établis avec une paire d'amorces, et dont la séquence des amorces est connue.

#### Analyse statistique ANCOM (par Genre bactérien, niveau l6)

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 6 \  
--o-collapsed-table table-l6.qza  
  
qiime composition add-pseudocount \  
--i-table table-l6.qza \  
--o-composition-table comp-table-l6.qza  
  
qiime composition ancom \  
--i-table comp-table-l6.qza \  
--m-metadata-file colon-sample-metadata.tsv \  
--m-metadata-column Group \  
--o-visualization l6-ancom-Group.qzv
```

#### Réalisation d'une Heatmap (par Famille bactérienne, niveau l5)

```
qiime taxa collapse \  
--i-table table-filtered.qza \  
--i-taxonomy taxonomy.qza \  
--p-level 5 \  
--o-collapsed-table table-heatmap-l5.qza  
  
qiime feature-table filter-features \  
--i-table table-heatmap-l5.qza \  
--p-min-frequency 500 \  
--o-filtered-table f-table-heatmap-l5.qza  
  
qiime feature-table heatmap \  
--i-table f-table-heatmap-l5.qza \  
--p-cluster features \  
--p-color-scheme viridis \  
--o-visualization heatmap.qzv
```

## 7.1.2. Analyse avec le package phyloseq de R

```
#Chargement des librairies
```

```
setwd("C:/pCloud/NGS/20190310 Metagenomique/Colon All")  
library(phyloseq)  
library(ggplot2)  
library(ggsci)  
theme_set(theme_classic())
```

#Chargement d'une fonction `parse_taxonomy_silva`, pour importer les données au format imposé par SILVA. Cette fonction a été écrite par Rob Gilmore (<https://gist.github.com/grabear/018e86413b19b62a6bb8e72a9adba349>).

#Chargement des fonctions provenant de `phyloseq-extended`, écrites par Mahendra Mariadassou (<https://github.com/mahendra-mariadassou/phyloseq-extended>)

J'ai ensuite édité les fonctions « `plot_composition` » et « `ggformat` » de `phyloseq-extended` pour modifier l'apparence des figures générées.

```
#Import du fichier BIOM
```

```
ngs <- import_biom("colon-silva-209bp-table-with-taxonomy.biom", parseFunction=  
parse_taxonomy_silva)
```

```
#Ajout des metadata
```

```
sampladata <- read.csv("colon-sample-metadata.csv", row.names = 1)  
sample_data(ngs) <- sampladata  
levels(sample_data(ngs)$Group) <- c("Controle", "Clinda", "EPC+Clinda", "FMT")  
sample_names(ngs) <- c("A-Controle 1", "A-Controle 2", "A-Controle 3", "A-Controle  
4", "B-Clinda 1", "B-Clinda 2", "B-Clinda 3", "B-Clinda 4", "C-EPC+Clinda 1", "C-EPC+Clinda  
2", "C-EPC+Clinda 3", "C-EPC+Clinda 4", "D-FMT 1", "D-FMT 2", "D-FMT 3", "D-FMT 4")
```

```
#Alpha diversité
```

```
plot_richness(ngs, color = "Group", measures = c("Chao1", "Shannon"), title = "") +  
geom_point(size=7, alpha=0.7) + theme(axis.title.x = element_blank(), text =  
element_text(size=18)) + scale_color_npg() + labs(col = "Groupe")
```

#Éliminer les séquences correspondant à des Familles inconnus, transformer en abondance relative (%), et ne conserver les séquences d'abondance supérieure à 0.5 %

```
ngsp <- subset_taxa(ngsp, !(Family == "Unknown"))  
ngs100 <- transform_sample_counts(ngsp, fonction(x) 100 * x/sum(x))  
ngs100 <- prune_taxa(taxa_sums(ngs100) > 0.5, ngs100)
```

```
ngs100 <- transform_sample_counts(ngs100, function(x) 100 * x/sum(x))

#Phylum
plot_composition(ngs100, "Kingdom","Bacteria","Phylum", numberOfTaxA : 10, fill =
"Phylum")

#Bacteroidetes
plot_composition(ngs100, "Phylum","Bacteroidetes","Family", numberOfTaxA : 10, fill
= "Family")

