Université Paris Cité

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC) - ED562

Infection, Anti-microbien, Modélisation, Évolution

INSERM UMR 1137

Résistance à la colonisation du microbiote intestinal par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques

Par **Khanh VILLAGEOIS-TRAN**

Thèse de doctorat en Microbiologie

Dirigée par **Pr Etienne RUPPÉ**

Présentée et soutenue publiquement le 17/12/2025

Devant un jury composé de :

Pr Nicolas VIGNIER	Examinateur
PU–PH, Université Sorbonne Paris Nord	
Pr Florence DOUCET-POPULAIRE	Rapportrice
PU-PH, Université Paris-Saclay	
Dr Pascale SERROR	Rapportrice
DR, Université Paris-Saclay, AgroParisTech	
Dr Philippe GLASER	Examinateur
DR, Université Paris Cité, Institut Pasteur	
Pr Etienne RUPPÉ	Directeur de thèse
PU-PH, Université Paris Cité	

Titre : Résistance à la colonisation du microbiote intestinal par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques

Résumé :

Introduction : Le microbiote intestinal résiste à la colonisation par des bactéries exogènes comme les *Escherichia coli* multirésistantes aux antibiotiques, un phénomène connu sous le nom d'effet barrière ou de résistance à la colonisation. La vitesse de décolonisation des *E. coli* multirésistantes (ERM) a été associée à la composition du microbiote intestinal mais également à des facteurs spécifiques des souches dans des études de preuve de concept. L'objectif de ce travail est d'identifier les bactéries intestinales associées à l'élimination des ERM et d'identifier des traits génomiques des *E. coli* multirésistants leur conférant une plus longue durée de colonisation du microbiote intestinal.

Méthodes : Nous avons analysé 150 échantillons de selles issus de voyageurs inclus dans la cohorte VOYAG-R (ClinicalTrials.gov identifiant NCT01526187) : 75 voyageurs ayant acquis puis éliminé une ERM dans le mois suivant leur retour (témoins) ont été appariés 1 : 1 avec 75 porteurs persistants à un mois (cas), en fonction des concentrations intestinales d'entérobactéries multirésistantes au retour. L'analyse du microbiote a été réalisée par séquençage hybride Illumina (*reads* courts) et nanopores (*reads* longs), permettant la reconstruction d'espèces métagénomiques appelées et une analyse taxonomique au niveau de l'espèce. Des tests de validation *in vitro* ont été réalisés par culture liquide de huit souches de *Bifidobacterium* et 26 souches de *E. coli* multirésistants isolés chez 16 voyageurs, à l'aide de lecteurs automatisés de densité optique. L'ensemble des souches de *E. coli* isolées chez les 150 voyageurs ont été séquencées (au retour, à 1 mois et jusqu'à 12 mois pour les porteurs persistants) par la méthode Illumina. Les souches ont été analysées avec le pipeline bioinformatique de notre unité IAME et nous avons étudié leur phylogroupe, leurs gènes de résistance et leurs gènes de virulence.

Résultats : Aucune différence en termes de diversité alpha n'a été observée entre les deux groupes (richesse, indices de Shannon et de Simpson, respectivement p = 0,25 ; 0,21 et 0,28, test de Wilcoxon). Cependant, les voyageurs ayant éliminé leurs entérobactéries multirésistantes dans le mois suivant présentaient une abondance plus élevée de *Bifidobacterium*, en particulier *B. adolescentis* et *B. longum*. La validation *in vitro* a montré pour une souche de *B. adolescentis* et les surnageants d'une souche de *B. longum*, un effet inhibiteur sur les *E. coli* multirésistants, retardant la phase exponentielle de croissance et/ou réduisant l'inoculum en phase stationnaire. Au total, 478 souches d'*E. coli* ont été séquencées et parmi les 320 souches distinctes, les phylogroupes étaient distribués de manière inégale (test du Chi², $p = 8 \times 10^{-6}$), les souches appartenant aux phylogroupes B2 et D étant plus fréquemment retrouvées en persistance après le retour par rapport aux autres phylogroupes et portaient un nombre plus important de facteurs de virulence (adhésines et systèmes de recapture du fer)

Conclusion : *B. adolescentis* et *B. longum* sont associés à la décolonisation des entérobactéries multirésistantes chez les voyageurs, probablement par des effets spécifiques lié lié à certaines souches à certaines souches. De plus, les souches de *E. coli* multirésistantes arborent un arsenal génomique leur conférant une meilleure adaptabilité au sein du microbiote intestinal favorisant leur persistance.

Mots clés : Microbiote intestinal, Résistance aux antimicrobiens, Résistance à la colonisation, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, Effet barrière, *Escherichia coli*

Title: Colonization resistance of the intestinal microbiota to multidrug-resistant bacteria

Abstract:

Introduction: The intestinal microbiota resists to colonization by exogenous bacteria such as multidrug-resistant *Escherichia coli* (MDR-*E. coli*), a phenomenon known as the colonization resistance or barrier effect. The rate of decolonization of multidrug-resistant *E. coli* (MRE) has been associated with the composition of the intestinal microbiota, as well as with strain-specific factors in proof-of-concept studies. The aim of this work was to identify intestinal bacteria associated with the elimination of MRE and to characterize genomic traits of MDR-*E. coli* that may confer prolonged colonization within the intestinal microbiota.

