

# UNIVERSITÉ DE LILLE

UFR3S-MÉDECINE

Année : 2025

## THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Développement et validation d'un protocole de séquençage pour  
l'analyse du microbiote intestinal en réanimation**

Présentée et soutenue publiquement le 24/09/2025 à 16 heures  
au Pôle Formation  
par **Nicolas GEOFFRE**

---

### JURY

**Président :**

**Monsieur le Professeur Rodrigue DESSEIN**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Éric KIPNIS**

**Monsieur le Docteur Vincent HUIN**

**Directeur de thèse :**

**Monsieur le Docteur Rémi LE GUERN**

---



## AVERTISSEMENT

L'université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.



## Liste des sigles utilisés :

AAC	Aminoglycoside acetyltransferase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGCC	Acide gras à chaîne courte
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANT	Aminoglycoside nucleotidyltransferase
APH	Aminoglycoside phosphotransferase
API	Appareils et Procédés d'Identification
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
ASPEN	American Society for Parenteral and Enteral Nutrition
BLSE	$\beta$ -lactamases à spectre étendu
C3G	Céphalosporines de 3ème génération
CTX-M	Céfotaximase de type M
DMS	Diméthyle sulfate
emPCR	PCR en émulsion
EOPS	Exempt d'organismes pathogènes spécifiques
EPC	Entérobactéries productrices de carbapénémases
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
NDM	New Delhi métallo- $\beta$ -lactamase
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONT	Oxford Nanopore Technologies
OXA-48	Oxacillinase du groupe 48
PacBio	Pacific Biosciences

PAPS	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PGE2	Prostaglandine E2
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SHV1	Sulfhydryl Variable de type 1
SMRT	Single-Molecule Real-Time sequencing
SOLiD	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
TEM	Temoniera
TGS	Third Generation Sequencing
TLR	Récepteurs Toll-like
TMF	Transplantation du microbiote fécal
VIM	Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase

# Table des matières

Table des matières .....	7
Introduction.....	10
Le microbiote intestinal.....	10
Définition .....	10
Composition .....	10
Transmission et évolution .....	12
Fonctions .....	14
Dysbiose, colonisations et infections digestives.....	18
Colonisation à <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	19
Microbiote en réanimation.....	22
Les fibres alimentaires .....	23
Définition .....	23
Classification.....	24
Rôles.....	25
Relation entre fibres et microbiote.....	27
Usage des fibres en réanimation .....	28
Techniques classiques d'identification bactérienne.....	29
Culture bactérienne.....	29
Examen direct .....	29
Tests biochimiques .....	30
MALDI-TOF.....	30

Techniques de biologie moléculaire .....	31
ARN 16S et autres gènes cibles .....	31
1ere génération.....	32
2eme génération - NGS .....	34
3eme génération - TGS.....	39
Focus sur le séquençage Nanopore.....	40
Principe général .....	40
Différents types de nanopores .....	41
Séquençage Oxford Nanopore (ONT).....	42
Séquençage 16S : ONT Vs Illumina.....	43
Objectif .....	45
Matériel et méthode .....	46
Modèle murin.....	46
Patients .....	46
Présentation .....	46
Echantillonnage du microbiote .....	47
Extraction et préparation des échantillons.....	47
Kits .....	47
Ajout des codes-barres .....	47
Amplification.....	47
Séquençage nanopore .....	48
Cellules de flux.....	48



Contrôle de qualité .....	48
Appel de bases (basecalling) et assignation .....	48
Résumé des protocoles d'analyse murins .....	49
Résumé des protocoles d'analyse humains .....	49
Protocole E-Swab .....	49
Protocole Selles .....	49
Résultats.....	51
Comparaison des cellules de flux Flongle et MinION dans un modèle de microbiote murin. ....	51
Etude du microbiote fécal humain en réanimation.....	53
Rendement des échantillons E-Swab .....	53
Rendement des échantillons de fèces .....	55
Discussion .....	57
Technologie de séquençage .....	57
Méthode d'échantillonnage .....	57
Cellule de flux.....	59
Pipelines bio-informatiques .....	61
Limites de l'étude .....	61
Conclusion.....	63
Bibliographie.....	64

# Introduction

## Le microbiote intestinal

### *Définition*

Le microbiote désigne l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, champignons, archées et protistes) qui colonisent une niche écologique donnée de l'organisme. Chez l'Homme, les microbiotes cutanés, génitaux et surtout digestifs sont les mieux décrits. Le microbiote intestinal s'étend de l'estomac au colon et constitue un écosystème complexe de symbiose mutualiste, spécifique à chaque individu.

Les estimations de la taille du microbiote ont beaucoup varié avec l'amélioration des techniques scientifiques. Le métagénome intestinal comporte un total de 3,3 millions de gènes contre environ 22 000 pour le génome humain.<sup>1</sup> Les données actualisées font état d'un ratio bactéries/cellules humaines de 1 pour 1, loin du chiffre de 10 pour 1 longtemps admis.

### *Composition*

Le microbiote intestinal est principalement constitué de micro-organismes commensaux<sup>2</sup> :

- Bactéries : Elles représentent la majorité des micro-organismes du tube digestif avec plus de 3000 espèces décrites.<sup>3</sup>
- Virus : En particulier des bactériophages.
- Champignons : Tels que *Candida albicans*, présents en faible abondance.
- Archées : Notamment des méthanogènes.
- Protistes : Peu nombreux, mais parfois impliqués dans des fonctions spécifiques ou pathologiques.

Le microbiote représente un équilibre entre ces différents composants. Il évolue tout au long de la vie et est influencé par de nombreux facteurs tels que l'alimentation, l'environnement, les traitements antibiotiques ou les maladies.<sup>4</sup> La dysbiose désigne la rupture de cet équilibre, caractérisée par une altération de la composition du microbiote retentissant sur son fonctionnement.

De nombreuses études ont proposé une cartographie de la composition du microbiote avec une résolution croissante, en particulier de sa composition bactérienne.<sup>5-7</sup> Deux embranchements, ou phylum, se partagent l'essentiel du volume bactérien : Bacillota (anciennement dénommées Firmicutes) et Bacteroidota (Bacteroidetes). D'autres, comme les Actinomycetota (Actinobacteria) et les Pseudomonadota (Proteobacteria), présentent une très grande diversité taxonomique mais une moindre abondance relative (Figure 1). On constate par ailleurs une très grande variété de composition microbienne en fonction des régions, due aux particularités locales de l'environnement et des régimes alimentaires (Figure 2).

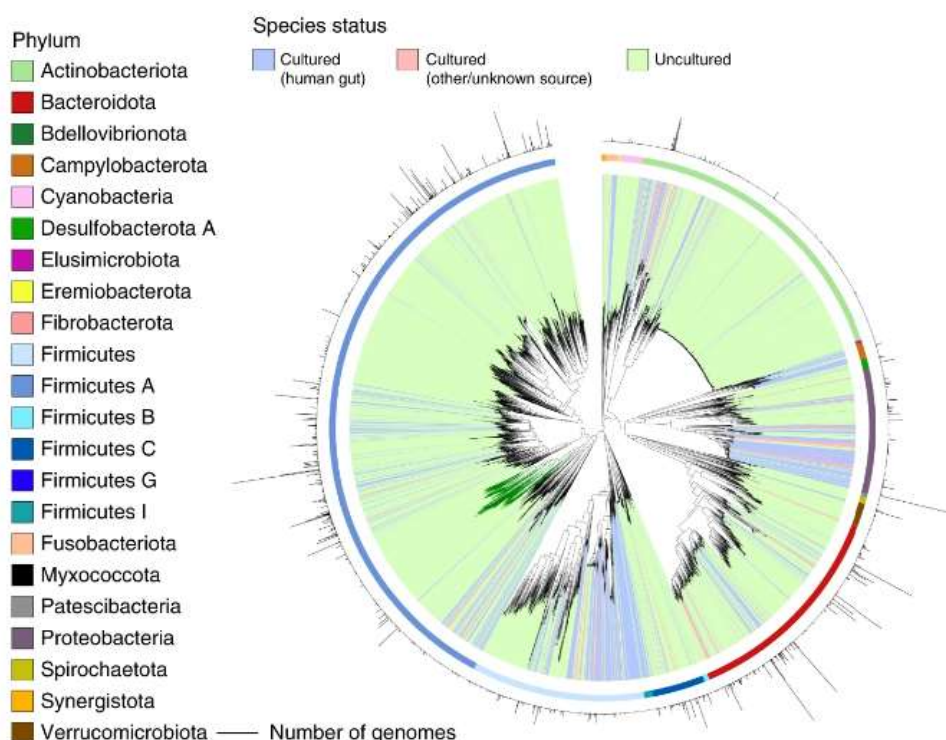
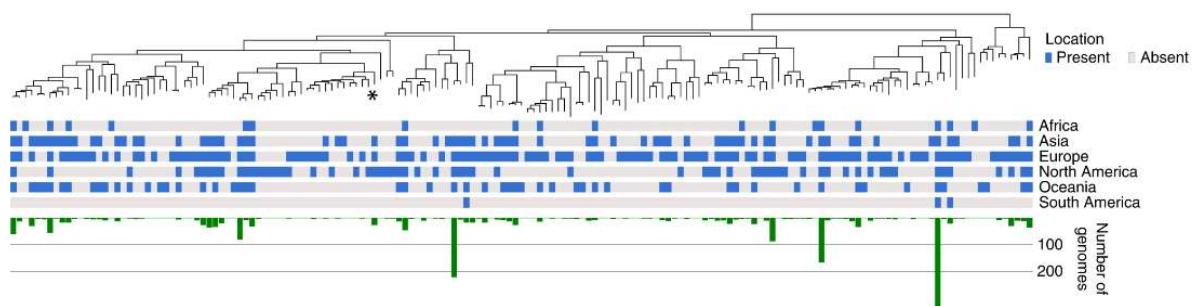


Figure 1 : Arbre phylogénétique des 4616 espèces bactériennes identifiées dans le microbiote humain.

Almeida et al. *Nat Biotechnol*, 2020<sup>5</sup>.



*Figure 2 : Arbre phylogénétique des espèces de l'ordre des Comantemales (la plus grande lignée phylogénétique représentée exclusivement par des espèces non cultivées) et prévalence dans les microbiotes de différentes populations. Almeida et al. Nat Biotechnol, 2020<sup>5</sup>.*

La diversité d'un environnement complexe tel que le microbiote peut se mesurer suivant trois types d'indices : alpha, bêta et gamma.<sup>8</sup> La diversité alpha est une mesure locale de la diversité d'un unique site échantillonné (rectal, colique, fèces, ...), elle prend en compte la diversité des espèces présentes et leurs abondances relatives. Les indices alpha les plus fréquemment utilisés sont l'indice de Shannon et l'indice de Simpson. La diversité bêta est une mesure relative de la diversité qui compare plusieurs échantillons. Elle peut mesurer des changements ou des différences dans la composition du microbiote, que ce soit entre individus, sites corporels ou conditions expérimentales. Les principaux indices bêta sont l'indice de Bray-Curtis et la distance UniFrac. L'indice gamma représente la diversité à l'échelle d'un écosystème entier, le tube digestif pris dans sa globalité. En pratique, il n'est que rarement employé dans l'étude du microbiote.

### *Transmission et évolution*

*In utero* le fœtus est stérile, le microbiote de l'enfant se met en place dès sa venue au monde.<sup>9</sup> Il est issu de l'environnement infantile immédiat, en particulier du microbiote maternel, dont le transfert va dépendre du type d'accouchement : voie basse ou césarienne. En effet, si 74% du microbiote post-natal est issu de la mère lors d'un accouchement par voie basse, seul 13% en sont issus après une césarienne avec

une prédominance du microbiote cutané maternel.<sup>10</sup> Une diversité microbienne plus importante est aussi rapportée à 4 jours de vie chez les enfants nés par voie basse, néanmoins ces différences sont largement réduites dès 1 mois de vie et ne sont plus significatives à 6 mois.<sup>11</sup> Plusieurs études ont montré une corrélation entre mode de délivrance et pathologies infantiles<sup>12</sup> (allergies alimentaires, asthme, diabète, maladies auto-immunes et métaboliques) et ont souligné le potentiel rôle du microbiote post-natal. La littérature rapporte par ailleurs une contribution paternelle au microbiote infantile suivant une chronologie similaire à la transmission maternelle post-césarienne.<sup>13</sup>

La diversité microbienne évolue ensuite tout au long de la vie des individus (Figure 3). Elle augmente progressivement jusqu'à atteindre un équilibre relativement stable à la sortie de l'enfance.<sup>4</sup> Des perturbations internes ou externes comme une infection gastro-intestinale ou la prise d'antibiotiques peuvent momentanément déséquilibrer le microbiote auquel cas l'équilibre est progressivement rétabli via des mécanismes similaires à l'établissement initial du microbiote.

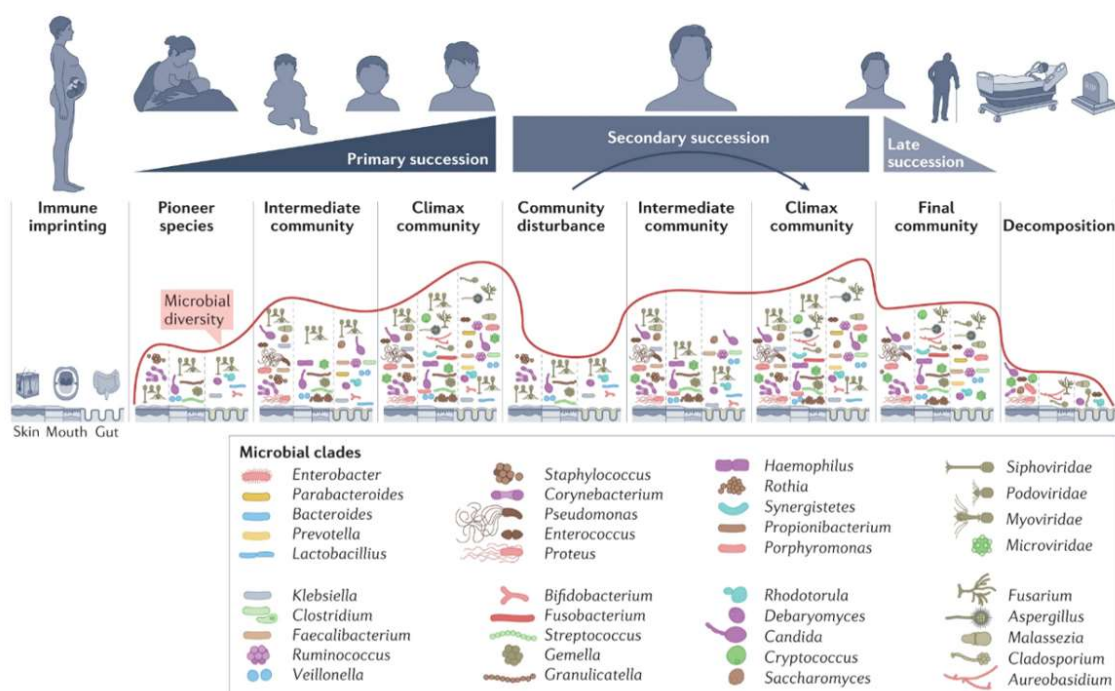


Figure 3 : Evolution de la diversité du microbiote intestinal avec l'âge.  
Martino et al. Nat Rev microbiol, 2022<sup>4</sup>

À un âge plus avancé l'écologie microbienne subit de nouveaux changements, désormais dans l'incapacité de rétablir la diversité antérieure. Celle-ci s'effondre finalement au moment du décès de l'hôte.<sup>4</sup>

### *Fonctions*

Le microbiote intestinal est un acteur majeur de l'homéostasie gastro-intestinale. Il influence non seulement la digestion et le métabolisme, mais aussi l'immunité ou encore les fonctions cérébrales.<sup>14</sup> La dysbiose est associée à de nombreuses pathologies aiguës et chroniques, que ce soient les infections gastro-intestinales, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'obésité, ou encore certains troubles neuropsychiatriques. Ses fonctions essentielles sont :

#### *Fonctions digestives et métaboliques :*

L'une des fonctions essentielles du microbiote réside en sa capacité à dégrader un large éventail de fibres alimentaires, non digestibles par les seules enzymes humaines. Les principaux produits finaux de cette fermentation sont les acides gras à chaîne courte (AGCC) comme le butyrate, l'acétate et le propionate. Ils sont la principale source d'énergie des colonocytes.<sup>15,16</sup> Leur disponibilité dépend non seulement de la composition du microbiote mais aussi de plusieurs facteurs environnementaux tels que l'alimentation et l'utilisation d'antibiotiques. Le rôle des AGCC ne se limite pas à leur apport énergétique, ils participent aussi à la régulation de l'immunité et au bon fonctionnement de la barrière épithéliale via les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) GPR41, GPR43 et GPR109A.<sup>17</sup>

La grande variété écologique du microbiote lui permet de produire de nombreuses vitamines, nécessaires à son propre fonctionnement. Il synthétise en particulier la vitamine K et plusieurs vitamines B (biotine, cobalamine, folate, niacine, pantothénate, pyridoxine, riboflavine et thiamine).<sup>18</sup> Cette synthèse a principalement

lieu dans le côlon, où le microbiote peut produire *de novo* ces vitamines qui peuvent ensuite être absorbées et utilisées par l'hôte à la condition d'être produites en quantité suffisante.

Les acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire et sont excrétés dans le tube digestif au cours de la digestion. Ils sont ensuite réabsorbés dans l'intestin grêle à 95-99% avant d'être recyclés et reversés dans la vésicule biliaire, ce qui constitue le cycle entéro-hépatique.<sup>19</sup> Les 1-5% restants représentent chez l'Homme 200 à 800mg par jour qui se déversent dans le colon. Là une relation bidirectionnelle entre ces acides biliaires et le microbiote intestinal se met en place. D'une part les acides biliaires possèdent des caractéristiques antimicrobiennes pouvant influencer la composition du microbiote intestinal et d'autre part le microbiote a la capacité de modifier la structure et les propriétés des acides biliaires, c'est ainsi que le pool d'acides biliaires circulants et hépatiques contient plus de 30 molécules différentes.<sup>20</sup> La majorité de ces acides biliaires est générée par le microbiote intestinal et sont dénommées acides biliaires secondaires.