#Firmicutes
plot_composition(ngs100, "Phylum","Firmicutes","Family", numberOfTaxA : 10, fill =
"Family")
plot_composition(ngs100, "Phylum","Firmicutes","Genus", numberOfTaxA : 8, fill =
"Genus")

#Proteobacteria
plot_composition(ngs100, "Phylum","Proteobacteria","Family", numberOfTaxA : 10,
fill = "Family")
```

### 7.1.3. Analyse avec PICRUST2

```
qiime feature-table filter-features \  
--i-table table.qza \  
--p-min-frequency 500 \  
--o-filtered-table feature-frequency-filtered-table.qza
```

```
qiime tools export \  
--input-path feature-frequency-filtered-table.qza \  
--output-path picrust
```

```
qiime tools export \  
--input-path rep-seqs.qza \  
--output-path picrust
```

```
mkdir picrust2_out_pipeline  
cd picrust2_out_pipeline
```

```
place_seqs.py -s ../seqs.fna -o out.tre -p 6 \  
--intermediate intermediate/place_seqs
```

```
hsp.py -i 16S -t out.tre -o marker_predicted_and_nsti.tsv.gz -p 6 -n  
hsp.py -i EC -t out.tre -o EC_predicted.tsv.gz -p 6
```

```
metagenome_pipeline.py -i ../table.biom -m marker_predicted_and_nsti.tsv.gz -f  
EC_predicted.tsv.gz \  
-o EC_metagenome_out --strat_out
```

```
convert_table.py EC_metagenome_out/pred_metagenome_contrib.tsv.gz \  
-c contrib_to_legacy \  
-o EC_metagenome_out/pred_metagenome_contrib.legacy.tsv.gz
```

```
pathway_pipeline.py -i EC_metagenome_out/pred_metagenome_contrib.tsv.gz \  
-o pathways_out -p 6
```

```
add_descriptions.py -i EC_metagenome_out/pred_metagenome_unstrat.tsv.gz -m EC \  
-o EC_metagenome_out/pred_metagenome_unstrat_descrip.tsv.gz
```