Enfin des études récentes montrent que le microbiote intestinal peut influencer le métabolisme des médicaments par des mécanismes à la fois directs et indirects.<sup>21</sup>

#### *Fonctions de protection :*

L'épithélium intestinal joue un rôle crucial en agissant comme une barrière protectrice et un filtre sélectif. Il empêche l'entrée de substances nocives tout en facilitant l'absorption des nutriments. La perte de son intégrité augmente la perméabilité intestinale et entraîne infections et réactions inflammatoires. Le microbiote participe au bon fonctionnement de cet épithélium. D'une part il entre en compétition avec les pathogènes potentiels et limite leur accès aux ressources

énergétiques et aux sites d'attachement, d'autre part il stimule la production de mucus qui ajoute une strate protectrice au-dessus de l'épithélium intestinal.<sup>22</sup>

De façon plus spécifique la littérature rapporte que la stimulation des récepteurs TLR2 des colonocytes par le microbiote favorise le maintien des jonctions serrées.<sup>23</sup> De même, une précédente étude a montré comment *Bacteroides thetaiotaomicron* contribue à la stabilité des jonctions serrées (claudines/occludine/ZO-1) en induisant l'expression de la protéine sprr2A.<sup>24</sup>

#### *Fonctions immunomodulatrices :*

Le microbiote contribue à la prévention des infections et des maladies inflammatoires en modulant la réponse immunitaire de l'hôte de plusieurs façons, notamment en favorisant la maturation des cellules immunitaires et en produisant des métabolites qui influencent la réponse immunitaire locale et systémique. Le microbiote favorise par exemple la modulation de l'équilibre Treg/Th17 et l'activation des cellules immunitaires résidentes.<sup>25</sup>

Le butyrate est l'un des principaux métabolites possédant une action anti-inflammatoire. Issu de la fermentation des fibres alimentaires en AGCC décrite plus haut, il favorise la différenciation des cellules intestinales, des phagocytes et des lymphocytes B et T.<sup>17</sup> Les AGCC ont aussi des effets immunitaires au-delà de l'intestin. Dans un modèle murin, l'administration intra-hépatique de butyrate a par exemple augmenté la production de prostaglandine E2 (PGE2) par les cellules de Kupffer.<sup>26</sup> L'effet modulateur des AGCC issues du microbiote a aussi été décrit dans le poumon<sup>27</sup> et le cerveau<sup>28</sup>, parfois en lien avec diverses maladies (inflammatoires<sup>29</sup>, allergies<sup>30</sup>, asthme<sup>27</sup>, cancer<sup>29</sup>).

Le microbiote participe aussi à la tolérance immunitaire aux antigènes d'origine alimentaires, il favorise notamment l'équilibre entre lymphocytes T régulateurs



(Treg) et Th17 dans la muqueuse de l'intestin grêle.<sup>31</sup> Inversement, il est rapporté que l'altération du microbiote participe au développement des allergies alimentaires.<sup>32</sup>

#### *Axe microbiote-intestin-cerveau :*

L'impact du microbiote intestinal s'étend aux autres organes via différents axes de communication décrits dans la littérature.<sup>33</sup> En particulier, plusieurs études récentes établissent l'existence d'une communication bidirectionnelle entre le microbiote intestinal et le cerveau. Elles rapportent généralement une association entre une modification du microbiote et la présence de troubles psychiatriques<sup>34</sup> et neurodéveloppementaux<sup>35</sup>.

Le support de cette communication n'est pas parfaitement élucidé à ce jour mais plusieurs voies de communication possibles ont été mises en évidence impliquant le système nerveux entérique, l'axe hypothalamo-hypophysaire, le système immunitaire intestinal, certains neurotransmetteurs et régulateurs neuraux produits par les bactéries intestinales et enfin les barrières muqueuses intestinales et hémato-encéphaliques.<sup>36</sup> Au travers de ces réseaux les signaux viscéraux provenant de l'intestin affectent le fonctionnement du cerveau tandis que le cerveau influence les fonctions motrices, sensorielles et sécrétoires de l'intestin. Par exemple, le nerf vague possède une action bidirectionnelle, il permet d'une part la transmission des messages provenant de l'intestin et peut d'autre part avoir une action anti-inflammatoire sur l'intestin.<sup>37</sup> Le microbiote a la capacité d'activer le nerf vague via la production de glutamate<sup>38</sup> mais il produit aussi de nombreux autres neurotransmetteurs (GABA, acétylcholine, dopamine, sérotonine)<sup>39</sup> capables d'initier une activation du système nerveux périphérique en direction du système nerveux central.

## *Dysbiose, colonisations et infections digestives*

La dysbiose correspond à une altération de la composition et du fonctionnement du microbiote intestinal. Elle peut être due à de nombreuses causes aiguës ou chroniques<sup>40</sup> : maladies de l'intestin, alimentation, facteurs environnementaux et mode de vie, traitements antibiotiques, facteurs génétiques, etc. Les conséquences sont une incapacité du microbiote à remplir une ou plusieurs de ses fonctions normales, précédemment citées. La dysbiose est en particulier responsable d'une diminution de l'effet barrière et d'une dérégulation immunitaire à l'origine d'une inflammation chronique de l'intestin.<sup>41</sup> Les effets de la dysbiose sont systémiques, *in-vivo* elle est par exemple à l'origine d'une immunodépression favorisant les infections pulmonaires.<sup>42</sup>

La colonisation correspond à l'apparition dans la flore intestinale d'une souche bactérienne inattendue, mais sans symptômes ni retentissement sur la santé. Contrairement aux infections où la présence d'un agent pathogène est à l'origine d'une pathologie digestive retentissant sur l'organisme.

Plusieurs approches visant à restaurer l'équilibre du microbiote intestinal ont été proposées. La plus simple consiste en la supplémentation alimentaire, par exemple par des probiotiques, prébiotiques ou postbiotiques : c'est-à-dire respectivement des micro-organismes vivants présentant des effets bénéfiques une fois consommés, leur substrat (par exemple des fibres) ou leur produit (par exemple des AGCC). La combinaison de prébiotique et de probiotique est aussi appelée symbiotique. Les probiotiques les plus fréquemment étudiés sont des bactéries de l'ordre des *Lactobacillales* qui présentent à la fois des propriétés immunomodulatrices, métaboliques, antimicrobiennes et détoxifiantes utiles au rétablissement d'un

microbiote sain.<sup>43</sup> L'efficacité de ces compléments reste néanmoins discutée dans la littérature comme le montre la revue publiée par Suez et al en 2019.<sup>44</sup>

Une seconde approche repose sur la transplantation du microbiote fécal (TMF), extrait d'échantillons de fèces de donneurs sains. Son fonctionnement repose sur une arrivée massive d'une population bactérienne saine dans le tube digestif qui entre en compétition avec les souches multirésistantes présentes. La TMF réduit les ressources et la place disponibles pour les pathogènes. Son efficacité a largement été démontrée dans le traitement des infections à *Clostridioides difficile* mais aussi des MICI.<sup>45</sup>

### *Colonisation à Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* est un bacille à Gram négatif encapsulé, non mobile, anaérobie facultatif et commensal du tube digestif. Il s'agit cependant d'une bactérie pathogène opportuniste car, bien que fréquemment présent naturellement dans le système digestif de la population générale il peut être à l'origine d'infections digestives et pulmonaires en cas de dysbiose ou d'immunodépression.<sup>46</sup> Par ailleurs, une simple colonisation par *K. pneumoniae* a été associée *in-vivo* à une aggravation de l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>47</sup>

La souche sauvage est facilement accessible à l'antibiothérapie. Naturellement productrice d'une pénicillinase de bas niveau de type Sulfhydryl Variable de type 1 (SHV-1), elle est inhibée par l'acide clavulanique ou le tazobactam. Cela rend la souche sauvage sensible à un traitement par l'une des associations disponibles dans le commerce tel qu'amoxicilline / acide clavulanique ou piperacilline / tazobactam ainsi que par les céphalosporines. Plusieurs gènes de résistance peuvent être acquis par *K. pneumoniae* et sont à l'origine de différents profils d'antibiorésistance. Ils proviennent généralement de plasmides et leur propagation est extrêmement rapide, que ce soit entre souches de la même espèce ou entre espèces différentes. Ces

échanges sont à l'origine d'une antibiorésistance mondiale croissante, un enjeu de santé publique contemporain majeur. Plusieurs profils de résistance acquise sont décrits :

- **Pénicillinase de haut niveau** : Il peut s'agir d'une hyperproduction de SHV ou de l'acquisition d'une  $\beta$ -lactamase de la famille des TEM.
- **$\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE)** : pénicillinase de type TEM ou SHV modifiée ou d'une céfotaximase de type M (CTX-M).
- **Résistance aux aminosides** : elle est due à l'acquisition d'une enzyme aminoglycoside phosphotransferase (APH), aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT) ou aminoglycoside acetyltransferase (AAC).
- **Résistance aux quinolones** : elle peut être due à une modification de la cible des antibiotiques (mutation chromosomique), à une protection de la cible (plasmidique, gène *qnr*), ou à une inactivation enzymatique (plasmidique, AAC(6')-Ib-cr). Elle est généralement associée à la résistance aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (C3G).<sup>48</sup>
- **Carbapénémase** : Cinq principales enzymes sont capables de dégrader les carbapénèmes. Par ordre de fréquence : Oxacillinase du groupe 48 (OXA-48-like), New Delhi métallo- $\beta$ -lactamase (NDM), *K. pneumoniae* carbapénémase (KPC), Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase (VIM) et imipénémase (IMP).

La carbapénémase NDM est particulièrement problématique du fait de la résistance qu'elle induit à la plupart des antibiotiques disponibles sur le marché. Cette carbapénémase est identifiée pour la première fois en Inde en 2008<sup>49</sup> elle est aujourd'hui retrouvée dans la quasi-totalité des pays du globe<sup>50</sup> (Figure 4). En 2022 elle représentait 25,7% des carbapénémases identifiées dans l'hexagone toutes entérobactéries confondues, (Figure 5A) et 33% chez *K. pneumoniae* (Figure 5B).<sup>51</sup>

Elle agit en catalysant l'hydrolyse des carbapénèmes. Son site actif contient deux ions zinc capables de cliver la liaison amide caractéristique des  $\beta$ -lactamines. De ce fait, l'ajout d'un chélateur du zinc (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, TPEN) a montré une capacité à restaurer l'activité des carbapénèmes sur *K. pneumoniae* productrice de NDM-1 *in-vitro* mais reste toxique *in-vivo*.<sup>52</sup>

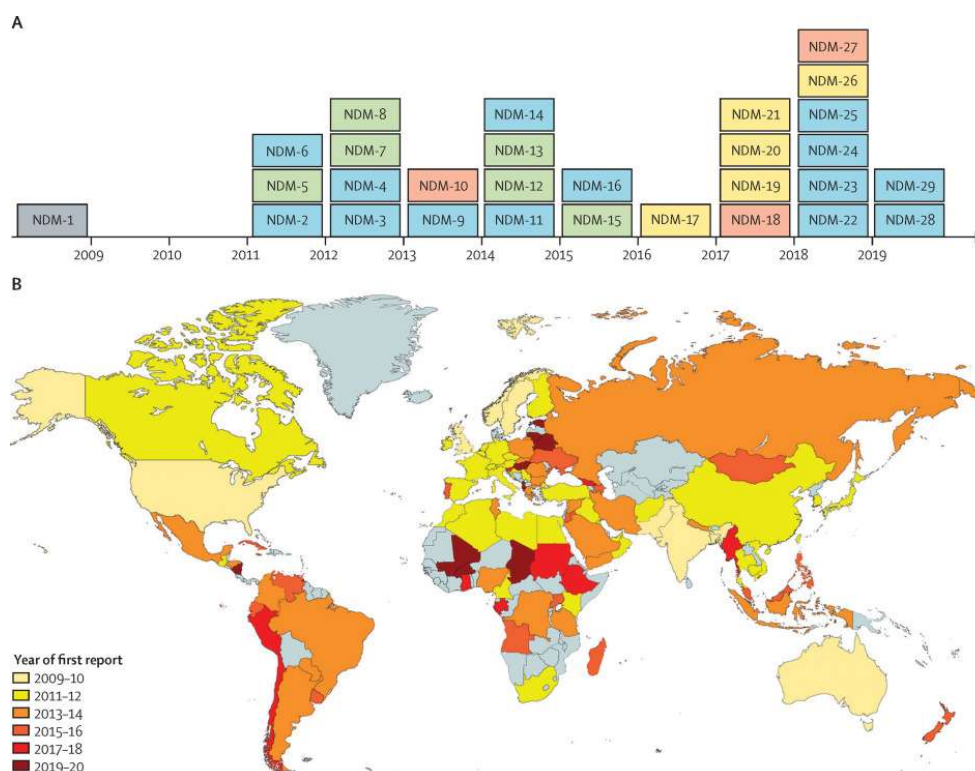


Figure 4 : Années de découverte des différents variants de carbapénémase de type NDM. Mojica et al., *Lancet Infect Dis*, 2022.<sup>50</sup>

La transmission des espèces productrices de carbapénémases (EPC) est souvent d'origine nosocomiale, mais le contact avec un patient porteur n'est pas toujours à l'origine d'une transmission. D'après la littérature plusieurs facteurs favorisent la colonisation par EPC d'un patient : une chirurgie récente, la ventilation mécanique et l'exposition à une antibiothérapie dans les 3 mois précédents.<sup>53</sup>

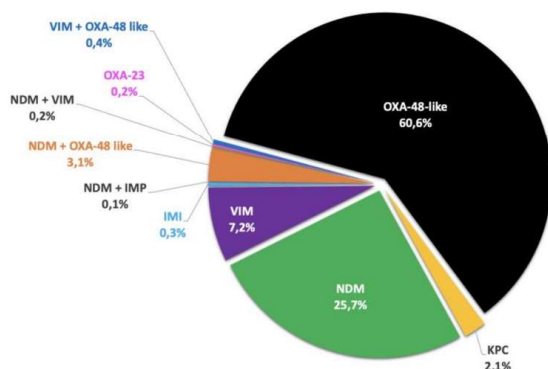
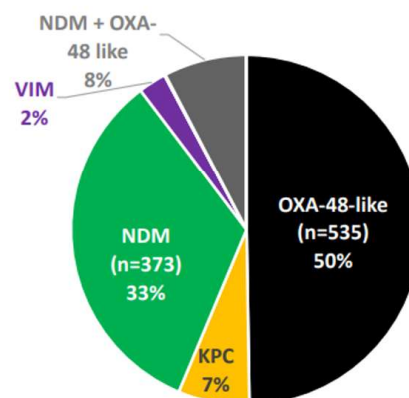
**A****B**

Figure 5 : A Distribution des EPC par types de carbapénémase en 2022. B Répartition des différents clones EPC de *K. pneumoniae* par types de carbapénémase en 2022. Rapport annuel d'activité 2023 du CNR résistance aux antibiotiques.<sup>51</sup>

### Microbiote en réanimation

Le microbiote intestinal des patients hospitalisés en réanimation est soumis à plusieurs contraintes médicales et environnementales sévères<sup>54</sup> parmi lesquelles on peut retrouver une ou plusieurs antibiothérapies à large spectre, l'exposition à des pathogènes nosocomiaux, une immunodépression, un contexte inflammatoire ou encore une modification de l'alimentation et particulièrement de l'apport en fibres alimentaires. Ainsi, plus de 90% du contenu microbien digestif est perdu après 6h en réanimation. La diversité des espèces est largement diminuée<sup>55</sup> avec notamment une disparition de nombreuses souches commensales, bénéfiques pour la santé.<sup>55</sup>

Cette libération de la niche écologique digestive facilite les infections nosocomiales<sup>56</sup> et l'établissement de colonisations dysbiotiques délétères comme cela a été rapporté pour différents pathogènes. La colonisation en réanimation par une entérobactérie productrice de carbapénémase est responsable d'une hausse de 79% de la mortalité et celle par *Acinetobacter baumannii* d'une hausse de 100%.<sup>57,58</sup> Plus généralement, le pronostic des patients est aggravé en cas de dysbiose sévère, un ratio Bacteroidota / Bacillota fortement déséquilibré est corrélé à une hausse de la

mortalité<sup>59</sup> et un enrichissement en entérobactéries est associé à une hausse des infections nosocomiales.<sup>56</sup>

Plusieurs modalités interventionnelles ont été proposées pour remédier à cet effet indésirable du séjour en réanimation. La TMF en réanimation a principalement été étudiée dans le cadre des infections à *C. difficile*, avec un taux de guérison d'environ 90%.<sup>60</sup> Quelques études ont montré une efficacité significative de la TMF chez les patients atteints de MICI, de diarrhée induite par les antibiotiques et de sepsis.<sup>61</sup>

Enfin, l'approche nutritionnelle a fait l'objet de nombreuses études. Elles concernent la place des nutriments entéraux et parentéraux<sup>62</sup> ainsi que l'usage des compléments alimentaires : probiotiques, prébiotiques et symbiotiques.<sup>63,64</sup> Le rôle des fibres alimentaires est ici prépondérant, comme nous allons le développer ci-après.

### Les fibres alimentaires

#### *Définition*

Différentes institutions proposent une définition des fibres alimentaires. Celle adoptée en 2014 par la commission européenne est tirée du Codex Alimentarius<sup>65</sup>, lui-même issu de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Il énonce que « *Par fibres alimentaires, on entend les polymères glucidiques de plus de dix unités monomères, qui ne sont pas hydrolysés par les enzymes digestives de l'intestin grêle de l'homme* ». L'importance de l'action enzymatique permet de différencier les fibres alimentaires d'autres polymères glucidiques comme l'amidon simple, sensible à l'action de l'amylase. Le terme de fibre alimentaire n'est pour autant pas synonyme de non digestible, certaines fibres pouvant être dégradées par des enzymes d'origine non

humaine. A ce titre, le microbiote présente un rôle central dans la digestion et la fermentation des fibres alimentaires.

Ces fibres sont un composant essentiel de l'alimentation, elles sont indispensables au bon fonctionnement du tractus digestif. Elles sont d'origine exclusivement végétale et on peut les retrouver dans les fruits, les légumes, les céréales complètes ou les légumineuses. Les dernières recommandations de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)<sup>66</sup>, publiées en 2016, préconisent une consommation quotidienne de 30 grammes de fibres à l'âge adulte, bien au-delà des 20g/j observées en France à l'heure actuelle.<sup>66</sup> Une proportion égale de fibres solubles et insolubles est par ailleurs recommandée.<sup>66</sup>

### *Classification*

Les fibres alimentaires peuvent être classées selon plusieurs critères, elles se divisent notamment en fibres solubles et insolubles. Les fibres solubles sont miscibles dans l'eau, à l'origine d'une substance gélatineuse. La pectine, les gommes, les bêta-glucanes et l'amidon résistant sont les principaux représentants de cette catégorie. On les retrouve dans l'alimentation via les agrumes, les pommes, les pois ou encore les haricots. Ces fibres ralentissent la digestion et l'absorption des glucides en augmentant la viscosité du bol alimentaire. Elles régulent ainsi la glycémie et réduisent le cholestérol sérique en liant les acides biliaires dans l'intestin.