```
add_descriptions.py -i pathways_out/path_abun_unstrat.tsv.gz -m METACYC \  
-o pathways_out/path_abun_unstrat_descrip.tsv.gz
```

## 7.2. Annexe 2 : Dépôt des séquences sur SRA

### **SRA submission SUB6255554, "Colonization by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a murine model., Sep 04 '19"**

sra@ncbi.nlm.nih.gov <sra@ncbi.nlm.nih.gov>  
To: remi.leguern@gmail.com

6 September 2019 at 17:13

Dear Remi Le Guern,

This is an automatic acknowledgment that your recent submission to SRA database has been successfully processed and will be released on the date specified.

Please reference PRJNA563864 in your publication. This BioProject accession number is provided above in lieu of SRP and should be used in your publication as it will allow better searching in Entrez.

SRA accession: PRJNA563864  
Temporary Submission ID: SUB6255554  
Release date: 2020-10-04

Your SRA records will be accessible with the following link after the indicated release date:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA563864>

Send questions and update requests to [sra@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:sra@ncbi.nlm.nih.gov); include the SRA accession PRJNA563864 in any correspondence.

Regards,

NCBI SRA Submissions Staff  
Bethesda, Maryland USA

## 7.3. Annexe 3 : Article Microbiology Resource Annoncements

**Title:** Draft genome sequences of two carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures

### Authors names & affiliations

Rémi Le Guern<sup>1,2</sup>, Teddy Grandjean<sup>1</sup>, Karine Faure<sup>1,3</sup>, Marvin Bauduin<sup>1</sup>, Eric Kipnis<sup>1,4</sup>, Rodrigue Dessein<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> : Univ. Lille, EA 7366 - Recherche translationnelle : relations hôte pathogènes, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> : CHU Lille, Institut de Microbiologie, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> : CHU Lille, Unité de Maladies Infectieuses, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> : CHU Lille, Service de Réanimation Chirurgicale, F-59000 Lille, France

### ABSTRACT

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* represents an emerging public health issue. Here, we present the draft whole-genome sequences of *K. pneumoniae* clinical strains KPL0.1 (OXA-48 carbapenemase) and KPL0.2 (NDM-1 carbapenemase). These genome sequences should help in investigating pathophysiological mechanisms of digestive colonization or infection with these highly resistant bacteria.

### ANNOUNCEMENT

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are resistant to most beta-lactams, including last-line options such as carbapenems, and are an emerging public health issue (1). *Klebsiella pneumoniae* colonizes the human gastrointestinal tract and can persist in the hospital environment, and outbreaks of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* are frequently described (2). In France, the most frequently identified carbapenemases are OXA-48 (86% of the CPE) and NDM (9% of the CPE) (3). Two strains of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* were isolated in the Lille University Teaching Hospital (CHU Lille, France), KPL0.1 (producing OXA-48 carbapenemase) and KPL0.2 (producing NDM-1 carbapenemase). Both strains were isolated from blood cultures using



the Virtuo automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and identified by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA). KPL0.1 was isolated from a 77-year-old patient following digestive surgery, and KPL0.2 came from an 84-year-old patient with a urinary tract infection.

The DNA of each isolate was extracted using a QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany), and quality control was performed using a Qubit v3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Libraries were prepared using the Nextera XT DNA Library prep kit (Illumina, San Diego, CA), followed by paired-end (2 × 150-bp) sequencing on a HiSeq platform (Illumina). Genome coverage was about 650× for each isolate. Paired reads were filtered, and Nextera adapters were removed using Trimmomatic on a Galaxy server using default settings (4). Processed reads were de novo assembled with Unicycler. Genomes were annotated using the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v4.5 (5).

The draft genome of KPL0.1 consists of 5,825,863 bp and has a mean G+C content of 56.70%. A total of 5,628 protein-coding genes were annotated, including 92 RNA-coding genes and 75 tRNAs, and the remaining genes were annotated as hypothetical proteins. KPL0.1 belongs to sequence type 307 (ST-307) and possesses the KL102 capsule locus (6). The following resistance genes were predicted using ResFinder v3.0 (7): five beta-lactam resistance genes (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>SHV-28</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>), four aminoglycoside resistance genes [*aac(3)-IIa*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(6')-Ib-cr*], five fluoroquinolone resistance genes [*qnrS1*, *qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*], and individual antimicrobial resistance genes (fosfomycin, *fosA*; phenicol, *catB4*; sulfonamide, *sul2*; trimethoprim, *dfrA14*; tetracycline, *tetA*).

The draft genome of KPL0.2 consists of 5,741,089 bp with a mean G+C content of 56.94%. A total of 5,570 protein-coding genes were annotated, including 93 RNA-coding genes and 79 tRNAs, and the remaining genes were annotated as hypothetical proteins. KPL0.2 belongs to ST-147 and possesses the KL64 capsule locus. The following resistance genes were predicted: five beta-lactam resistance genes (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>), four aminoglycoside resistance genes [*aac(3)-IIa*, *strA*, *aph(6)-Id*, *aac(6')-Ib-cr*],

four fluoroquinolone resistance genes [*qnrB1*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*], and individual antimicrobial resistance genes (fosfomycin, *fosA*; phenicol, *catB4*, sulfonamide, *sul1*; trimethoprim, *dfrA1*; tetracycline, *tetA*).

ST-147 was identified as one of the three major STs of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in a worldwide study; ST-147 is usually recovered from India, Italy, and Greece (8). ST-307 is described as highly prevalent in Italy (9). Overall, these two strains are representative of the carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates in Europe. Further studies are warranted to investigate the pathophysiological mechanisms of digestive colonization or infection with these highly resistant bacteria.

**Data availability.** These two draft whole-genome shotgun projects have been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession numbers QHMA00000000 (KPL0.1) and PYBH00000000 (KPL0.2). The versions described in this paper are QHMA01000000 (KPL0.1) and PYBH01000000 (KPL0.2). The SRA accession number is SRP155589.

## REFERENCES

1. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17:1791-8.
2. **Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL.** 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 25:682-707.
3. **Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P.** 2017. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill* 22.
4. **Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Gruning BA, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltemann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A, Blankenberg D.** 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* doi:10.1093/nar/gky379.
5. **Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y.** 2008. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition

among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1028-33.

6. **Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, Holt KE.** 2016. Identification of Klebsiella capsule synthesis loci from whole genome data. *Microb Genom* 2:e000102.

7. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV.** 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67:2640-4.

8. **Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD.** 2013. Surveillance and molecular epidemiology of Klebsiella pneumoniae isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 57:130-6.