Les fibres insolubles, elles, ne se dissolvent pas dans l'eau et leur rôle est essentiellement mécanique. Elles absorbent l'eau, ce qui augmente le volume des selles et favorise un transit intestinal régulier. On retrouve entre autres la cellulose, l'hémicellulose et la lignine dans cette catégorie. Elles sont particulièrement présentes



dans les produits céréaliers complets, les noix et les légumes. Seules certaines sont fermentescibles.

Les fibres solubles et certaines fibres insolubles sont fermentées dans le colon par le microbiote, faisant d'elles une source de différents gaz et d'AGCC. Ceux-ci, aussi nommé acides gras volatils, agissent sur de nombreux systèmes homéostatiques comme nous allons le détailler ci-après.

## *Rôles*

### *Régulation de la glycémie*

Les fibres alimentaires ont une influence positive sur la glycémie et l'insulinémie<sup>67</sup>, elles augmentent la sensation de satiété et réduisent l'apport calorique global.<sup>68</sup> Les fibres solubles augmentent la viscosité du bol alimentaire ce qui ralentit la vidange gastrique et l'absorption des glucides<sup>69</sup>, réduisant les pics de glucose postprandiaux. Les fibres insolubles améliorent la sensibilité à l'insuline par l'intermédiaire du microbiote intestinal<sup>70</sup>, ce qui diminue l'hyperglycémie et l'hyperinsulinisme post-prandiale.<sup>71</sup> De fait, plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation de fibres est associée à une diminution du risque de développer un diabète de type 2.<sup>72,73</sup>

### *Effets sur le cholestérol*

Plusieurs méta-analyses récentes<sup>74,75</sup> montrent que la consommation de fibres solubles comme les bêta-glucanes et la pectine est corrélée à une amélioration des principaux facteurs de risque cardiovasculaires : taux de LDL-cholestérol, pression artérielle et indice de masse corporelle. Chaque type de fibre a ses propres caractéristiques avec un mécanisme et un impact d'ampleur variable.<sup>76</sup> Par exemple, le psyllium est une fibre soluble couramment utilisée comme complément alimentaire. Son association avec une statine provoque une réduction du LDL-cholestérol

équivalente à un doublement de la dose de statines.<sup>77</sup> Plus globalement, une consommation élevée de fibres alimentaires est associée à un risque réduit de mortalité prématurée<sup>78</sup>, en particulier de cause cardiovasculaire.

Le mécanisme d'action des fibres alimentaires reste encore débattu. Il a été proposé qu'elles puissent piéger les acides biliaires dans la lumière intestinale, obligeant le foie à utiliser davantage de cholestérol pour produire de nouveaux acides biliaires.<sup>79</sup>

### *Prévention de la constipation*

Les fibres insolubles sont capables d'absorber un important volume d'eau, ce qui augmente le volume des selles et améliore leur consistance, réduisant ainsi le risque de constipation.<sup>80</sup> Un ratio de 1:1 entre fibres solubles et insolubles est le plus favorable dans cette indication.<sup>81</sup> D'autres mécanismes laxatifs des fibres alimentaires ont été décrits *in-vivo*, par exemple en contribuant à la prolifération de *Limosilactobacillus reuteri* (anciennement *Lactobacillus reuteri*) qui favorise la motilité intestinale par un mécanisme sérotoninergique.<sup>82</sup>

### *Impact sur l'immunité et l'inflammation*

Nous avons précédemment développé le rôle du microbiote intestinal dans l'inflammation et l'immunité. Or les principaux médiateurs du microbiote sont les AGCC issus de la fermentation des fibres alimentaires, c'est pourquoi elles ont un impact indirect majeur sur l'immunité et la réponse inflammatoire.<sup>83</sup>

Cependant, les fibres alimentaires ont aussi un impact direct sur la barrière intestinale en modulant l'étanchéité des jonction serrés<sup>84</sup> et la production de mucus par les cellules caliciformes.<sup>85</sup> *In-vitro* certaines fibres on réduit l'expression de chimiokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales intestinales.<sup>86</sup> Enfin, les fibres alimentaires agissent sur certains récepteurs Toll-like (TLR) des cellules

épithéliales et dendritiques et modulent ainsi la production de cytokines inflammatoires.<sup>87</sup>

### *Protection contre le cancer colorectal*

La consommation de fibres alimentaires est associée à une diminution de l'incidence du cancer colorectal<sup>88</sup>, plusieurs mécanismes ont été mis en évidence. En augmentant le volume fécal elles favorisent la dilution des substances cancérogènes et diminuent leur contact avec la muqueuse intestinale. Un régime riche en fibres alimentaires induit une concentration luminale élevée en butyrate qui ne peut pas être entièrement métabolisé par les entérocytes. Dans cette configuration le butyrate présente une action inhibitrice des histones désacétylases avec un effet antiprolifératif et pro-apoptotique sur les cellules épithéliales tumorales.<sup>89</sup> Enfin, la consommation de fibres alimentaires est corrélée à une diminution de la concentration fécale en acides biliaires secondaires. Or, si parmi ces derniers certains comme l'acide lithocholique sont surreprésentés chez les centenaires<sup>90</sup>, d'autres possèdent une action pro-carcinogène colique.<sup>91</sup>

### *Relation entre fibres et microbiote*

Si, par définition, les fibres alimentaires ne sont pas digestibles par les enzymes humaines elles sont pour la plupart fermentescibles par le microbiote. Différents types de fibres requièrent différentes enzymes, donc potentiellement différentes espèces bactériennes pour être dégradées. Mais ce n'est pas seulement la capacité enzymatique d'une espèce qui détermine sa capacité à tirer profit d'une catégorie de fibre alimentaire. C'est aussi sa capacité à lier le substrat, à tolérer les modifications de l'environnement induite (comme le changement de pH) et à bénéficier des produits issus de la fermentation.

C'est par l'ensemble de ces mécanismes que l'apport en fibres modifie la composition du microbiote. Par exemple, chez l'Homme, la prise orale d'amidon résistant a accru la proportion de *Bifidobacterium adolescentis*, *Ruminococcus bromii*, *Eubacterium rectale*, et *Parabacteroides distasonis*<sup>92</sup> alors que l'ingestion de galacto-oligosaccharide a sélectivement favorisé certaines souches de *Bifidobacterium*<sup>93</sup>, seules capables d'utiliser ce substrat. C'est d'ailleurs en se fondant sur cet argument que s'est développé une gamme de compléments alimentaires « pré-biotiques » censés apporter un meilleur équilibre de la flore intestinale en favorisant certaines espèces bénéfiques, bien que ces promesses restent là encore soumises à caution.

### *Usage des fibres en réanimation*

Près de la moitié des patients hospitalisés en réanimation présentent une dysfonction de la barrière intestinale, associée à une mortalité plus élevée.<sup>94</sup> C'est pourquoi l'impact d'un apport entéral de fibres alimentaires en réanimation a été exploré par plusieurs études.<sup>95</sup> Chez ces patients, l'apport en fibres alimentaires favorise l'expansion des espèces productrices d'AGCC<sup>96</sup> dont la présence est associée dans ce contexte à une protection contre la colonisation par des espèces pathogènes.<sup>97</sup> Par ailleurs, les fibres sont réputées réduire le risque de diarrhée, leur adjonction en réanimation a montré son efficacité dans cette indication.<sup>98</sup> Cependant, deux méta-analyses portant sur l'utilisation des fibres en réanimation n'ont pas montré d'impact sur les complications gastro-intestinales, la durée d'hospitalisation en réanimation ni la mortalité.<sup>95,99</sup>

A l'heure actuelle, la Society of Critical Care Medicine (SCCM) et l'American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN) recommandent l'ajout de fibres alimentaires en routine chez les patients hémodynamiquement stables et déjà sous nutrition entérale. Elles encouragent par ailleurs leur utilisation en cas de diarrhée

persistante mais les déconseillent chez les patients à risque d'ischémie mésentérique et de ralentissement important du transit.<sup>100</sup>

### Techniques classiques d'identification bactérienne

La nécessité d'identifier les pathogènes bactériens est bien antérieure à l'émergence de la biologie moléculaire. Plusieurs techniques ont successivement été mises au point et sont encore en usage, que ce soit pour des raisons de rapidité, de coût ou de formation des personnels.

#### *Culture bactérienne*

L'ensemble des techniques présentées ci-après nécessite une première étape de mise en culture des bactéries à identifier. L'échantillon est étalé mécaniquement à l'aide d'une oese sur différentes géloses qui sont ensuite incubées à 35°C sous atmosphère contrôlée, de façon à ce que chaque bactérie isolée soit à l'origine d'une colonie unique, fournissant suffisamment de matériel bactérien identique pour permettre son identification ultérieure.

#### *Examen direct*

L'examen direct macroscopique et microscopique permet d'obtenir de nombreuses informations sur l'espèce bactérienne à identifier. Macroscopiquement, la couleur, la texture ou encore le type de gélose favorisant la croissance sont un ensemble d'informations utiles. Microscopiquement la forme (cocci, bacille, ...), l'organisation (tétrade, chaînette, ...) la mobilité, la présence d'un flagelle ou d'une capsule, la coloration de Gram, sont autant de caractéristiques permettant de suspecter un type de bactéries. Néanmoins, cela ne permet que dans de rares cas d'aboutir à une identification précise.

### *Tests biochimiques*

Les premières techniques d'identification plus précises à avoir été utilisées exploitent les caractéristiques biochimiques et enzymatiques propres à chaque espèce bactérienne pour permettre leur identification. Généralement l'association de plusieurs tests est nécessaire à une identification précise. On retrouve une très large gamme de tests selon les espèces. Les plus courants sont par exemple les tests à la catalase, à l'oxydase ou à la nitrate réductase qui se positivent lorsque la bactérie d'intérêt exprime l'enzyme recherchée.

Ces tests ont par la suite été standardisés et ont mené à l'émergence des galeries API (Appareils et Procédés d'Identification) dans les années 1970. Chaque galerie est composée d'un ensemble de cupules prêtes à l'emploi contenant chacune un test permettant de détecter une réaction spécifique du microorganisme à un substrat donné. Différentes galeries sont disponibles dont l'emploi est orienté par les caractéristiques identifiées lors de l'examen microscopique.

### *MALDI-TOF*

Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) est un spectromètre de masse qui combine une source d'ionisation par désorption/ionisation laser sur matrice (MALDI) avec un analyseur en temps de vol (TOF).

Une colonie bactérienne obtenue en culture est déposée sur une plaque métallique et une matrice chimique est ajoutée pour cristalliser les composants bactériens. Un laser est ensuite utilisé pour ioniser ces cristaux et les ions produits sont accélérés par un champ électrique. Ils se déplacent dans une chambre sous vide jusqu'à un détecteur, où leur temps de vol est mesuré. Ce temps que les ions mettent

à atteindre le détecteur est proportionnel à leur rapport masse sur charge ( $m/Z$ ). Chaque molécule est à l'origine d'un spectre de masse caractéristique.

Le spectre de masse résultant de l'ionisation d'une colonie bactérienne est composé de la superposition de l'ensemble des profils moléculaires le composant. Il est comparé à une base de données de référence qui permet une identification précise de l'espèce bactérienne en quelques minutes seulement.

### Techniques de biologie moléculaire

#### *ARN 16S et autres gènes cibles*

Le séquençage de l'ARN ribosomique 16S est l'outil moléculaire le plus performant pour identifier les différentes espèces bactériennes qui composent le microbiote. Cette technique est qualifiée d'universelle car elle cible une région génétique commune à l'ensemble des bactéries : le gène d'un ARN ribosomique non codant, l'ARNr 16S, qui fait partie de la petite sous-unité ribosomale des espèces procaryotes. Elle présente la particularité de posséder plusieurs domaines très conservés, permettant d'utiliser des amorces universelles et neuf domaines extrêmement variables<sup>101</sup>, permettant l'identification précise d'une espèce.<sup>102</sup> Néanmoins, la similarité entre les ARNr 16S de deux espèces distinctes mais proches peut atteindre 98,65%. D'autres gènes présentant une forte variabilité peuvent être séquencés avec le même objectif comme *gyrB*<sup>103</sup> qui code pour la sous-unité B de l'ADN gyrase ou le gène *rpoB*<sup>104</sup> qui code pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase.

En cas de recherche d'une espèce bactérienne particulière, orientée en fonction du contexte clinique, certains gènes spécifiques de l'espèce ou du profil de résistance peuvent être recherchés par PCR. La présence d'un produit d'amplification signant alors la présence du pathogène recherché.

## 1ere génération

### Méthode de Maxam-Gilbert

Pratiquement abandonnée de nos jours cette méthode a été la toute première à être publiée en 1973.<sup>105</sup> Après une première étape d'extraction et de purification de l'ADN à partir d'un échantillon, un marqueur radioactif est fixé à l'extrémité des brins à séquencer (Figure 6).

Les segments d'ADN obtenus sont répartis dans 4 puits où un faible pourcentage des différentes bases est modifié de façon aléatoire par un réactif chimique différent dans chaque puits : de l'hydrazine (bases C et T), de l'hydrazine en solution alcaline (bases C), du diméthyle sulfate (DMS) (bases G) et de l'acide formique (bases A et G). De la pipéridine est ensuite ajoutée pour casser les brins d'ADN au niveau des bases modifiées.

Les fragments de taille variable vont ainsi être générés et sont ensuite séparés sur un gel de polyacrylamide. La séquence peut ensuite être lue à partir de l'autoradiographie.

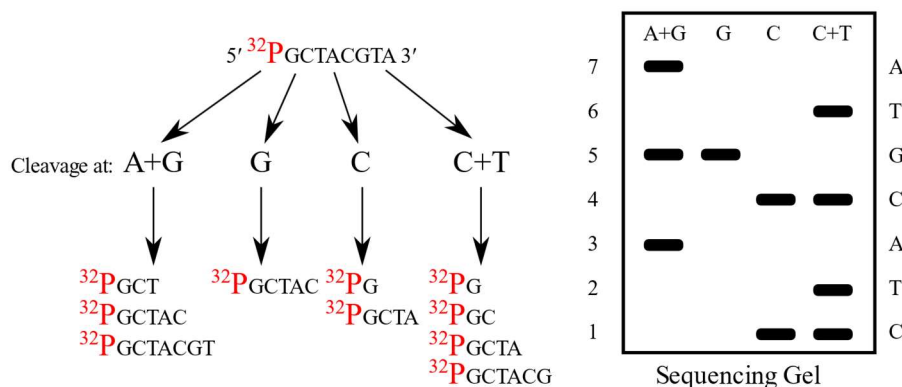


Figure 6 : représentation schématique de la technique de séquençage Maxam et Gilbert.

Cette méthode est utilisable avec des fragments simple et double-brin mais prend beaucoup de temps et n'est pas capable de séquencer des fragments de plus de 500pb. Elle nécessite par ailleurs l'utilisation de réactifs nocifs, c'est pourquoi elle



sera rapidement remplacée par la technique Sanger. Elle reste encore parfois utilisée pour quelques applications spécifiques telles que l'identification de modification épigénétique ou la fixation de protéines à l'ADN.

### *Méthode de Sanger (1977)*

En parallèle des travaux de Maxam et Gilbert, une autre technique de séquençage de l'ADN a été développée en 1977 par l'équipe de Frederick Sanger et est désormais connue sous le nom de « Séquençage Sanger ».<sup>106</sup> Elle s'est rapidement imposée comme la technique de référence pendant près de 40 ans, occultant la méthode de Maxam et Gilbert. Gilbert et Sanger se partageront toutefois le prix Nobel de Chimie en 1980.

Cette technique débute par l'amplification du fragment d'intérêt par PCR. Une fois un nombre suffisant de copies produites, elles sont réparties dans 4 puits contenant chacun une polymérase et des désoxynucléotides (dATP, dGTP, dCTP et dTTP) permettant d'effectuer un nouveau cycle de PCR. Cependant chaque puits est complété avec environ 1% de di-désoxynucléotides (ddNTP) d'un seul type (ddATP, ddGTP, ddCTP, ou ddTTP). Ce ddNTP est amputé du groupe 3'-OH nécessaire à la formation de la liaison phosphodiester entre deux nucléotides, son incorporation aléatoire empêche l'ajout du nucléotide suivant et provoque l'interruption précoce de l'extension du brin complémentaire.

Des fragments de taille variable sont ainsi produits et peuvent être séparés à l'aide d'un gel d'électrophorèse, générant des bandes détectables par radio-marquage. Les bandes successives dans un puit donné permettent d'identifier les occurrences de la di-désoxynucléotide de ce puit. Il est ensuite possible de remonter à la séquence complète en comparant les 4 puits en même temps (Figure 7).

Une amélioration majeure de cette technique a été l'introduction de ddNTP fluorescents, émettant une couleur différente selon leur nature. Il est alors possible d'effectuer l'étape finale dans un seul puit et de lire la séquence par l'enchaînement des bandes fluorescentes.

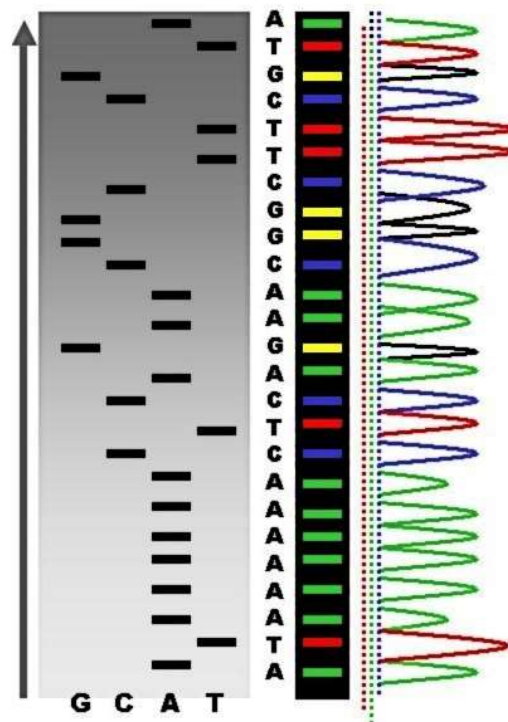


Figure 7 : représentation schématique de la technique de séquençage Sanger.

Aujourd'hui encore, la méthode Sanger reste largement utilisée pour certaines études ciblées ainsi que pour la validation des résultats obtenus par d'autres méthodes de séquençage. Elle a toujours l'avantage sur les technologies de séquençage à reads courts (comme Illumina) en ce sens qu'elle peut produire des reads de séquences d'ADN de plus de 500 nucléotides et maintenir un taux d'erreur très faible avec des précisions de 99,999 %.<sup>107</sup>

## 2eme génération - NGS

Au début des années 2000 l'arrivée des techniques de séquençage de seconde génération, (Next Generation Sequencing - NGS), a révolutionné le secteur en

augmentant le débit de séquençage tout en diminuant drastiquement les coûts de production. Ces différentes techniques partagent quelques caractéristiques communes. En particulier elles nécessitent toutes de débiter par une étape d'amplification par PCR de l'ADN. Ces méthodes sont capables de produire des résultats en temps réel, et de traiter une grande quantité de séquences en parallèle.

### *Pyroséquençage et Ion Torrent*

En 2005 le pyroséquençage a été la première technologie de NGS à avoir été mise sur le marché par Roche, sous le nom « 454 ». Il s'agit d'une technique de séquençage par synthèse. L'ADN d'intérêt est fragmenté en brins d'environ 500 paires de bases et une séquence adaptatrice spécifique est ajoutée à chaque fragment. Ces fragments sont mis au contact de billes de résine couvertes chacune par la répétition d'une séquence complémentaire de l'une des séquences adaptatrices, permettant la fixation d'un fragment unique par bille. Ces fragments sont ensuite amplifiés par PCR en émulsion (emPCR) de façon à couvrir chaque bille de copies d'un même fragment. Les billes sont ensuite réparties individuellement dans les puits d'une microplaque contenant les enzymes ADN-polymérase, ATP-sulfurylase et luciférase ainsi que les réactifs 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) et luciférine.

Les puits sont alimentés de façon séquentielle par l'un des quatre dNTP. En cas de complémentarité la polymérase incorpore le dNTP ce qui libère dans le puit un pyrophosphate à l'origine d'une cascade enzymatique. En présence de PAPS l'ATP-sulfurylase convertit le pyrophosphate en sulfate et en ATP. L'ATP est consommée par la luciférase pour convertir la luciférine en oxyluciférine ce qui est à l'origine d'un flash lumineux d'une intensité proportionnelle à la quantité d'ATP disponible et donc au nombre de nucléotides incorporées. Ce flash est enregistré et quantifié en temps réel par une caméra. Les nucléotides restants sont rincés et un nouveau cycle est initié avec un autre nucléotide jusqu'à la synthèse complète des brins complémentaires.

Cette technique n'est plus commercialisée depuis 2013 face à l'émergence de nouvelles techniques de NGS plus performantes en termes de coût et de fiabilité.

Commercialisée depuis 2010, la technologie Ion Torrent reprend les mêmes étapes initiales mais remplace la détection optique du pyrophosphate par la détection pH-métrique d'un proton  $H^+$  émis lui aussi lors de l'incorporation d'un dNTP. Cela a permis l'usage de détecteur de pH génériques, induisant une importante réduction des coûts.

### *Illumina*

La technique Illumina, d'abord connue sous le nom Solexa, est la technologie de NGS la plus utilisée aujourd'hui, il s'agit là aussi d'une technique de séquençage par synthèse. Les séquences d'ADN sont segmentées en brins courts, (150-800 paires de bases). Une séquence adaptatrice est ajoutée aux extrémités pour permettre leur hybridation aléatoire à des oligonucléotides présents à la surface d'une plaque en verre, la cellule de flux. Pour permettre le séquençage simultané de plusieurs échantillons, une séquence étiquette peut être préalablement fixée aux extrémités de brins afin d'identifier leur origine avant l'étape de reconstruction du génome.

Les brins sont ensuite amplifiés par PCR en pont. La fixation des brins sur la cellule de flux génère des clusters de molécules de séquence identique. Le séquençage proprement dit est ensuite effectué à l'aide de nucléotides terminateurs fluorescents dont le fluorochrome terminateur peut être clivé par une enzyme dédiée. Simultanément, les brins complémentaires de chaque cluster sont complétés par un nucléotide identique, responsable d'une fluorescence suffisamment intense pour être identifiée par une caméra. Les fluorophores sont ensuite clivés, permettant l'insertion de nouveaux nucléotides. Ces étapes sont répétées jusqu'à la synthèse complète des brins complémentaires. L'identification des nucléotides, ou basecalling, à partir des

émissions fluorescentes est effectué en temps réel. Une étape de bio-informatique est ensuite nécessaire pour reconstituer le ou les génomes complets à partir des fragments séquencés (Figure 8).

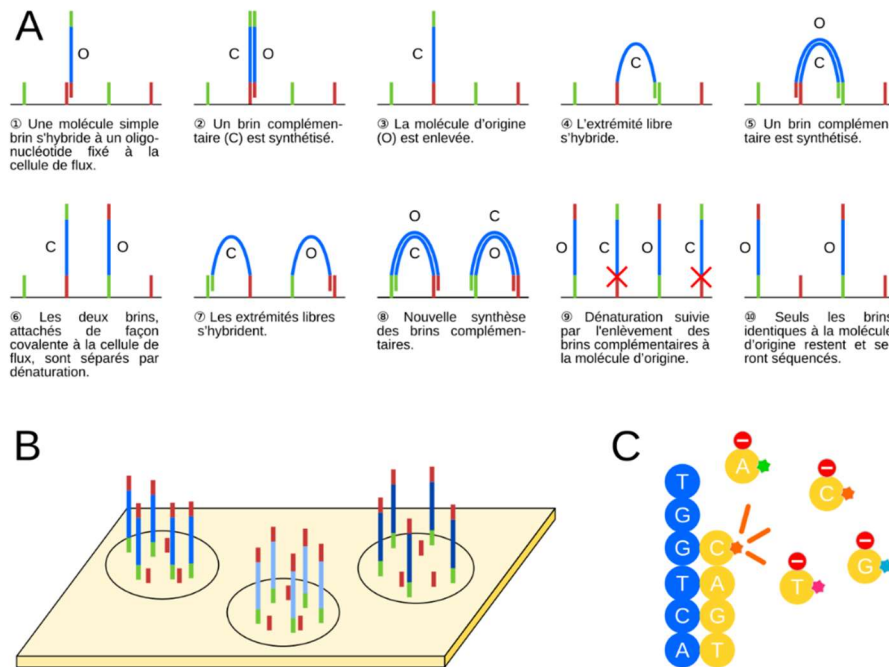


Figure 8 : représentation schématique de la technique de séquençage Illumina.  
Schéma édité par Illumina

## SOLiD

Commercialisée depuis 2006, la technologie SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) utilise une approche originale qui ne doit pas être confondue aux méthodes de séquençage par synthèse. Seules les premières étapes restent similaires au pyroséquençage. L'ADN est clivé en fragments d'environ 200 paires de bases et fixés par des adaptateurs à la surface de billes avant d'être amplifiés par emPCR.

Seize sondes de 8 nucléotides correspondant aux 16 combinaisons possibles des deux premiers nucléotides sont ensuite utilisées, chacune portant l'un des 4 fluorophores disponibles. Seules ces deux premiers nucléotides sont complémentaires

du brin étudié et seront à l'origine de la fixation de la sonde. Les trois nucléotides suivants sont non spécifiques et seront incorporés, les trois derniers nucléotides de la sonde sont clivés après lecture de la fluorescence. Cette méthode permet d'identifier deux nucléotides sur cinq à chaque cycle, en partant de l'amorce (primer n). L'amorce est ensuite décalée d'un nucléotide à la fois et le processus est répété jusqu'à l'identification de l'ensemble des nucléotides de la séquence (Figure 9).

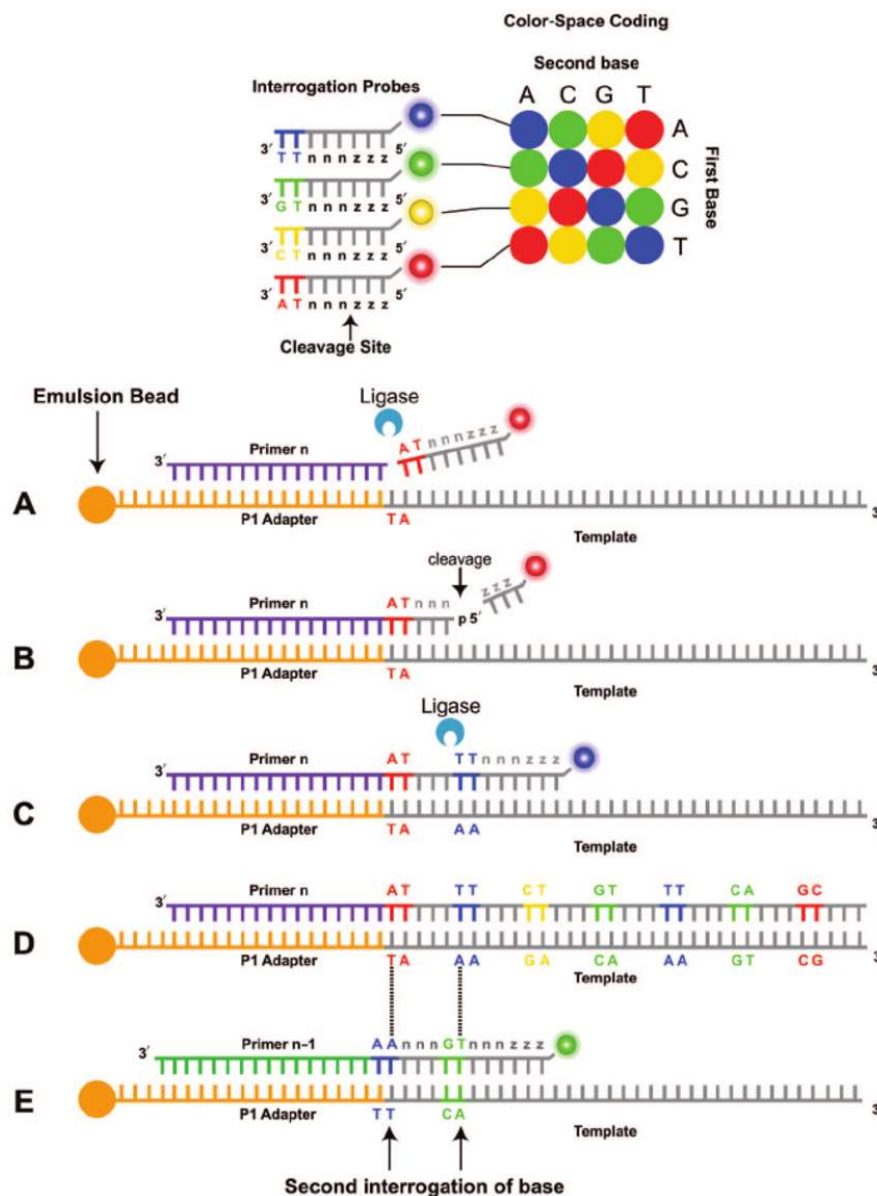


Figure 9 : représentation schématique de la technique de séquençage SOLiD.  
Voelkerding et al. *Clinical Chemistry*, 2009.

### *3eme génération - TGS*

Le séquençage de troisième génération (TGS) représente un nouveau saut qualitatif des technologies de séquençage de l'ADN.<sup>108</sup> Ces technologies sont les premières à ne pas nécessiter d'étape préalable de PCR, le séquençage se fait directement à partir d'une unique molécule d'ADN. Plus rapide, non soumises aux biais de PCR et pouvant séquencer des brins très longs, elles restent à l'heure actuelle moins précises que les techniques de NGS utilisées en routine.

#### *PacBio – SMRT*

Développée par Pacific Biosciences (PacBio), la technologie SMRT (Single-Molecule Real-Time sequencing) est la première technologie de TGS à avoir été mise sur le marché en 2010. Elle permet de séquencer en une seule fois des brins pouvant aller jusqu'à une centaine de kilobases. Des amorces en épingle à cheveux sont fixées à chaque extrémité d'un fragment d'ADN double brin avant que les deux brins complémentaires ne soient séparés, résultant en une molécule circulaire d'ADN simple brin.

Une unique polymérase fixée au fond d'un puit d'une dizaine de nanomètres de diamètre prend alors en charge la molécule d'ADN et commence à générer le brin complémentaire à l'aide de nucléotides fluorescents. A chaque ajout de nucléotide, la réaction est temporairement arrêtée, un laser excite le fluorophore venant d'être ajouté et la fluorescence émise, caractéristique du nucléotide, est enregistrée. Le fluorophore est ensuite clivé et la polymérase passe au nucléotide suivant.

La molécule séquencée est circulaire, il est donc possible de la lire plusieurs fois en boucle afin d'améliorer la précision de la technique. Cette méthode, appelée high Fidelity (HiFi), permet de dépasser les 99,5% d'exactitude.<sup>109</sup>

### *Autres techniques*

D'autres techniques de séquençage direct ont été explorées sans avoir été commercialisées à ce jour. En 2009 IBM a annoncé développer une technologie de transistor ADN faisant circuler à grande vitesse un brin d'ADN dans un nanopore possédant une structure similaire à celle d'un transistor et qui serait capable de détecter la signature électronique caractéristique de chaque base.

Des entreprises comme Reveo, Electron Optica et ZS Genetics ont proposé d'utiliser la microscopie électronique haute résolution pour visualiser et séquencer directement les molécules d'ADN. Il est effectivement possible de déterminer la séquence nucléotidique d'un fragment d'ADN en le marquant avec des atomes lourds puis en l'analysant par microscopie électronique. L'avantage principal de cette méthode est la possibilité de séquencer de longs fragments de plus de 10 kbp avec précision et de détecter les modifications épigénétiques associées. Cependant, sa complexité, son coût élevé et la nécessité d'un équipement dédié n'ont pas permis à cette technologie d'émerger.

### Focus sur le séquençage Nanopore

#### *Principe général*

Le séquençage Nanopore est une technologie de séquençage d'ADN décrite pour la première fois en 1996.<sup>110</sup> Elle se fonde sur l'emploi de nanopore c'est-à-dire une ouverture de quelques nanomètres de diamètre dans une membrane séparant deux milieux. L'instauration d'une différence de potentiel entre ces milieux est à l'origine d'un courant ionique mesurable au travers du pore. En faisant au même moment circuler une molécule d'ADN dans le pore, le flux d'ions est perturbé, permettant d'identifier une signature spécifique de chaque base. Il est alors possible de séquencer la totalité de la molécule d'ADN en enregistrant les fluctuations de



courant électrique tout au long du passage de la molécule d'ADN (Figure 10). En pratique, en fonction de la taille du pore un nombre  $k$  de bases successives sont présentes simultanément dans le pore et forment un  $k$ -mers, auquel est associée la perturbation de courant enregistrée.

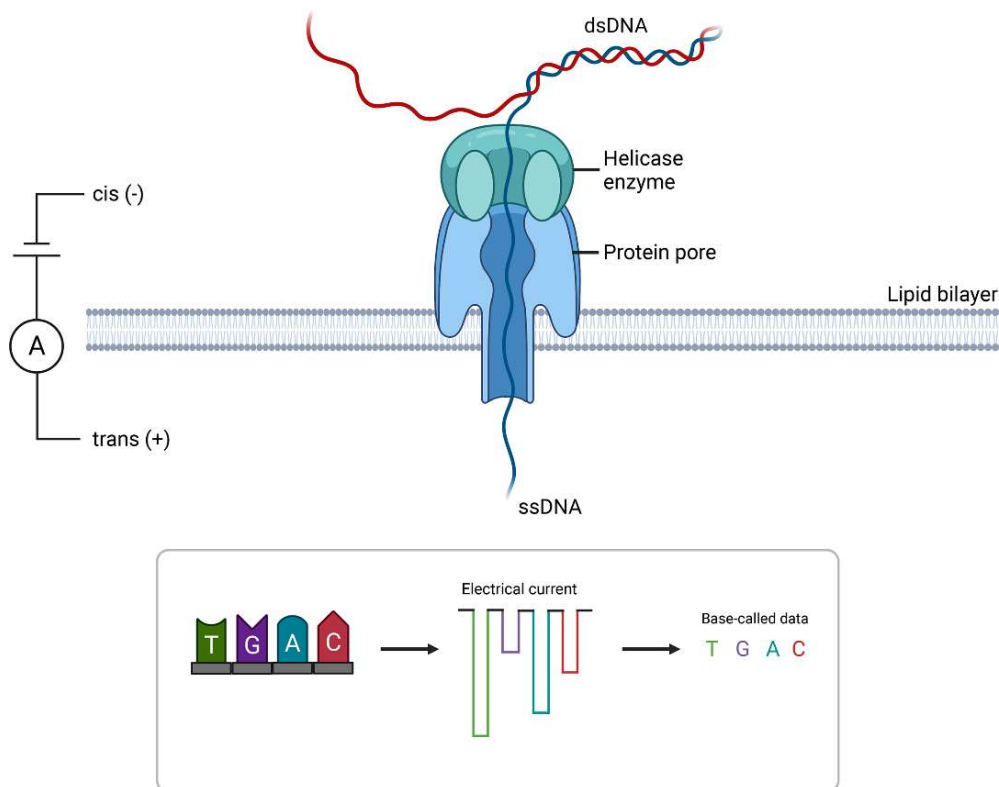


Figure 10 : représentation schématique de la technique de séquençage nanopore.  
Beckett et al. *Biochem*, 2021.<sup>111</sup>

### Différents types de nanopores

Ces pores peuvent être d'origine biologique ou synthétique. On les retrouve par exemple naturellement à la surface cellulaire pour permettre les échanges entre cytoplasme et environnement extérieur. L' $\alpha$ -hémolysine (aussi appelé  $\alpha$ -toxine staphylococcique) est un homoheptamère cylindrique produit par *Staphylococcus aureus*<sup>112</sup>, il est le nanopore biologique le plus utilisé en génie biologique, par exemple dans la technique du patch-clamp. Il possède une structure cylindrique de 1,6 nm (16 Å) de diamètre interne, à peine quatre fois le diamètre d'un cation de calcium  $\text{Ca}^{2+}$ .