9. **Bartolini A, Basso M, Franchin E, Menegotto N, Ferrari A, De Canale E, Andreis S, Scaggiante R, Stefani S, Palu G, Parisi SG.** 2017. Prevalence, molecular epidemiology and intra-hospital acquisition of Klebsiella pneumoniae strains producing carbapenemases in an Italian teaching hospital from January 2015 to September 2016. *Int J Infect Dis* 59:103-109.

## 7.4. Annexe 4 : Article Antimicrobial Agents Chemotherapy

### The Impact of Timing of Antibiotics on Digestive Colonization with Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in a Murine Model

#### Author's names & affiliations :

Rémi Le Guern<sup>1,2</sup>, Teddy Grandjean<sup>1</sup>, Marvin Bauduin<sup>1</sup>, Martin Figeac<sup>3</sup>, Guillaume Millot<sup>1</sup>, Aurore Loquet<sup>1</sup>, Karine Faure<sup>1,4</sup>, Eric Kipnis<sup>1,5</sup>, Rodrigue Dessein<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> : Univ. Lille, EA 7366 - Recherche translationnelle: relations hôte pathogènes, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> : CHU Lille, Institut de Microbiologie, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> : Univ de Lille, Plate-forme de Génomique Fonctionnelle et Structurale, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> : CHU Lille, Unité de Maladies Infectieuses, F-59000 Lille, France

<sup>5</sup> : CHU Lille, Service de Réanimation Chirurgicale, F-59000 Lille, France

#### ABSTRACT

While antibiotic use is a risk factor of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) acquisition, the importance of timing of antibiotic administration relative to CPE exposure remains unclear. In a murine model of gut colonization with NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, a single injection of clindamycin within at most one week before or after CPE exposure induced colonization persisting up to 100-days. Timing of antibiotic administration relative to CPE exposure may be relevant to infection control and antimicrobial stewardship approaches.

**Running title:** Timing of antibiotics relative to CPE exposure

**Keywords:** Carbapenemase, Gut Microbiota, NDM-1, *Klebsiella pneumoniae*, Murine model

**Abbreviations:** CPE = carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

## ARTICLE

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are an emerging public health issue, considered a critical priority by the World Health Organization (1). Among CPE, New Delhi metallo-beta-lactamase-1-(NDM-1)-producing *Enterobacteriaceae* are particularly preoccupying. Indeed, NDM-1 confers resistance to most  $\beta$ -lactams, including carbapenems, and has spread worldwide (2), raising fears of severe infections without therapeutic options (3).

In the hospital setting, contact with a CPE-colonized patient or prior antibiotic use are major risk factors for CPE acquisition (4, 5). Among antibiotics, anti-anaerobes (e.g., piperacillin-tazobactam or clindamycin) seem particularly at risk (6, 7). While antibiotics are a known risk factor, the role of the timing of CPE exposure relative to antibiotic administration is unclear. We describe a murine model of gut colonization with NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* following a single administration of clindamycin and assess the effects of timing of clindamycin administration relative to CPE exposure on effective CPE colonization.

The French Ethical Committee for Animal Experimentation approved this study (APAFIS #7166). Seven-week-old C57BL/6 male mice housed under specific pathogen-free conditions and a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1-carbapenemase (8) were used.

First, we validated the murine model of CPE gut colonization. Mice were divided into four groups with or without 24-hour CPE exposure in drinking water (107 CFU/mL at day 0) and/or intraperitoneal clindamycin (200 $\mu$ g) (Figure 1). CPE load was evaluated by plating stool samples onto selective medium (lysogeny broth agar with 32 mg/L cefotaxime and 6 mg/L vancomycin). In mice exposed to both CPE and clindamycin, 8.3 to 8.7 log CPE/g stools were recovered at Days 7 through 14 (Figure 1A). In mice exposed to CPE without clindamycin, CPE load in stools briefly peaked at 5.6 log of CPE/g of stool at Day 2 but fell below detection threshold from Day 7 onwards. Without clindamycin administration, there was no effective colonization.