Lorsqu'il se fixe au travers de la membrane cytoplasmique des hématies il provoque un flux sortant hémolytique.

Le principal avantage des nanopores biologiques est leur versatilité.<sup>113</sup> Etant codés par des gènes bactériens, il est possible de modifier leur structure par l'intermédiaire de modifications génétiques. Ces modifications de forme, de diamètre, d'ajout de sites spécifiques, etc permettent de régulièrement améliorer la précision des technologies qui en dérivent. Il est aussi facilement possible de fixer différentes molécules sur ces pores, en particulier la protéine hélicase. Il s'agit d'un moteur moléculaire permettant de réguler la vitesse de passage de l'ADN dans le pore. Ces pores présentent cependant une grande fragilité et sont extrêmement sensible aux vibrations, à la température, au pH et à la force ionique.

il est aussi possible de créer des nanopores artificiels en perforant une membrane synthétique.<sup>114</sup> Les plus utilisés aujourd'hui sont produits à partir d'une membrane de nitrure de silicium exposé à un faisceau d'ions.<sup>115</sup> D'autres techniques ont été proposées, par exemple un procédé d'attaque chimique d'une membrane en polymère<sup>116</sup> ou, plus récemment, l'utilisation de nanotubes de carbone.<sup>117</sup> Ces techniques ont l'avantage de produire des pores beaucoup plus stables mais sont beaucoup plus difficile à mettre en œuvre, avec une reproductibilité plus faible.

### *Séquençage Oxford Nanopore (ONT)*

La société Oxford Nanopore utilise un nanopore biologique généré à partir d'une lipoprotéine CsgG d'*Escherichia coli* modifiée et sur laquelle est fixée une hélicase. Dans leur dernière version, R10, ONT introduit un système de pore dual à double constriction.<sup>118</sup> Cela diminue le taux d'erreur en particulier autour des régions homopolymères où plusieurs nucléotides identiques apparaissent successivement et sont difficile à identifier séparément (Figure 11).

ONT commercialise différentes cellules de flux totalement intégrées. Les pores sont collectés par broyage cellulaire, répartis à la surface d'une membrane lipidique et regroupés par quatre pour former un puit de lecture unique. Dans chaque puit, un seul des quatre pores est actif à la fois. Le modèle Flow Cell possède un total de 512 puits et 2048 pores dont au moins 800 sont garantis fonctionnels par la société. Seuls cinquante pores fonctionnels sont garantis pour le modèle Flongle. La cellule de flux est équipée de l'ensemble du matériel permettant d'initier et de mesurer le courant ionique spécifique de chaque puit. Il est donc possible de séquencer en parallèle autant de molécule d'ADN qu'il y a de puits fonctionnels. Le signal électrique est enregistré et traité à l'aide du logiciel MinKNOW et traduit en séquence nucléotidique par le logiciel d'appel de base (basecaller) Dorado, nativement intégré à MinKNOW. De nombreux autres logiciels ont été développés pour effectuer ces étapes, ils sont généralement disponibles sur GitHub.<sup>119</sup>

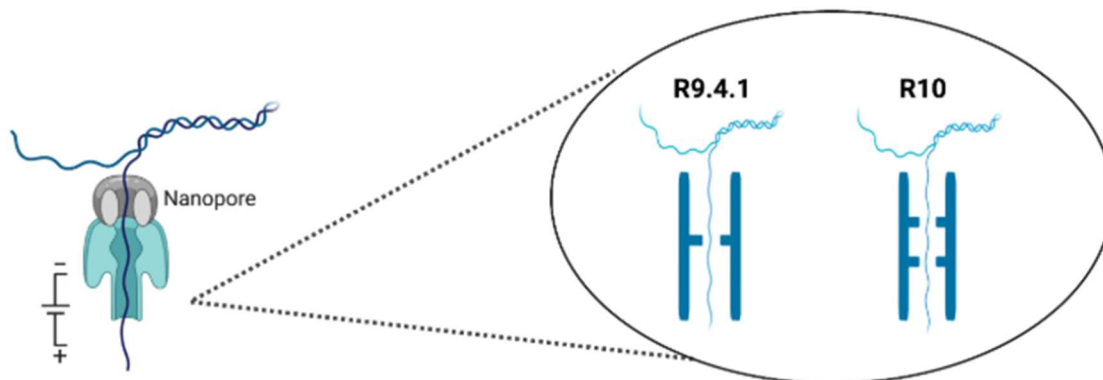


Figure 11 : représentation schématique de la technique de séquençage nanopore.  
Zhang et al. J Genet Genomics, 2024.<sup>118</sup>

### Séquençage 16S : ONT Vs Illumina

Les outils de NGS, et en particulier Illumina, sont aujourd'hui les plus utilisés dans le cadre du séquençage de l'ARN 16S.<sup>120</sup> Ils offrent une grande précision de séquençage mais sont limités par la longueur des reads. Ils couvrent une à trois des neuf régions hypervariables du gène seulement<sup>121</sup>, ce qui restreint la précision

taxonomique. De plus, le coût élevé de cette technologie oblige souvent à externaliser le séquençage, ce qui allonge les délais.

L'avantage majeur de la technologie Nanopore est sa capacité à séquencer des reads de grande longueur, associé à un coût réduit. Elle permet de séquencer l'ARNr 16S d'un seul tenant et en capturant toutes les régions hypervariables. Cependant la technologie ONT a longtemps présenté un taux d'erreur élevé, incompatible avec la précision nécessaire à cette application.<sup>122</sup> L'introduction d'une nouvelle chimie en 2021 a permis d'atteindre une précision de 98.34, et une proportion de séquences avec une précision supérieure à 99% de 30.1%.<sup>123</sup> Ces résultats ont permis l'essor du séquençage nanopore dans le séquençage de l'ARNr 16S. La technologie illumina reste cependant toujours la plus précise, une récente étude sur *Clostridioides difficile* a montré une qualité moyenne de 99.68% avec illumina contre 96.84% avec ONT.<sup>124</sup>

## Objectif

La consommation de fibre modifie la composition et le fonctionnement du microbiote intestinal, favorise certaines espèces commensales et participe à l'homéostasie colique. Notre principale hypothèse de travail suppose que ces avantages sur le microbiote protègent le patient de la colonisation digestive par des bactéries multi-résistantes.

Les travaux présentés ici font suite à une étude préliminaire de notre laboratoire. Elle avait permis de montrer l'impact positif de la supplémentation en SCFA sur l'axe intestin-poumon dans un modèle de souris colonisées au niveau digestif par *Klebsiella pneumoniae* productrice de carbapénémase NDM-1.

Ici nous aurons pour objectif de faire la preuve de concept d'une méthode d'analyse de la composition du microbiote de patients hospitalisés en réanimation au CHU de Lille, porteurs ou non de BMR. Cela repose sur la mise au point des étapes de prélèvement, de conservation, de préparation et de séquençage des échantillons et permettra par la suite de poursuivre ce projet par la caractérisation de l'impact de la consommation de fibres sur le risque de colonisation de ces patients par une BMR.

## Matériel et méthode

### Modèle murin

Nous avons sélectionné un modèle de souris mâles, de fonds génétique C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) et âgées de 6 à 8 semaines. Elles 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, par groupes de 5 souris. Le change était réalisé au moins une fois par semaine. Les selles animales étaient prélevées immédiatement après exonération et congelées à -80°C. Une autorisation du comité d'éthique animale a été obtenue préalablement à ce projet (APAFiS #7166)

### Patients

#### *Présentation*

Trois séries d'échantillons d'origine humaine ont été exploités successivement. Deux sont des prélèvements issus d'écouvillons eSwab (Copan) et une de fèces :

- La première série contient 8 échantillons eSwab, 5 masculins et 3 féminins. L'âge moyen des patients est de 58 ans avec des valeurs extrêmes à 28 et 76 ans. Une patiente est porteuse de BMR.
- La seconde série contient 14 échantillons eSwab, 11 masculins et 3 féminins. L'âge moyen des patients est de 54 ans avec des valeurs extrêmes à 34 et 80 ans. Deux patients sont porteurs de BMR.
- La troisième série contient 10 échantillons de fèces, 6 masculins et 4 féminins. L'âge moyen des patients est de 63 ans avec des valeurs extrêmes à 61 et 77 ans. Deux patientes sont porteuses de BMR.

### *Echantillonnage du microbiote*

Les 3 séries d'échantillons de microbiote ont été obtenus par écouvillonnage rectal eSwab ou par prélèvement de fèces au lit du malade par le personnel soignant et immédiatement congelés à -80°C.

### Extraction et préparation des échantillons

#### *Kits*

Les échantillons de fèces murins et humains ont préalablement été broyés par 1 minute de bead-beating au TissueLyzer (Qiagen, Hilden, Allemagne) avec deux types de billes simultanément : céramique 1,4mm et verre 0,1mm. Les écouvillons ont été directement extraits, sans bead-beating. L'ADN bactérien a ensuite été extrait à l'aide du kit Qiagen QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations du fabricant. Le rendement d'extraction a été quantifié sur un  $\mu$ Drop. Les échantillons ont été conservés à -80°C.

#### *Ajout des codes-barres*

Les ADN extraits de chaque patient ont été complétés par un code barre nucléique afin d'être identifiable à l'issue du séquençage. Pour cela nous avons suivi le protocole proposé par Quantabio.<sup>125</sup>

#### *Amplification*

Les ADN extraits ont été amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques de la région codant l'ARN 16S : après décongélation sur glace ils ont été amplifiés pendant 35 cycles avec en suivant cette séquence : 98°C (10s), 55°C (5s) et 68°C (5s). La quantification en ADN de chaque échantillon a été réalisée au  $\mu$ Drop pour les deux séries eSwab et au Qubit pour les selles et les échantillons murins.

## Séquençage nanopore

### *Cellules de flux*

Pour chaque procédure d'échantillonnage, des quantités identiques d'ADN issus des prélèvements de chaque patient ont été prélevés et mélangés en un seul tube. Les séquençages ont été réalisés sur une machine Oxford Nanopore MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies).

Les deux séries eSwab ont été séquencées sur des cellules MinION (FLO-MIN114) en chimie R9.4.1. La série "selles" a été séquencée sur des cellules Flongle (FLO-FLG114) en chimie R10.4.1. Le nombre de pores disponibles a été contrôlé préalablement au séquençage selon le protocole du fabricant.

### *Contrôle de qualité*

Le nombre de pores disponibles a été contrôlé préalablement au séquençage suivant le protocole du fabricant.

### *Appel de bases (basecalling) et assignment*

L'appel de base a été effectué en temps réel par le logiciel MinKNOW/Dorado, édité par Oxford Nanopore. L'identification des espèces bactériennes est ensuite réalisée à l'aide de la base de données SILVA version 138.1. L'assignment taxonomique a été effectuée à l'aide du classifieur Kraken2, intégré au sein du pipeline bio-informatique wf-16s d'EPI2ME Labs. Pour l'analyse, seules les séquences d'une longueur comprise entre 800 et 2000 paires de bases ont été retenues, afin de cibler spécifiquement les amplicons du gène de l'ARNr 16S. L'analyse a été conduite au rang taxonomique du genre (G). L'estimation de l'abondance relative de chaque genre a été ensuite affinée à l'aide de l'outil Bracken.



## Résumé des protocoles d'analyse murins

Des selles ont été recueillies directement lors de l'exonération de chaque souris, pesées puis homogénéisées par bead-beating sur un TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Allemagne) avec un mélange de billes de céramique 1,4 mm et de verre 0,1 mm. L'ADN microbien a été extrait avec le kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les ADN de chaque échantillon ont été marqués par codes-barres (Quantabio), normalisés puis regroupés en un pool équimolaire. L'amplicon 16S a été amplifié par PCR (35 cycles) et quantifié au fluorimètre Qubit. Les bibliothèques ont été séquencées sur un MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies) en utilisant des cellules de flux Flongle (FLO-FLG114) et MinION (FLO-MIN114) avec la chimie R10.4.1, après contrôle du nombre de pores actifs ; le basecalling a été réalisé en temps réel par MinKNOW/Dorado.

## Résumé des protocoles d'analyse humains

### *Protocole E-Swab*

Les échantillons ont été prélevés à l'aide d'un écouvillon rectal E-Swab. L'ADN microbien a été extrait avec le kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les ADN issus de chaque patient ont été marqués par codes-barres (Quantabio), normalisés puis regroupés en un pool équimolaire. L'amplicon 16S a été amplifié par PCR (30 cycles pour la première série d'écouvillons puis 35 cycles) et l'amplification quantifiée par  $\mu$ Drop. Le séquençage a été réalisé sur une cellule de flux ONT MinION avec la chimie R9.4.1 ; le basecalling a été effectué en temps réel (MinKNOW/Dorado).

### *Protocole Selles*

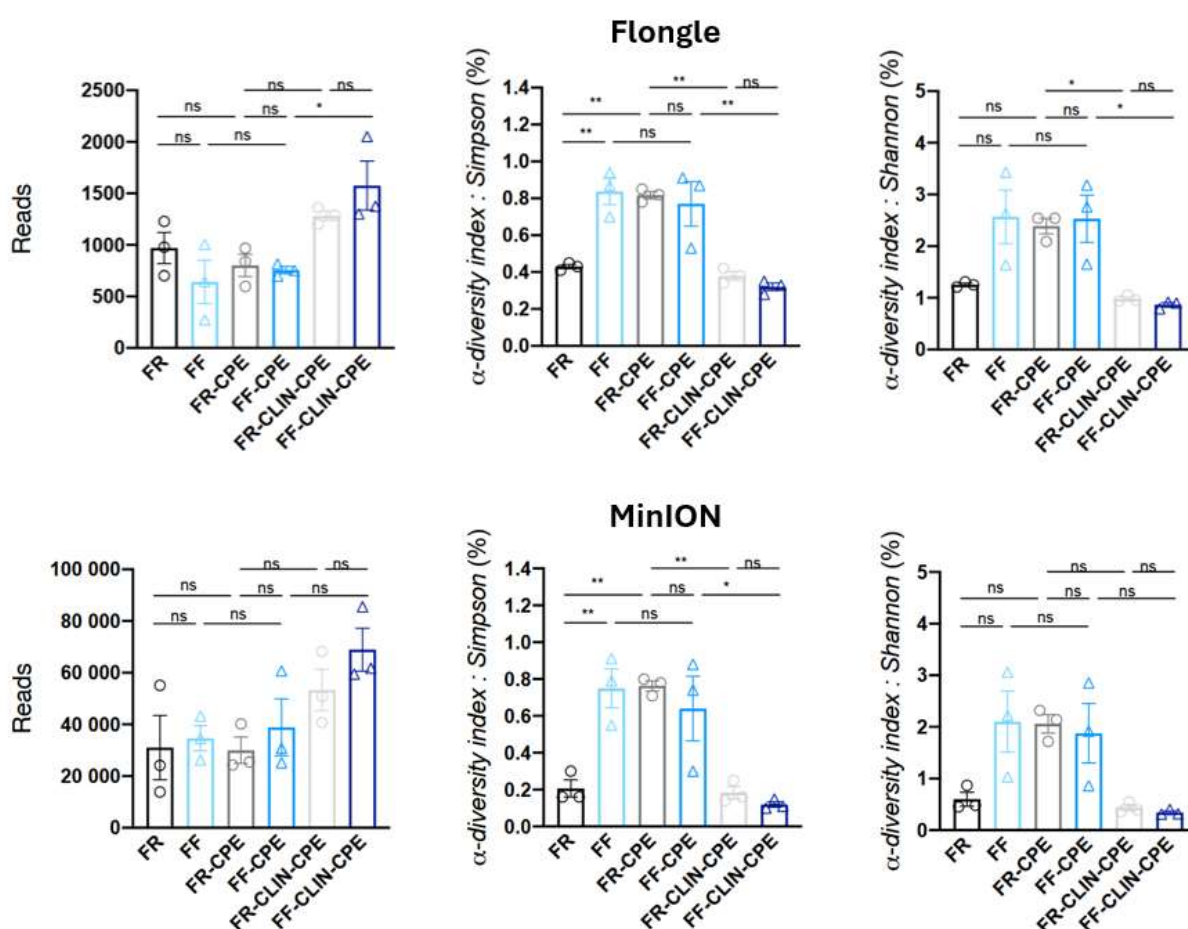
Les échantillons de selles ont été transportés dans des pots stériles. Après bead-beating sur un TissueLyser II (billes de céramique 1,4 mm et de verre 0,1 mm),

l'ADN microbien a été extrait avec le kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) conformément aux recommandations du fabricant. Les ADN de chaque patient ont été marqués par codes-barres (Quantabio), normalisés puis poolés de manière équimolaire. L'amplicon 16S a été amplifié par PCR (35 cycles) et quantifié au Qubit. Le séquençage a été réalisé sur une cellule de flux ONT Flongle avec la chimie R10.4.1 ; le basecalling a été effectué en temps réel (MinKNOW/Dorado).

## Résultats

### Comparaison des cellules de flux Flongle et MinION dans un modèle murin.

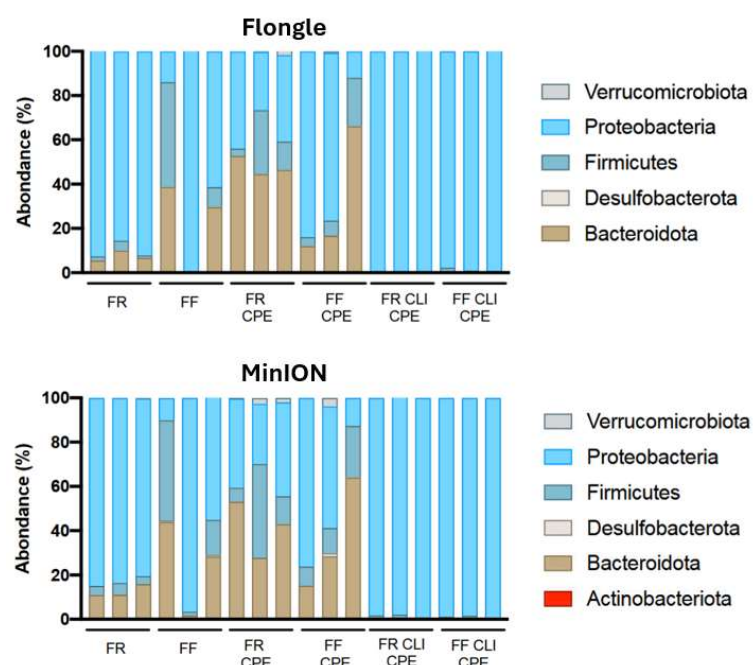
Nous avons d'abord évalué, chez la souris, l'impact du type de cellule de flux (Flongle vs MinION) sur les résultats de séquençage. Des échantillons de selles issus de six groupes expérimentaux ont été prélevés et séquencés. Trois groupes présentent un régime alimentaire enrichi (FR) et trois un régime pauvre en fibre (FF). Un groupe de chaque a été exposé à une souche *K. pneumoniae* NDM-1 à J15 (CPE) et un autre groupe a en plus reçu deux injections de clindamycine à J14 et à J21 (CLIN). Au total, six groupes différents ont été analysés en fonction de l'exposition aux fibres (FF ou FR), à la clindamycine (CLIN ou rien) et à la souche *K. pneumoniae* NDM-1 (CPE ou rien).



**Figure 12 : Nombres de reads et diversité alpha de Simpson et Shannon en fonction du type de cellule de flux utilisée (Flongle et MinION)**  
*FR = régime supplémenté en fibres ; FF = régime sans fibres ; + CPE = exposée à la souche KPL0.2 (K. pneumoniae NDM-1) dans l'eau de boisson pendant 24 heures au 15ème jour. ; + CLI = injection de clindamycine aux 14ème et 21ème jours.*

Comme attendu, la cellule de flux MinION a obtenu un nombre de reads bien supérieur à la Flongle, 26 000 contre 900 pour le groupe FR (Figure 12). Les scores de diversité alpha de Simpson et de Shannon sont en revanche comparables entre les différentes cellules de flux, quelles que soient les groupes étudiés. On retrouve une diversité plus élevée en présence de fibres et fortement réduite en cas d'injection d'antibiotique.

Malgré un nombre de reads réduit, la Flongle retrouve une abondance relative des différents phyla bactériens similaire dans l'ensemble des groupes à celle de la MinION (Figure 13).



**Figure 13 : abondance relative des différents phyla bactérien dans le microbiote fécal murin des différents groupes étudiés.**  
*FR = régime supplémenté en fibres ; FF = régime sans fibres ; + CPE = exposée à la souche KPL0.2 (K. pneumoniae NDM-1) dans l'eau de boisson pendant 24 heures au 15ème jour. ; + CLI = injection de clindamycine aux 14ème et 21ème jours.*

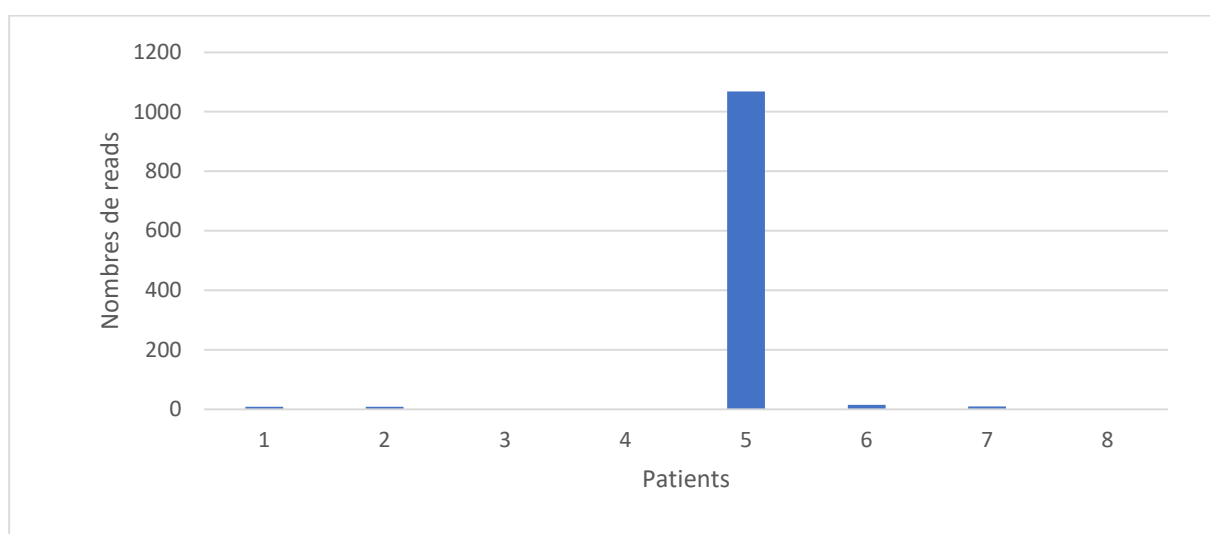
## Etude du microbiote fécal humain en réanimation

Pour le microbiote fécal humain, nous avons comparé deux méthodes de prélèvement. Nous avons mis en œuvre un premier protocole d'analyse réalisé à partir d'un prélèvement par écouvillonnage rectal E-Swab. Nous avons ensuite proposé une version améliorée de ce protocole que nous avons appliqué aux prélèvements de selles.

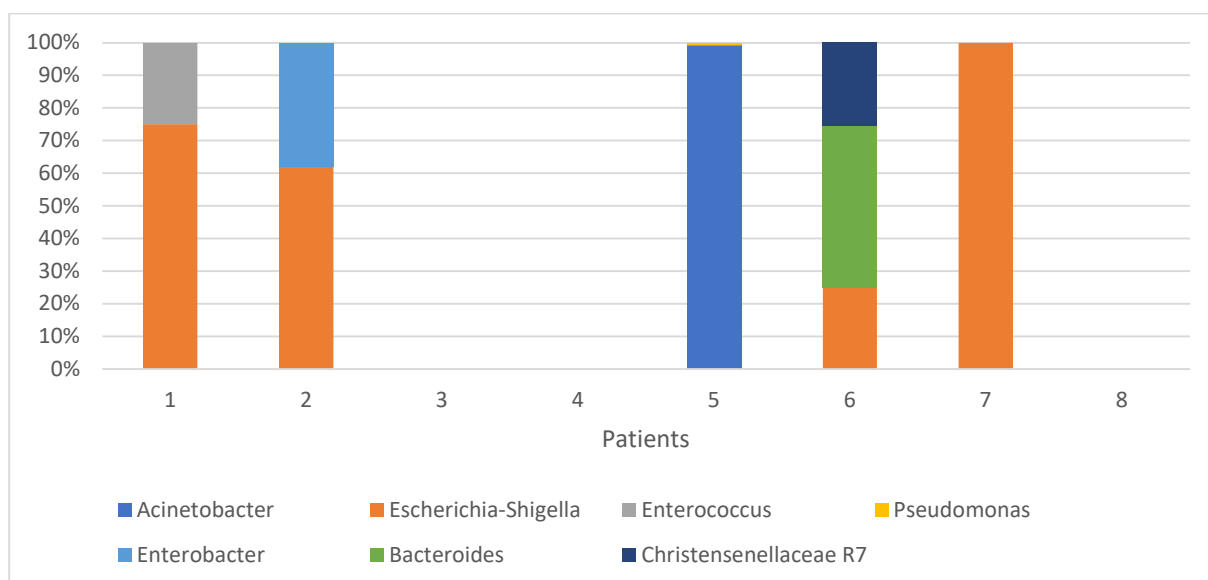
### *Rendement des échantillons E-Swab sur MinION R9.4.1*

Nous avons débuté par l'analyse du microbiote prélevé par écouvillonnage rectal. Nous avons réalisé deux séries d'analyses successives, la première avec 8 échantillons puis une seconde de 14 échantillons.

Au cours de la première analyse un seul échantillon, le n°5, a obtenu 1068 reads contre seulement 8, 8, 9 et 13 reads pour 4 autres échantillons et 0 reads pour les trois derniers échantillons (Figure 14). Sept genres bactériens ont été identifiés au total, avec une abondance relative variable selon les échantillons (Figure 15). Les reads de l'échantillon n°5 sont issus à 99,2% du genre *Acinetobacter*. Cette patiente était colonisée par *Acinetobacter baumannii* producteur de carbapénémase OXA-23.

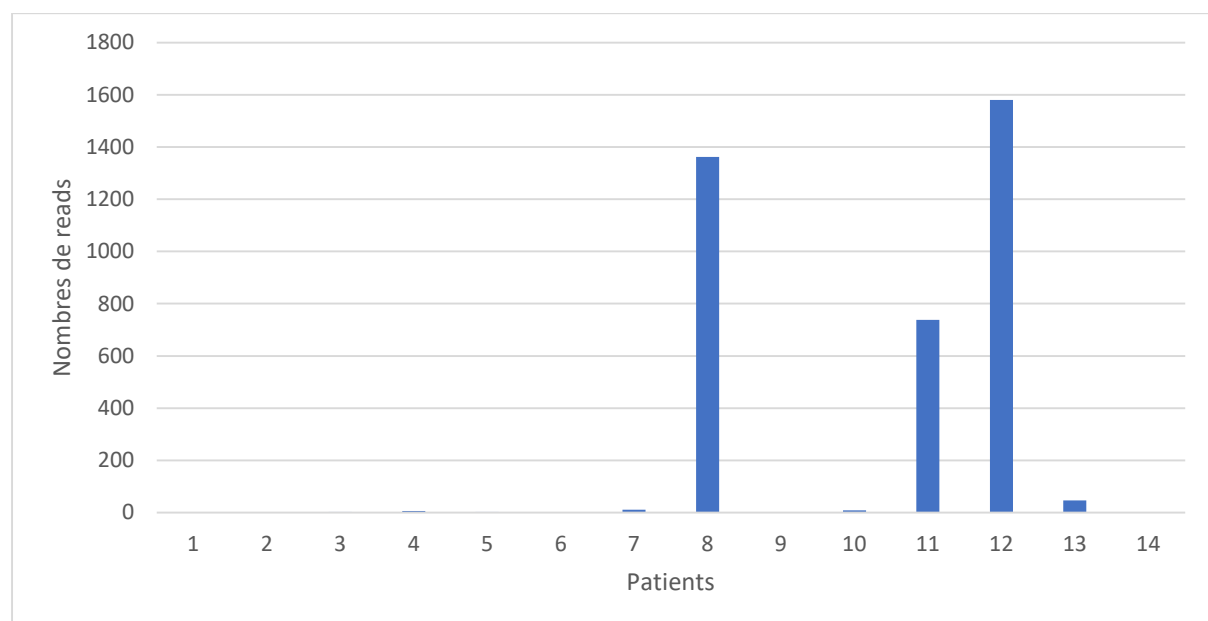


*Figure 14 : Nombre de reads obtenus dans chaque échantillon de la première analyse par écouvillonnage.*



*Figure 15 : Abondance relative des différents genres identifiés dans chaque échantillon de la première analyse par écouvillonnage.*

Une seconde analyse est effectuée sur un total de 14 échantillons avec un protocole similaire, à l'exception du nombre de cycles de PCR qui avait été augmenté, passant de 30 cycles à 35 cycles pour l'étape d'amplification. Seuls 4 échantillons obtiennent un nombre de reads suffisant (Figure 16) : les numéros 8 (1362 reads), 11 (738 reads), 12 (1580 reads) et 13 (46 reads). 10 genres ont été identifiés au total, avec une répartition extrêmement variable entre les individus (Figure 17).



*Figure 16 : Nombre de reads obtenus dans chaque échantillon de la seconde analyse par écouvillonnage.*

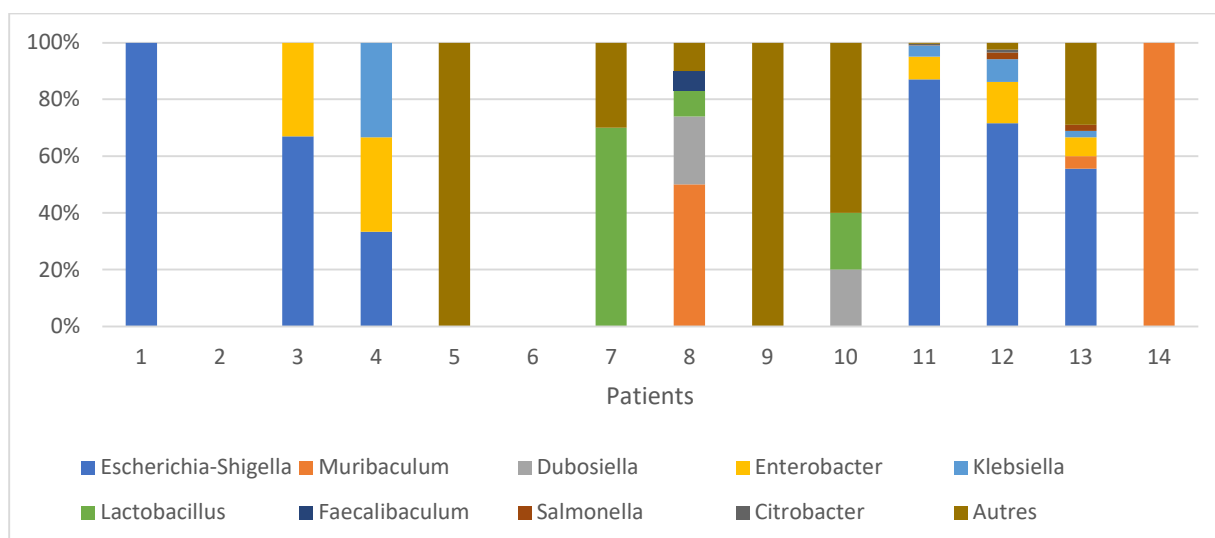


Figure 17 : Abondance relative des différents genres identifiés dans chaque échantillon de la seconde analyse par écouvillonnage.

### Rendement des échantillons de fèces sur Flongle R10.4.1

Pour les prélèvements de selles, le protocole a été optimisé (PCR 35 cycles, quantification Qubit, chimie R10.4.1), mais l'analyse a été réalisée sur une cellule Flongle (FLO-FLG114) pour des raisons de coût et de faisabilité. Les deux séries eSwab avaient été séquencées sur MinION (FLO-MIN114) en R9.4.1. Compte tenu du nombre de pores garantis (50 pour Flongle vs  $\geq 800$  pour MinION) et du débit théorique (2,8 Gb vs 50 Gb), un nombre de reads plus faible était attendu sur la série "selles".

Le nombre de reads obtenus varie de 4 à 706 par échantillon avec une moyenne de 197 (Figure 18). Parmi les 8 échantillons avec plus de 10 reads, 10 genres sont identifiés avec des abondances relatives variable dont la variété n'est pas corrélée au nombre de reads. Le patient n°8 était colonisé par *Enterobacter hormaechei* et *Enterobacter aerogenes* producteurs de carbapénémases OXA-48 ; *Enterobacter* représentait 27% des reads analysés (Figure 19).

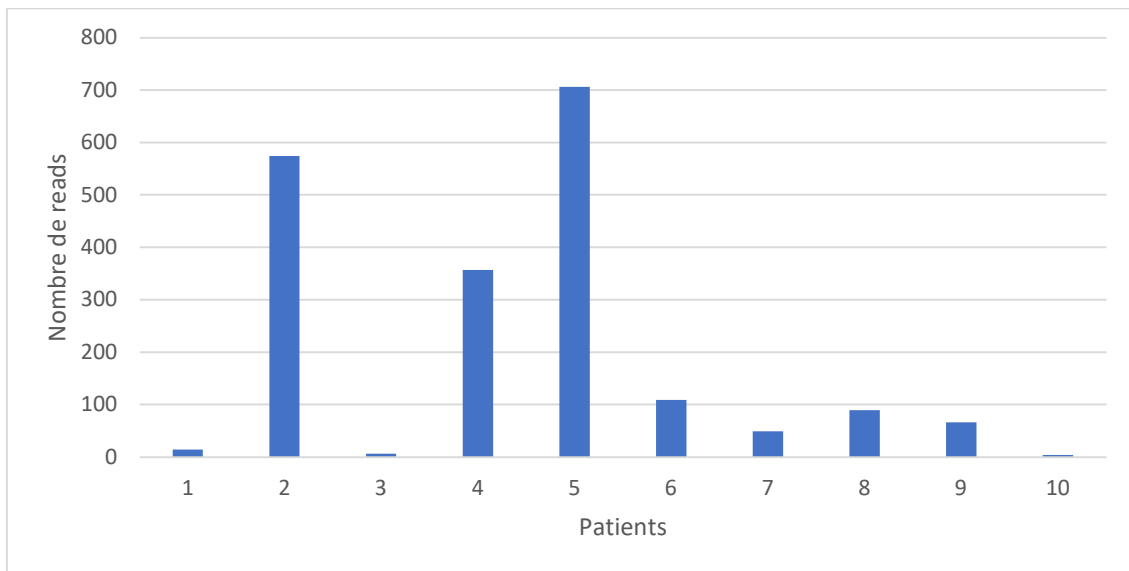


Figure 18 : Nombre de reads obtenus par échantillon de l'analyse sur selles.

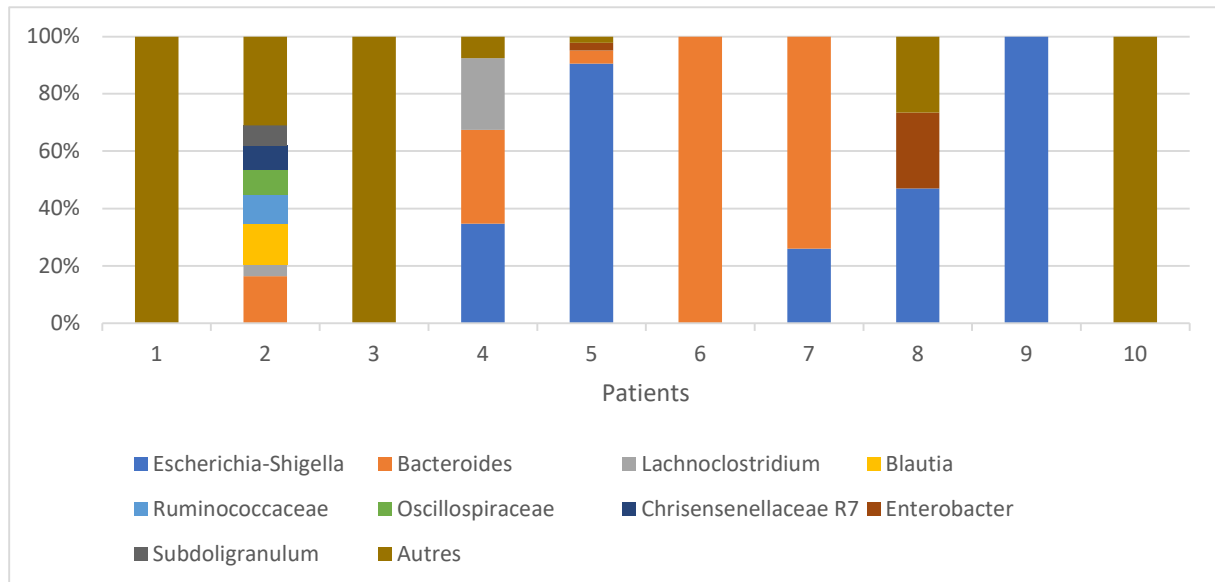


Figure 19 : Abondance relative des différents genres identifiés par échantillon de l'analyse sur selles.