Microbiota alterations observed with CPE exposure and/or clindamycin injection were analyzed by next-generation sequencing (n=2 per group) of ileal samples taken at

Day 7 by 16S rDNA gene amplification using the Ion 16S™ Metagenomics kit and sequencing on the Ion PGM System (Life Technologies, Carlsbad, USA). Bioinformatic analyses were performed using QIIME2 (9) and R phyloseq package (10). CPE exposure without clindamycin did not alter gut microbiota compared to controls: more than 90% of 16S rDNA sequences were classified as *Firmicutes*, either *Clostridiales* or *Lactobacilliales* (Figure 1B, 1C). Clindamycin administration without CPE exposure led to an increase in *Bacteroidetes* (approximately 45%) and *Proteobacteria*, mainly *Enterobacteriales* (up to 26%). Clindamycin administration with CPE exposure resulted in a major increase in *Proteobacteria* (up to 84%), mostly *Enterobacteriales* (up to 76%).

To determine CPE colonization localization along the intestinal tract, intraluminal contents from terminal ileum, caecum, colon, and stool samples were taken at Day 7 in five CPE-exposed and clindamycin-treated mice. A higher load of CPE/g of digestive contents was found in the caecum ( $8.2 \log \pm 0.5$ ), colon ( $8.0 \log \pm 0.4$ ) and feces ( $8.1 \log \pm 0.2$ ) compared to ileum ( $5.0 \log \pm 0.8$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 1D).

Finally, to determine the effects of timing of clindamycin administration relative to CPE exposure on effective CPE colonization, CPE exposed mice received clindamycin at different days before or after CPE exposure (Figure 2). Stool samples were collected twice weekly for a month, then once weekly for two months to assess CPE load. Clindamycin injection at most one week before or after CPE exposure was necessary to achieve gut colonization (Figure 2). Indeed, when clindamycin was injected at either Days-21/-14 or Days+14/+21, the mice were not durably colonized, despite CPE exposure at Day-0.

The timing of antibiotics relative to CPE exposure is a key factor of effective CPE colonization. In our murine model, a single clindamycin injection within a week before or after CPE exposure induced gut colonization for at least 100 days. Remarkably, in a study predating the “omics” era, van der Waaij et al. also demonstrated 2-week selective window for persistent digestive colonization with streptomycin/neomycin resistant Gram-negative bacteria following oral administration of these antibiotics (11). Other murine models of digestive CPE colonization have been described. In one model, when mice were exposed to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* three days after the first administration of clindamycin, CPE load initially attained  $10 \log$  CFU/g of stool, then

decreased to 5-6 log CFU/g of stool five days after the last clindamycin injection (6). In another model, in which mice were exposed to NDM-1-producing *Escherichia coli* four days after the first administration of vancomycin, metronidazole, and ceftriaxone (12), CPE load in stools was 2-3 log CFU/g (close to the detection limit) twenty days after ending antimicrobials. In our model, with a single injection of clindamycin, CPE load over 7 log CFU/g of stool persisted for 100 days. Furthermore, our study is original in assessing not only the window of opportunity for colonization after administration of antibiotics, but also before and showing that this opportunity exists both one week before and after antibiotics.

Gut microbiota analysis confirms that CPE exposure alone does not lead to colonization since *Enterobacteriales*, which CPE belong to, remained undetected seven days after exposure, similar to unexposed controls. Seven days after clindamycin administration, there was a marked decrease in *Clostridiales* from over 75% to 30% at most, an increase in Bacteroidetes (45%), and an appearance of *Enterobacteriales* (23%), even without CPE exposure. *Enterobacteriales* are resistant to clindamycin; therefore their expansion can be enhanced by clindamycin, as described previously in a murine model of *Clostridium difficile* infection (13). Interestingly, in their pre-“omics” demonstration of a selective window for digestive colonization induced by antibiotics, van der Waaij et al., using germ-free mice recolonized with the flora from mice in which colonization was no longer possible late after antibiotic exposure, found (in preliminary experiments) that this flora conferring what was termed “colonization resistance” was characterized by a major proportion of *Clostridiales* (11). A more recent study using conventional culture methods showed that antibiotics allowed colonization by the ESBL *E. coli* strain ST 131 regardless of effect on *Bacteroidales* (clindamycin) or not (cefuroxime, dicloxacillin) (14). These results suggest that the timing of antimicrobials relative to CPE exposure in providing ecologic space for implantation and expansion is an important parameter to consider.

Clinical studies focusing on healthy travelers at high risk of being exposed to CPE or other multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* found a high rate of acquisition of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (15). Although initially at 51%, colonization was short-lived as only 5% remained colonized three months after their return. In this

population of healthy travelers, only 10% reported antibiotic use during their trip. While studies of acquisition and persistence of colonization by NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* after travel to endemic countries concern few subjects, larger studies concentrating on extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* show that a significant risk factor is the use of antimicrobials during travel (16). These studies suggest that a healthy gut microbiota protects travelers exposed to CPE or other multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from long-term colonization (17).

Antibiotic use is a major risk factor of CPE colonization (5). In a context of up to 50% of antibiotic misuse (18, 19), avoiding an epidemic spread of CPE requires antimicrobial stewardship approaches. Our study suggests that more than the general notion of prior antibiotic use, it is the timing of antibiotics relative to CPE exposure that may be the main factor explaining colonization with CPE. This could be a crucial parameter to take into account in infection control and antimicrobial stewardship strategies. Indeed, our study shows there may be a specific window of opportunity for CPE colonization relative to antibiotics administration.

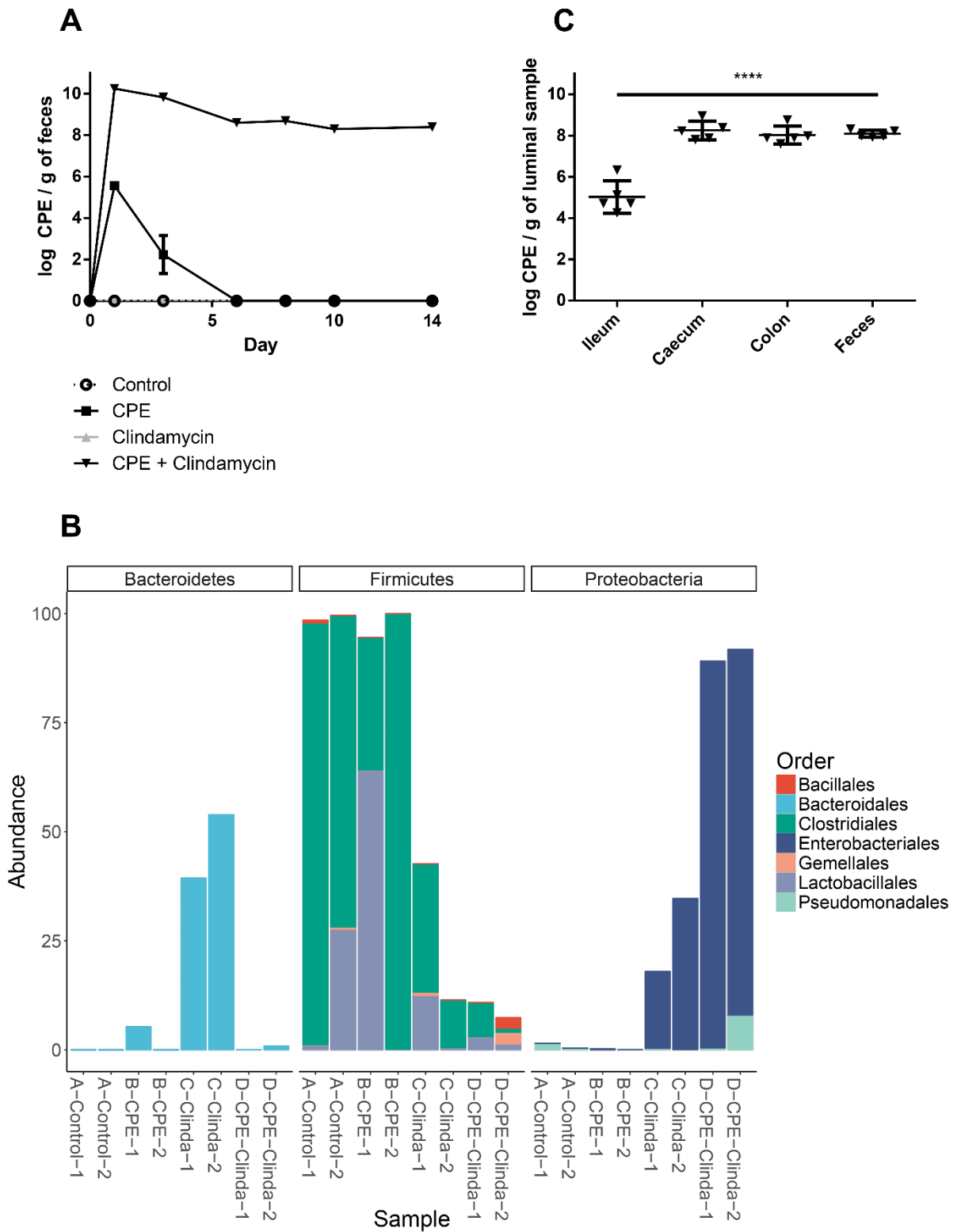
### **Acknowledgments**

We would like to thank Cécile Villenet and Shéhérazade Sebda for their help to process 16S rDNA metagenomic sequencing samples.

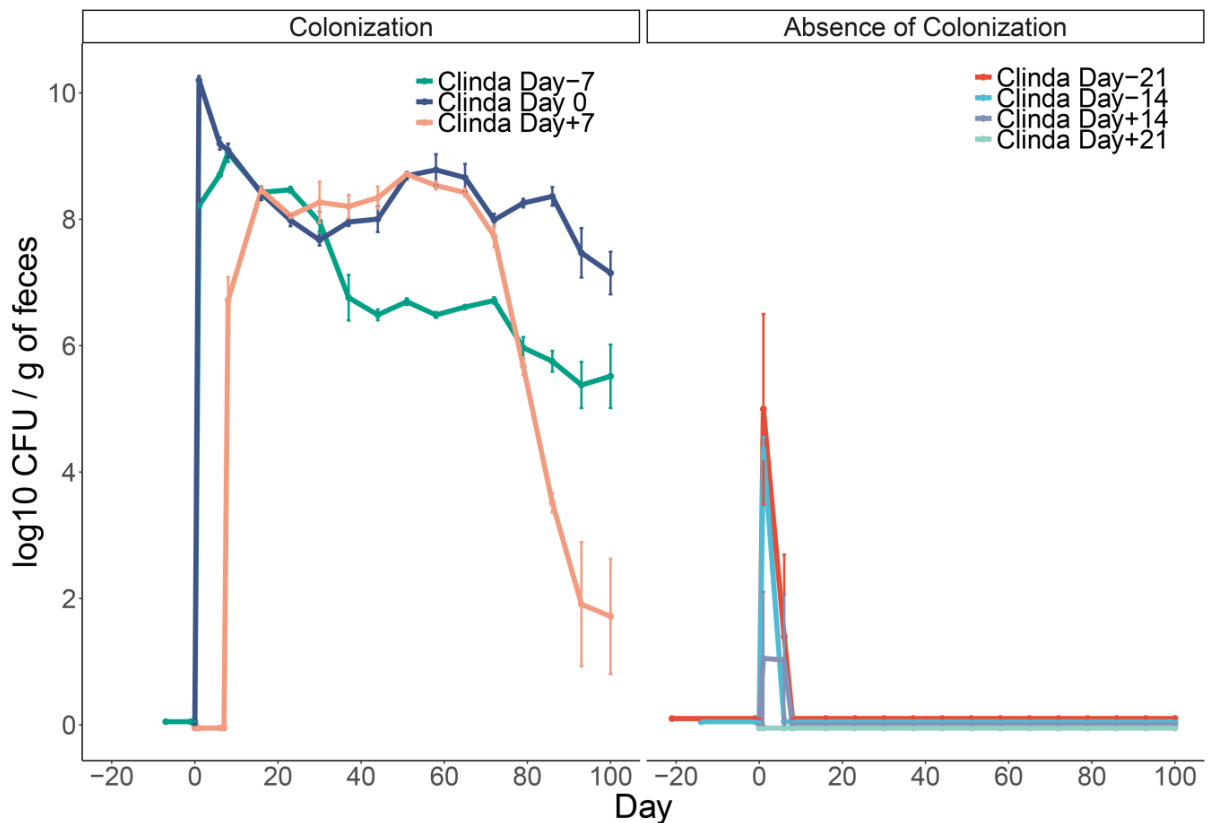
**Figure 1. Gut microbiota alteration using clindamycin is a prerequisite for durable colonization with carbapenemase-producing enterobacteria (CPE) alongside the intestinal tract.** (A) Quantification of CPE load in stools depending on clindamycin administration and CPE exposure, 5 mice per group. Control group: no CPE exposure and no clindamycin; CPE exposure group: CPE in drinking water for the first 24 hours (Day 0) and no clindamycin; clindamycin group: no CPE exposure and intraperitoneal injection of clindamycin at Day 0; CPE + clindamycin group: CPE in drinking water for the first 24 hours (Day 0) and intraperitoneal injection of clindamycin at Day 0. (B-C) Relative abundance of bacterial phyla in terminal ileum samples using next generation 16S rDNA sequencing. Same groups than in experiment 1A, 2 mice per group. (D) Quantification of CPE load along the gastro-intestinal tract. Five mice were exposed



to CPE in drinking water for the first 24 hours (Day 0) associated with intraperitoneal injection of clindamycin at Day 0. Luminal samples were taken at Day 14.