## Discussion

Ce travail a permis de développer un protocole d'analyse du microbiote fécal par séquençage Nanopore, spécifiquement adapté au contexte de la réanimation. Nos analyses préliminaires ont mis en évidence la supériorité des prélèvements de selles par rapport aux écouvillons.

### Technologie de séquençage

L'un des avantages majeurs de la technologie nanopore réside dans sa rapidité de mise en œuvre. La littérature montre comment son utilisation en routine clinique permet la détection de pathogènes en quelques heures seulement contre plusieurs jours avec les technologies usuelles.<sup>126</sup> Une étude comparant les technologies ONT, Illumina et la détection par MALDI-TOF chez 67 patients atteints de septicémie rapporte 100% de concordance dans l'identification de pathogènes et 92% dans l'identification de gènes de résistance.<sup>127</sup> Le temps de mise en œuvre est une différence majeure entre ces technologies : les résultats ont été obtenus en 3h30 seulement par le séquençage nanopore contre 50h30 avec Illumina, pour un coût largement réduit. Un tel gain de temps permet de mettre en place un suivi en temps réel de la charge bactérienne et de l'émergence de résistance au cours d'une antibiothérapie ou encore de l'évolution du microbiote au cours d'une hospitalisation et de la mise en œuvre de différents traitements, en particulier une transplantation de microbiote fécal. Une adaptation dynamique des traitements devient possible en routine clinique et ouvre la voie à une meilleure prise en charge des patients.

### Méthode d'échantillonnage

De nombreuses techniques de prélèvement du microbiote intestinal ont été décrites dans la littérature, avec un caractère invasif variable.<sup>128</sup> Les deux principales techniques non invasives les plus courantes sont l'écouvillonnage rectal et le

prélèvement de fèces. Il est bien établi que ces deux approches n'explorent pas les mêmes composantes du microbiote : l'écouvillonnage rectal prélève une combinaison de microbiote luminal et mucosal, là où un échantillon de fèces est essentiellement composé de microbiote luminal.<sup>129</sup> C'est pour cela que l'utilisation d'écouvillons rectaux n'est recommandée qu'en cas d'impraticabilité du prélèvement de fèces. D'autres études ont montré l'absence de différence significative entre les deux techniques, en particulier concernant les scores de diversité alpha et bêta.<sup>130</sup>

Il convient de noter que ces résultats ont principalement été obtenus avec des techniques de séquençage de nouvelle génération de type Illumina. Or, une étude comparative récente sur l'écouvillonnage de microbiotes buccaux et rectaux montre que ces protocoles ne peuvent pas être transposés tels quels à la technologie nanopore.<sup>131</sup> Ils nécessitent une revalidation complète de la chaîne analytique : conditions d'échantillonnage et de stockage, extraction de l'ADN, construction de bibliothèques et classification bioinformatique. Parallèlement, de nouveaux protocoles d'exploitation des fèces via la technologie Nanopore ont été proposés.<sup>132</sup>

Nos résultats confirment la nécessité d'adapter les protocoles existants au séquençage nanopore. Le nombre de reads obtenu avec des écouvillons eSwab est insuffisant pour analyser correctement le microbiote des patients. Cela peut être dû à plusieurs limitations pratiques : la localisation du prélèvement et la charge de l'écouvillon doivent être de bonne qualité, le milieu de conservation fourni par les fabricants d'écouvillons peut avoir un impact sur l'exploitation du prélèvement et enfin les différents kits d'extraction disponible peuvent être inadaptés à la technologie Nanopore. L'usage de fèces nous a permis une meilleure analyse du microbiote. Or, la charge bactérienne d'un échantillon de fèces est bien supérieure à celle d'un écouvillon et celui-ci ne nécessite pas de milieu de conservation spécifique, limitant les risques d'interférences.

Il convient également de souligner que la série « selles » a été séquencée sur Flongle (FLO-FLG114, chimie R10.4.1), tandis que les deux séries « écouvillons » l'ont été sur MinION (FLO-MIN114, chimie R9.4.1). Compte tenu du nombre de pores actifs garanti (50 vs 800) et du débit théorique (2,8 Gb vs 50 Gb), un nombre de lectures (reads) plus faible pour les échantillons de selles était attendu, indépendamment des autres différences de protocole (type de matrice, 30 vs 35 cycles PCR, quantification  $\mu$ Drop vs Qubit, chimie R9.4.1 vs R10.4.1). Cette différence de plateforme constitue donc un facteur de confusion pour la comparaison brute des profondeurs entre matrices. Au regard de cette différence de plateforme, nos résultats sur selles sont en réalité conservateurs : réalisés sur Flongle pour les selles, ils constituent une borne inférieure du rendement. À protocole identique sur MinION, on peut raisonnablement s'attendre à une multiplication d'un facteur 20 du nombre de reads (rapport de pores actifs et de débit), faisant mécaniquement passer d'un signal de quelques centaines à plusieurs milliers de reads par échantillon. En pratique, ce gain devrait résorber la majorité des cas  $< 10$  reads, améliorer la détection des genres peu abondants, stabiliser les indices de diversité (alpha/bêta) et renforcer la robustesse des assignations. Cette projection confirme l'intérêt des selles comme matrice préférentielle pour la suite, idéalement avec des séries appariées sur une même cellule de flux pour des comparaisons non biaisées.

Face à ces résultats il paraît donc plus pertinent de recommander l'utilisation de selles au cours des essais à venir, dès lors que cela est possible sur le plan logistique.

### Cellule de flux

Les cellules de flux Flongle et MinION, toutes deux produites et commercialisées par Oxford Nanopore Technologies, diffèrent respectivement par leurs nombres de pores minimums (50 contre 800), la quantité de données produite

(2,8Gb contre 50Gb) et leur prix catalogue (68€ contre 700€). La cellule de flux MinION est par ailleurs réutilisable plusieurs fois avant que le nombre de pores disponibles ne chute.

Plusieurs études ont comparé ces cellules entre elles ainsi qu'avec d'autres technologies de séquençage.<sup>133,134</sup> Une étude publiée en 2023 par Cuber *et al.*<sup>134</sup> faisant la comparaison entre séquençage Sanger, PacBio SMRT Cell 1 M, Flongle R9.4.1, MinION R9.4.1 et MinION R10.4 a montré que la Flongle présente un taux d'erreur de démultiplexage de 16.82%–49.26% contre 7.27%–8.18% pour la MinION R10.4 ce que les auteurs estiment comme acceptable dans un objectif d'identification taxonomiques, à un coût largement inférieur. Il est probable que l'écart entre une Flongle et une MinION utilisant la même chimie R10.4, comme présenté dans nos travaux, soit par ailleurs moins élevé.

Une autre étude, publiée en 2021 par Jeck *et al.*<sup>133</sup> a comparé les technologies Flongle, MinION et Illumina appliqués à la recherche de gènes de fusion dans 15 prélèvements tumoraux. Ils rapportent une profondeur plus élevée de 467% en moyenne avec l'utilisation d'une Flongle comparée une MinION. Aucun faux positif (contre un avec la cellule MinION) et 2 faux négatifs contre 3 en MinION. Illumina reste pour les auteurs le gold standard mais présente un intérêt supplémentaire réduit.

Nos travaux confirment bien une amélioration du nombre de reads exploitables avec la chimie R10.4, comparativement à la R9.4.1. Ils semblent par ailleurs indiquer une efficacité suffisante de la Flongle pour séquencer le microbiote fécal. Cependant des analyses complémentaires seront encore nécessaires pour optimiser leur rendement et confirmer ces résultats préliminaires. L'approfondissement de ce travail permettra de cartographier avec précision le microbiote des patients hospitalisés en réanimation. Il sera alors possible de poursuivre les études menées précédemment

dans un modèle murin sur le rôle des fibres alimentaires sur la colonisation par des bactéries multi-résistantes et le risque infectieux associé.

### Pipelines bio-informatiques

La transformation des données brutes en information exploitable passe par plusieurs étapes. Après le basecalling réalisé par Dorado, le logiciel propriétaire de ONT, l'alignement des séquences peut s'appuyer sur différentes bases de données. Dans ce travail nous avons utilisé la base SILVA : elle répertorie à la fois les petites (16S/18S) et grandes (23S/28S) sous-unités d'ARN ribosomique (ARNr) et est, à ce jour, la plus fréquemment employée. Mais d'autres bases comme le Ribosomal Database Project, NCBI 16S ou Greengenes peuvent présenter un intérêt. Cette dernière par exemple est plus légère, elle ne contient que de l'ARNr 16S, ce qui accélère l'identification des espèces et permet de réduire d'autant le temps entre l'envoi d'une demande par le clinicien et la formulation d'une réponse par le biologiste.

Il faut cependant noter qu'elle présente des mises à jour moins régulières. Or la qualité des données présentes dans la base est un paramètre essentiel pour obtenir une assignation taxonomique fiable des reads. On retrouve dans la littérature la démonstration que le choix d'une base de données influe sur les résultats obtenus<sup>135</sup> et des recommandations ont été publiées pour limiter les biais qu'un choix inapproprié serait en mesure d'induire.<sup>136</sup>

### Limites de l'étude

Plusieurs limites restent à souligner dans notre travail et ouvrent autant de perspectives. La taille, restreinte, de la cohorte et son hétérogénéité ne permet pas d'atteindre la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats formels.<sup>137</sup> Cet échantillon reste cependant parfaitement adapté à la mise au point des techniques de

laboratoires et nous permet d'élaborer un protocole de travail robuste qui, appliqué à un plus grand nombre de patients, permettra la production de résultats exploitables.

Si les différents protocoles testés diffèrent par plusieurs aspects, tous utilisent un kit et une procédure d'extraction d'ADN similaire. Ceux-ci sont en effet largement utilisés dans la littérature et leurs efficacités n'ont pas eu à être remises en question au cours de notre travail, que ce soit dans l'exploitation des écouvillons ou des selles. Il reste cependant envisageable d'en expérimenter d'autres à l'avenir, en fonction de l'évolution des offres commerciales disponibles et de la littérature.

Le séquençage nanopore tel que nous l'avons mis en œuvre dans ce travail produit une information exclusivement taxonomique. Elle nous permet de confirmer la présence de différents genres bactériens et leurs abondances relatives mais ne nous procure aucune donnée fonctionnelle. Une première adaptation du protocole de séquençage serait en mesure de générer des données épigénétiques comme cela a déjà été publié<sup>138,139</sup> mais une analyse métabolomique plus large requerrait de revoir les différentes étapes pré-analytiques.<sup>140</sup> Il serait en particulier recommandé de réaliser une congélation immédiate des échantillons par azote liquide puis de les maintenir à -80°C afin d'améliorer la conservation des métabolites d'intérêt<sup>141</sup>, dont la stabilité est généralement largement inférieure à celle de l'ADN.

## Conclusion

L'étude du microbiote est complexe par sa nature, sa variété et son évolution dynamique. La mise au point des techniques d'exploration est donc une étape cruciale qui nous a permis de répondre à plusieurs questions essentielles.

En pré-analytique, les selles se révèlent supérieures aux écouvillons rectaux pour obtenir un signal exploitable. Sur le plan analytique, nous confirmons la faisabilité du séquençage 16S par Nanopore et montrons que, dans notre configuration, une cellule de flux Flongle associée à la chimie R10.4 est suffisante pour une première approche, fournissant des assignations cohérentes et reproductibles avec le pipeline informatique actuel. Il faut toutefois souligner que les analyses sur selles ont été réalisées sur Flongle alors que celles sur écouvillons l'ont été sur MinION : nos rendements sur selles sont donc conservateurs. À protocole identique, un passage sur MinION permet théoriquement d'augmenter d'un facteur 20 le nombre de reads (rapport pores/débit), ce qui devrait réduire fortement les échantillons non exploitables, améliorer la détection des taxons peu abondants et stabiliser les indices de diversité.

Ce travail de validation méthodologique constitue une étape indispensable et jette les bases d'une future étude prospective de plus grande envergure. L'application de ce protocole optimisé permettra d'évaluer avec précision l'impact d'interventions nutritionnelles, comme la supplémentation en fibres, sur le risque de colonisation par des bactéries multirésistantes chez les patients de réanimation, et d'explorer de nouvelles stratégies pour préserver l'homéostasie intestinale dans ce contexte critique.

## Bibliographie

1. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
2. Matijašić, M. *et al.* Gut Microbiota beyond Bacteria—Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int J Mol Sci* **21**, 2668 (2020).
3. Rosenberg, E. Diversity of bacteria within the human gut and its contribution to the functional unity of holobionts. *npj Biofilms Microbiomes* **10**, 134 (2024).
4. Martino, C. *et al.* Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. *Nat Rev Microbiol* **20**, 707–720 (2022).
5. Almeida, A. *et al.* A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* **39**, 105–114 (2021).
6. Ma, J., Yang, X. & He, J. Comprehensive gut microbiota composition and microbial interactions among the three age groups. *PLOS ONE* **19**, e0305583 (2024).
7. King, C. H. *et al.* Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLOS ONE* **14**, e0206484 (2019).
8. Walters, K. E. & Martiny, J. B. H. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS One* **15**, e0233872 (2020).
9. Pantazi, A. C. *et al.* Development of Gut Microbiota in the First 1000 Days after Birth and Potential Interventions. *Nutrients* **15**, 3647 (2023).
10. Shao, Y. *et al.* Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* **574**, 117–121 (2019).
11. Rutayisire, E., Huang, K., Liu, Y. & Tao, F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterology* **16**, 86 (2016).



12. Zhang, C. *et al.* The Effects of Delivery Mode on the Gut Microbiota and Health: State of Art. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
13. Dubois, L. *et al.* Paternal and induced gut microbiota seeding complement mother-to-infant transmission. *Cell Host Microbe* **32**, 1011-1024.e4 (2024).
14. Jandhyala, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* **21**, 8787–8803 (2015).
15. Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P. & Lapaque, N. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc Nutr Soc* **80**, 37–49 (2021).
16. Donohoe, D. R. *et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* **13**, 517–526 (2011).
17. Mann, E. R., Lam, Y. K. & Uhlig, H. H. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. *Nat Rev Immunol* **24**, 577–595 (2024).
18. Das, P., Babaei, P. & Nielsen, J. Metagenomic analysis of microbe-mediated vitamin metabolism in the human gut microbiome. *BMC Genomics* **20**, 208 (2019).
19. Roberts, M. S., Magnusson, B. M., Burczynski, F. J. & Weiss, M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **41**, 751–790 (2002).
20. Rowland, I. *et al.* Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* **57**, 1–24 (2018).
21. Pant, A., Maiti, T. K., Mahajan, D. & Das, B. Human Gut Microbiota and Drug Metabolism. *Microb Ecol* **86**, 97–111 (2023).
22. Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R. & Núñez, G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev* **279**, 70–89 (2017).

23. Ulluwishewa, D. *et al.* Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr* **141**, 769–776 (2011).
24. Lutgendorff, F., Akkermans, L. M. A. & Söderholm, J. D. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr Mol Med* **8**, 282–298 (2008).
25. Lui, J. B., Devarajan, P., Teplicki, S. A. & Chen, Z. Cross-differentiation from the CD8 lineage to CD4 T cells in the gut-associated microenvironment with a nonessential role of microbiota. *Cell Rep* **10**, 574–585 (2015).
26. Perez, R. *et al.* Sodium butyrate upregulates Kupffer cell PGE2 production and modulates immune function. *J Surg Res* **78**, 1–6 (1998).
27. Yip, W. *et al.* Butyrate Shapes Immune Cell Fate and Function in Allergic Asthma. *Front Immunol* **12**, 628453 (2021).
28. Erny, D. *et al.* Microbiota-derived acetate enables the metabolic fitness of the brain innate immune system during health and disease. *Cell Metab* **33**, 2260-2276.e7 (2021).
29. Al Nabhani, Z. *et al.* A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. *Immunity* **50**, 1276-1288.e5 (2019).
30. Borbet, T. C. *et al.* Influence of the early-life gut microbiota on the immune responses to an inhaled allergen. *Mucosal Immunol* **15**, 1000–1011 (2022).
31. Ivanov, I. I. *et al.* Specific microbiota direct the differentiation of Th17 cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4**, 337–349 (2008).
32. Poto, R. *et al.* The Role of Gut Microbiota and Leaky Gut in the Pathogenesis of Food Allergy. *Nutrients* **16**, 92 (2023).
33. Chakraborty, P., Banerjee, D., Majumder, P. & Sarkar, J. Gut microbiota nexus: Exploring the interactions with the brain, heart, lungs, and skin axes and their effects on health. *Medicine in Microecology* **20**, 100104 (2024).

34. Góralczyk-Bińkowska, A., Szmajda-Krygier, D. & Kozłowska, E. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Psychiatric Disorders. *Int J Mol Sci* **23**, 11245 (2022).
35. Wang, Q., Yang, Q. & Liu, X. The microbiota-gut-brain axis and neurodevelopmental disorders. *Protein Cell* **14**, 762–775 (2023).
36. Wang, H.-X. & Wang, Y.-P. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin Med J (Engl)* **129**, 2373–2380 (2016).
37. Forsythe, P., Bienenstock, J. & Kunze, W. A. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Adv Exp Med Biol* **817**, 115–133 (2014).
38. Kaelberer, M. M. *et al.* A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science* **361**, eaat5236 (2018).
39. Chen, Y., Xu, J. & Chen, Y. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients* **13**, 2099 (2021).
40. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A. & Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* **17**, 219–232 (2017).
41. Marcari, A. B., Paiva, A. D., Simon, C. R. & Dos Santos, M. E. S. M. Leaky Gut Syndrome: An Interplay Between Nutrients and Dysbiosis. *Curr Nutr Rep* **14**, 25 (2025).
42. Dessein, R. *et al.* Antibiotic-related gut dysbiosis induces lung immunodepression and worsens lung infection in mice. *Crit Care* **24**, 611 (2020).
43. George, F. *et al.* Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front Microbiol* **9**, 2899 (2018).
44. Suez, J., Zmora, N., Segal, E. & Elinav, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat Med* **25**, 716–729 (2019).
45. Gupta, K. *et al.* Fecal Microbiota Transplant in Recurrent Clostridium Difficile Infections: A Systematic Review. *Cureus* **14**, e24754 (2022).

46. Martin, R. M. & Bachman, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* **8**, 4 (2018).
47. Le Guern, R. *et al.* Gut colonisation with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* worsens *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Nat Commun* **14**, 78 (2023).
48. Guillard, T. & Cambau, E. Une brève histoire des résistances plasmidiques aux quinolones. *Journal des Anti-infectieux* **15**, 1–8 (2012).
49. Yong, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 5046–5054 (2009).
50. Mojica, M. F., Rossi, M.-A., Vila, A. J. & Bonomo, R. A. The urgent need for metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors: an unattended global threat. *Lancet Infect Dis* **22**, e28–e34 (2022).
51. Bonnet, R., Dortet, L., Jeannot, K. & Cattoir, V. *Rapport annuel d'activité 2023 - CNR Résistance aux antibiotiques*. [https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/CNR\\_bilan\\_2022.pdf](https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/CNR_bilan_2022.pdf) (2023).
52. Principe, L. *et al.* Zinc Chelators as Carbapenem Adjuvants for Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Bacteria: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Microb Drug Resist* **26**, 1133–1143 (2020).
53. Chiotos, K. *et al.* Multicenter Study of the Risk Factors for Colonization or Infection with Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Children. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, e01440-17 (2017).
54. Wolff, N. S., Hugenholtz, F. & Wiersinga, W. J. The emerging role of the microbiota in the ICU. *Crit Care* **22**, 78 (2018).

55. Lankelma, J. M. *et al.* Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study. *Intensive Care Med* **43**, 59–68 (2017).
56. Schlechte, J. *et al.* Dysbiosis of a microbiota-immune metasytem in critical illness is associated with nosocomial infections. *Nat Med* **29**, 1017–1027 (2023).
57. Dautzenberg, M. J. D. *et al.* The association between colonization with carbapenemase-producing enterobacteriaceae and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit Care Med* **43**, 1170–1177 (2015).
58. Lortholary, O. *et al.* Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin Infect Dis* **20**, 790–796 (1995).
59. Ojima, M. *et al.* Gut Dysbiosis Associated with Antibiotics and Disease Severity and Its Relation to Mortality in Critically Ill Patients. *Dig Dis Sci* **67**, 2420–2432 (2022).
60. Prechter, F., Katzer, K., Bauer, M. & Stallmach, A. Sleeping with the enemy: *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Crit Care* **21**, 260 (2017).
61. Cibulková, I., Řehořová, V., Hajer, J. & Duška, F. Fecal Microbial Transplantation in Critically Ill Patients—Structured Review and Perspectives. *Biomolecules* **11**, 1459 (2021).
62. Elke, G. *et al.* Enteral versus parenteral nutrition in critically ill patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care* **20**, 117 (2016).
63. Takeaki, S. Probiotic treatment in an intensive care unit: a narrative review. *J Intensive Care* **13**, 31 (2025).
64. Saikrishna, K. *et al.* Study on Effects of Probiotics on Gut Microbiome and Clinical Course in Patients with Critical Care Illnesses. *Microb Ecol* **86**, 1814–1828 (2023).

65. Jones, J. M. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the ‘fiber gap’. *Nutr J* **13**, 34 (2014).
66. *Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles*. <https://www.anses.fr/en/system/files/NUT2012SA0103Ra-2.pdf> (2016).
67. Mao, T., Huang, F., Zhu, X., Wei, D. & Chen, L. Effects of dietary fiber on glycemic control and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Functional Foods* **82**, 104500 (2021).
68. Cai, M., Dou, B., Pugh, J. E., Lett, A. M. & Frost, G. S. The impact of starchy food structure on postprandial glycemic response and appetite: a systematic review with meta-analysis of randomized crossover trials. *Am J Clin Nutr* **114**, 472–487 (2021).
69. Jenkins, D. J. *et al.* Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *Br Med J* **1**, 1392–1394 (1978).
70. Weickert, M. O. & Pfeiffer, A. F. H. Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. *J Nutr* **148**, 7–12 (2018).
71. Dimitriadis, G. D., Maratou, E., Kountouri, A., Board, M. & Lambadiari, V. Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach. *Nutrients* **13**, 159 (2021).
72. Schulze, M. B. *et al.* Fiber and magnesium intake and incidence of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. *Arch Intern Med* **167**, 956–965 (2007).
73. de Munter, J. S. L., Hu, F. B., Spiegelman, D., Franz, M. & van Dam, R. M. Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and systematic review. *PLoS Med* **4**, e261 (2007).

74. Reynolds, A. N. *et al.* Dietary fibre in hypertension and cardiovascular disease management: systematic review and meta-analyses. *BMC Med* **20**, 139 (2022).
75. Schoeneck, M. & Iggman, D. The effects of foods on LDL cholesterol levels: A systematic review of the accumulated evidence from systematic reviews and meta-analyses of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **31**, 1325–1338 (2021).
76. Nie, Y. & Luo, F. Dietary Fiber: An Opportunity for a Global Control of Hyperlipidemia. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 5542342 (2021).
77. Brum, J., Ramsey, D., McRorie, J., Bauer, B. & Kopecky, S. L. Meta-Analysis of Usefulness of Psyllium Fiber as Adjuvant Antilipid Therapy to Enhance Cholesterol Lowering Efficacy of Statins. *Am J Cardiol* **122**, 1169–1174 (2018).
78. Ramezani, F. *et al.* Dietary fiber intake and all-cause and cause-specific mortality: An updated systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Nutr* **43**, 65–83 (2024).
79. Massa, M., Compari, C. & Fisicaro, E. On the mechanism of the cholesterol lowering ability of soluble dietary fibers: Interaction of some bile salts with pectin, alginate, and chitosan studied by isothermal titration calorimetry. *Front Nutr* **9**, 968847 (2022).
80. McRorie, J. W. & McKeown, N. M. Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber. *J Acad Nutr Diet* **117**, 251–264 (2017).
81. Wang, L. *et al.* Soluble and insoluble dietary fiber at different ratios: Hydration characteristics, rheological properties, and ameliorative effects on constipation. *Food Chem X* **24**, 101996 (2024).

82. Yang, W. *et al.* Water-insoluble dietary fiber from walnut relieves constipation through *Limosilactobacillus reuteri*-mediated serotonergic synapse and neuroactive ligand-receptor pathways. *Int J Biol Macromol* **283**, 137931 (2024).
83. Tan, J. K., Macia, L. & Mackay, C. R. Dietary fiber and SCFAs in the regulation of mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* **151**, 361–370 (2023).
84. Akbari, P. *et al.* Galacto-oligosaccharides Protect the Intestinal Barrier by Maintaining the Tight Junction Network and Modulating the Inflammatory Responses after a Challenge with the Mycotoxin Deoxynivalenol in Human Caco-2 Cell Monolayers and B6C3F1 Mice. *J Nutr* **145**, 1604–1613 (2015).
85. Hino, S. *et al.* Low-methoxyl pectin stimulates small intestinal mucin secretion irrespective of goblet cell proliferation and is characterized by jejunum Muc2 upregulation in rats. *J Nutr* **143**, 34–40 (2013).
86. Zenhom, M. *et al.* Prebiotic oligosaccharides reduce proinflammatory cytokines in intestinal Caco-2 cells via activation of PPAR $\gamma$  and peptidoglycan recognition protein 3. *J Nutr* **141**, 971–977 (2011).
87. Lehmann, S. *et al.* In Vitro Evidence for Immune-Modulatory Properties of Non-Digestible Oligosaccharides: Direct Effect on Human Monocyte Derived Dendritic Cells. *PLoS One* **10**, e0132304 (2015).
88. Schatzkin, A. *et al.* Dietary fiber and whole-grain consumption in relation to colorectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Clin Nutr* **85**, 1353–1360 (2007).
89. Bultman, S. J. Molecular pathways: gene-environment interactions regulating dietary fiber induction of proliferation and apoptosis via butyrate for cancer prevention. *Clin Cancer Res* **20**, 799–803 (2014).
90. Sato, Y. *et al.* Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians. *Nature* **599**, 458–464 (2021).



91. Ocvirk, S. & O'Keefe, S. J. D. Dietary fat, bile acid metabolism and colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* **73**, 347–355 (2021).
92. Martínez, I., Kim, J., Duffy, P. R., Schlegel, V. L. & Walter, J. Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLoS One* **5**, e15046 (2010).
93. Davis, L. M. G., Martínez, I., Walter, J., Goin, C. & Hutkins, R. W. Barcoded pyrosequencing reveals that consumption of galactooligosaccharides results in a highly specific bifidogenic response in humans. *PLoS One* **6**, e25200 (2011).
94. Piton, G. *et al.* Enterocyte damage in critically ill patients is associated with shock condition and 28-day mortality. *Crit Care Med* **41**, 2169–2176 (2013).
95. Liu, T. *et al.* Effect of dietary fiber on gut barrier function, gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and clinical outcomes in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **46**, 997–1010 (2022).
96. Fu, Y. *et al.* Relationship Between Dietary Fiber Intake and Short-Chain Fatty Acid-Producing Bacteria During Critical Illness: A Prospective Cohort Study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **44**, 463–471 (2020).
97. Livanos, A. E. *et al.* Rapid gastrointestinal loss of Clostridial Clusters IV and XIVa in the ICU associates with an expansion of gut pathogens. *PLoS One* **13**, e0200322 (2018).
98. Spapen, H. *et al.* Soluble fiber reduces the incidence of diarrhea in septic patients receiving total enteral nutrition: a prospective, double-blind, randomized, and controlled trial. *Clin Nutr* **20**, 301–305 (2001).
99. Cara, K. C., Beauchesne, A. R., Wallace, T. C. & Chung, M. Safety of Using Enteral Nutrition Formulations Containing Dietary Fiber in Hospitalized Critical

- Care Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **45**, 882–906 (2021).
100. McClave, S. A. *et al.* Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.). *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **40**, 159–211 (2016).
  101. Woese, C. R. *et al.* Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **254**, 83–86 (1975).
  102. Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088–5090 (1977).
  103. Wang, L.-T., Lee, F.-L., Tai, C.-J. & Kasai, H. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1846–1850 (2007).
  104. Bivand, J. M. *et al.* Broad-range amplification and sequencing of the rpoB gene: a novel assay for bacterial identification in clinical microbiology. *J Clin Microbiol* **62**, e0026624 (2024).
  105. Gilbert, W. & Maxam, A. The nucleotide sequence of the lac operator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3581–3584 (1973).
  106. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467 (1977).
  107. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* **26**, 1135–1145 (2008).
  108. Schadt, E. E., Turner, S. & Kasarskis, A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* **19**, R227–240 (2010).
  109. Hon, T. *et al.* Highly accurate long-read HiFi sequencing data for five complex genomes. *Sci Data* **7**, 399 (2020).

110. Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D. & Deamer, D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13770–13773 (1996).
111. Beckett, A. H., Cook, K. F. & Robson, S. C. A pandemic in the age of next-generation sequencing. *Biochem (Lond)* **43**, 10–15 (2021).
112. Gouaux, E.  $\alpha$ -Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: An Archetype of  $\beta$ -Barrel, Channel-Forming Toxins. *Journal of Structural Biology* **121**, 110–122 (1998).
113. Braha, O. *et al.* Designed protein pores as components for biosensors. *Chem Biol* **4**, 497–505 (1997).
114. Howorka, S. & Siwy, Z. Nanopore analytics: sensing of single molecules. *Chem Soc Rev* **38**, 2360–2384 (2009).
115. Li, J. *et al.* Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature* **412**, 166–169 (2001).
116. Wharton, J. E. *et al.* A method for reproducibly preparing synthetic nanopores for resistive-pulse biosensors. *Small* **3**, 1424–1430 (2007).
117. Siwy, Z. S. & Davenport, M. Making nanopores from nanotubes. *Nat Nanotechnol* **5**, 174–175 (2010).
118. Zhang, T. *et al.* Nanopore sequencing: flourishing in its teenage years. *J Genet Genomics* **51**, 1361–1374 (2024).
119. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* **39**, 1348–1365 (2021).
120. Pichler, M. *et al.* A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. *Microbiologyopen* **7**, e00611 (2018).
121. Johnson, J. S. *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun* **10**, 5029 (2019).

122. Winand, R. *et al.* TARGETING THE 16S RRNA GENE FOR BACTERIAL IDENTIFICATION IN COMPLEX MIXED SAMPLES: COMPARATIVE EVALUATION OF SECOND (ILLUMINA) AND THIRD (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES) GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGIES. *Int J Mol Sci* **21**, 298 (2019).
123. Luo, J. *et al.* Systematic benchmarking of nanopore Q20+ kit in SARS-CoV-2 whole genome sequencing. *Front Microbiol* **13**, 973367 (2022).
124. Bejaoui, S. *et al.* Comparison of Illumina and Oxford Nanopore sequencing data quality for *Clostridioides difficile* genome analysis and their application for epidemiological surveillance. *BMC Genomics* **26**, 92 (2025).
125. Rapid 16S Metagenomic Library Preparation for Oxford Nanopore Technologies (ONT)® Platform.
126. Gorzynski, J. E. *et al.* Ultrarapid Nanopore Genome Sequencing in a Critical Care Setting. *N Engl J Med* **386**, 700–702 (2022).
127. Gu, W. *et al.* The performance of nanopore sequencing in rapid detection of pathogens and antimicrobial resistance genes in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* **111**, 116720 (2025).
128. Tang, Q. *et al.* Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 151 (2020).
129. Jones, R. B. *et al.* Inter-niche and inter-individual variation in gut microbial community assessment using stool, rectal swab, and mucosal samples. *Sci Rep* **8**, 4139 (2018).
130. Radhakrishnan, S. T. *et al.* Rectal swabs as a viable alternative to faecal sampling for the analysis of gut microbiota functionality and composition. *Sci Rep* **13**, 493 (2023).

131. Ammer-Herrmenau, C. *et al.* Comprehensive Wet-Bench and Bioinformatics Workflow for Complex Microbiota Using Oxford Nanopore Technologies. *mSystems* **6**, e0075021 (2021).
132. Maghini, D. G., Moss, E. L., Vance, S. E. & Bhatt, A. S. Improved high-molecular-weight DNA extraction, nanopore sequencing and metagenomic assembly from the human gut microbiome. *Nat Protoc* **16**, 458–471 (2021).
133. Jeck, W. R., Iafrate, A. J. & Nardi, V. Nanopore Flongle Sequencing as a Rapid, Single-Specimen Clinical Test for Fusion Detection. *J Mol Diagn* **23**, 630–636 (2021).
134. Cuber, P. *et al.* Comparing the accuracy and efficiency of third generation sequencing technologies, Oxford Nanopore Technologies, and Pacific Biosciences, for DNA barcode sequencing applications. *Ecological Genetics and Genomics* **28**, 100181 (2023).
135. Sierra, M. A. *et al.* The Influences of Bioinformatics Tools and Reference Databases in Analyzing the Human Oral Microbial Community. *Genes (Basel)* **11**, 878 (2020).
136. Chorlton, S. D. Ten common issues with reference sequence databases and how to mitigate them. *Front Bioinform* **4**, 1278228 (2024).
137. Wang, X. & Kattan, M. W. Cohort Studies: Design, Analysis, and Reporting. *Chest* **158**, S72–S78 (2020).
138. Liu, L. *et al.* Recent Advances in the Genomic Profiling of Bacterial Epigenetic Modifications. *Biotechnol J* **14**, e1800001 (2019).
139. Galeone, V. *et al.* Decoding bacterial methylomes in four public health-relevant microbial species: nanopore sequencing enables reproducible analysis of DNA modifications. *BMC Genomics* **26**, 394 (2025).

140. Chen, M. X., Wang, S.-Y., Kuo, C.-H. & Tsai, I.-L. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *J Formos Med Assoc* **118 Suppl 1**, S10–S22 (2019).
141. Smirnov, K. S. *et al.* Challenges of metabolomics in human gut microbiota research. *Int J Med Microbiol* **306**, 266–279 (2016).

**AUTEUR : Nom : GEOFFRE**

**Prénom : Nicolas**

**Date de soutenance : 24/09/2025**

**Titre de la thèse : Développement et validation d'un protocole de séquençage pour l'analyse du microbiote intestinal en réanimation**

**Thèse - Médecine - Lille 2025**

**Cadre de classement : microbiologie moléculaire**

**DES : Biologie médicale**

**Mots-clés : microbiote, nanopore, séquençage, fibres alimentaires, dysbiose**

**Contexte :** Les fibres alimentaires modifient la composition et les fonctions du microbiote intestinal, favorisent certaines espèces commensales et participent à l'homéostasie colique. Des travaux précliniques menés par notre laboratoire ont montré l'impact positif de la supplémentation en acide gras à chaîne courte sur l'axe intestin-poumon dans un modèle murin. Afin de transposer cette approche en réanimation, nous avons développé et validé un protocole de séquençage 16S par nanopore.

**Méthode :** Dans un modèle murin, des selles ont été séquencées avec deux types de cellules de flux ONT (MinION et Flongle). En réanimation, trois séries d'échantillons humains ont été analysées : deux séries d'écouvillons rectaux (protocole initial) et une série de selles (protocole optimisé).

**Résultats :** Chez la souris, Flongle génère moins de lectures que MinION, mais conserve des profils d'abondance et des indices de diversité concordants, suffisants pour une cartographie taxonomique fiable. Chez l'Homme, l'écouvillonnage rectal génère une profondeur souvent insuffisante, alors que les prélèvements de selles couplés au protocole optimisé délivrent un signal exploitable et cohérent.

**Conclusion :** Le séquençage 16S par Nanopore est faisable et informatif en réanimation. Les selles constituent la matrice préférentielle. Flongle suffit pour une première approche, mais MinION est recommandé pour les études prospectives afin d'augmenter la profondeur et la robustesse des analyses.

**Composition du Jury :**

**Président :**

**Pr Rodrigue DESSEIN**

**Assesseurs :**

**Pr Eric KIPNIS**

**Dr Vincent HUIN**

**Directeur de thèse :**

**Dr Rémi LE GUERN**