**Figure 2. Effective CPE colonization depends on the timing of clindamycin administration in relation to CPE exposure.** Twenty-one mice were all exposed to CPE for 24-hours in drinking water (Day 0). Clindamycin was injected once at one of the following timepoints before or after CPE exposure: Day-21, Day-14, Day-7, Day-0, Day+7, Day+14 or Day+21.



## REFERENCES

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318-327.
2. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014:249856.

3. **Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, Alzarouni A, Farahat Y, Chong TM, Yin WF, Chan KG, Li J, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL.** 2015. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 5:15082.
4. **Schwartz-Neiderman A, Braun T, Fallach N, Schwartz D, Carmeli Y, Schechner V.** 2016. Risk Factors for Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CP-CRE) Acquisition Among Contacts of Newly Diagnosed CP-CRE Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37:1219-25.
5. **Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y.** 2008. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1028-33.
6. **Perez F, Pultz MJ, Endimiani A, Bonomo RA, Donskey CJ.** 2011. Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2585-9.
7. **Hilliquin D, Le Guern R, Thepot Seegers V, Neulier C, Lomont A, Marie V, Legeay C, Merrer J, Lepelletier D, Rogues AM, Grandbastien B, Lucet JC, Zahar JR.** 2018. Risk factors for acquisition of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* among contact patients: a multicentre study. *J Hosp Infect* 98:253-259.
8. **Le Guern R, Grandjean T, Faure K, Bauduin M, Kipnis E, Dessein R.** 2018. Draft genome sequences of two carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from blood cultures. *Microbiol Resour Announc* 7:e01057-18.
9. **Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R.** 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335-6.
10. **McMurdie PJ, Holmes S.** 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8:e61217.
11. **van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk L-v.** 1971. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* 69:405-11.

12. **Mahieu R, Cassisa V, Hilliquin D, Coron N, Pailhories H, Kempf M, Joly-Guillou ML, Eveillard M.** 2017. Impact of faecal microbiota transplantation on mouse digestive colonization with two extensively resistant bacteria. *J Infect* 75:75-77.
13. **Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, Ubeda C, Xavier J, Pamer EG.** 2012. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect Immun* 80:62-73.
14. **Hertz FB, Lobner-Olesen A, Frimodt-Moller N.** 2014. Antibiotic selection of *Escherichia coli* sequence type 131 in a mouse intestinal colonization model. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6139-44.
15. **Ruppe E, Armand-Lefevre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, Goujon C, Ralaimazava P, Campa P, Girard PM, Wyplosz B, Vittecoq D, Bouchaud O, Le Loup G, Pialoux G, Perrier M, Wieder I, Moussa N, Esposito-Farese M, Hoffmann I, Coignard B, Lucet JC, Andremont A, Matheron S.** 2015. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis* 61:593-600.
16. **Kantele A, Mero S, Kirveskari J, Laaveri T.** 2016. Increased Risk for ESBL-Producing Bacteria from Co-administration of Loperamide and Antimicrobial Drugs for Travelers' Diarrhea. *Emerg Infect Dis* 22:117-20.
17. **Ruppe E, Andremont A, Armand-Lefevre L.** 2018. Digestive tract colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae in travellers: An update. *Travel Med Infect Dis* 21:28-35.
18. **Dellit TH, Owens RC, McGowan JE, Jr., Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM.** 2007. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis* 44:159-77.
19. **Chua KP, Fischer MA, Linder JA.** 2019. Appropriateness of outpatient antibiotic prescribing among privately insured US patients: ICD-10-CM based cross sectional study. *BMJ* 364:k5092.