Methods: We analyzed 150 stool samples from travelers enrolled in the VOYAG-R cohort (ClinicalTrials.gov identifier NCT01526187): 75 travelers who had acquired and subsequently eliminated an MRE within one month after return (controls) were matched 1:1 with 75 persistent carriers at one month (cases), according to intestinal concentrations of MDR-*Enterobacterales* at return. Microbiota analysis was performed using hybrid sequencing combining Illumina short reads and Oxford Nanopore long reads, enabling the reconstruction of metagenome-assembled species and taxonomic profiling at the species level. *In vitro* validation tests were conducted using liquid culture assays of eight *Bifidobacterium* strains and 26 MDR-*E. coli* strains isolated from 16 travelers, with automated optical density monitoring. All *E. coli* strains isolated from the 150 travelers were sequenced (at return, at one month, and up to 12 months for persistent carriers) using the Illumina short reads sequencing. Genomic analyses were performed with the IAME unit's bioinformatics pipeline to determine phylogroups, resistance genes, and virulence genes.

Results: No significant difference in alpha diversity was observed between the two groups (richness, Shannon and Inverse Simpson indices; p = 0.25, 0.21, and 0.28, respectively, Wilcoxon test). However, travelers who cleared their MDR-*Enterobacterales* within one month showed higher abundances of *Bifidobacterium*, particularly *B. adolescentis* and *B. longum*. *In vitro* validation demonstrated that one *B. adolescentis* strain and the supernatant of one *B. longum* strain exhibited inhibitory effects on MDR-*E. coli*, delaying exponential growth and/or reducing stationary-phase inoculum. In total, 478 *E. coli* strains were sequenced, including 320 distinct isolates. Phylogroup distribution was significantly uneven (Chi-square test, $p = 8 \times 10^{-6}$), with phylogroups B2 and D more frequently associated with persistence after return and carrying a higher number of virulence factors (adhesins and iron acquisition factors).

Conclusion: *B. adolescentis* and *B. longum* are associated with the decolonization of MDR-*Enterobacterales* in travelers, likely through strain-specific effects. Moreover, MDR-*E. coli* strains display genomic features that enhance their adaptability within the gut ecosystem, promoting long-term persistence.

Keywords : Intestinal microbiota, Antimicrobial resistance, AMR, Colonization resistance, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, Barrier effect, *Escherichia coli*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Nicolas Vignier, Président de ce jury, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette soutenance.

Je remercie très sincèrement Professeur Florence Doucet-Populaire et Dr Pascale Serror, qui ont consacré du temps à l'évaluation minutieuse de mon travail.

J'adresse également mes remerciements au Dr Philippe Glaser, pour l'intérêt porté à mes travaux et pour sa présence au sein de ce jury.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Professeur Etienne Ruppé, pour sa confiance, son accompagnement bienveillant et son exigence scientifique. Sa rigueur, sa disponibilité et ses conseils avisés ont guidé chacune des étapes de ce long travail.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble de mes collègues de l'unité IAME, du laboratoire de micrologie de l'hôpital Beaujon et de l'hôpital Avicenne. Travailler à vos côtés a été un véritable plaisir : vos compétences, votre bonne humeur et votre esprit d'équipe ont largement contribué à rendre ces années à la fois enrichissantes et agréables.
Je pense notamment à Rémi, Signara, Viva, Thibaut, Nicolas, Skerdi, Saad, Julie L., Julie M., Marie et Jimmy pour leur aide précieuse pour mener à bien ce projet.

Je n'oublie pas mes amis pour leur présence, leur soutien et leurs encouragements. Vous avez su m'apporter légèreté et motivation aux moments où j'en avais le plus besoin.

Enfin, je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à ma famille.
À mes parents, pour leur amour, leur confiance et leur soutien inconditionnel.
À Aurélien, Paul-Hoan et Tim-Hao.

Et à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse, je vous exprime toute ma gratitude.

Rien de tout cela n'aurait été possible sans vous.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AFT : *accelerated failure time models* ou modèles de durée de vie accélérée
AGCC : acides gras à chaîne courte
ARG : *antibiotic resistance gene* ou gène associé à la résistance aux antibiotiques
ARNr16S: acide ribonucléique ribosomal 16S
ATP: adénosine triphosphate
BLSE : bêta-lactamase à spectre étendu
BMR : bactéries multirésistantes
CDC : *Centers for Disease Control and Prevention* ou Centre de prévention et de contrôle des maladies
C3G : céphalosporines de troisième génération
DO : densité optique
EARS-Net : *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* ou Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
EC : écart-type
E. coli-BLSE : *E. coli* producteurs de BLSE
EMR : entérobactéries multirésistantes
EP-BLSE : entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu
EPC : entérobactéries productrices de carbapénémase
HMO : *human milk oligosaccharides* ou oligosaccharides de lait humain
IMP : Imipenemase
KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LB : Luria-Bertani
LDA : analyse linéaire discriminante
LEfSe : *Linear Discriminant Analysis Effect Size*
LPS : lipopolysaccharide
MAG : *metagenome-assembled genome*
MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight* ou spectrometer de masse
MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MLS : macrolides-lincosamines-streptogramines
MRS : Man, Rogosa, Sharpe
NDM : New-Delhi metallo-bêta-lactamase
NGS : *next-generation sequencing* ou séquençage de nouvelle génération
NTP : nucléoside triphosphates
ONT : Oxford Nanopore Technologies dit « Nanopore »
OXA-48-like : Oxacillinase-48-like carbapenemase
pb : paires de base
PCA : analyse en composantes principales
PCoA : analyse en coordonnées principales
PCR : polymerase chain reaction
RAM : résistance aux antimicrobiens
SNC : système nerveux central

SNE : système nerveux entérique
TDP : probabilité de distance de fréquence des tétra-nucléotides
TMAO : triméthylamine N-oxyde
TMF : transplantation de microbiote fécal
TNF : fréquence des tétra-nucléotides
UA/ml : unités arbitraires par millilitre
UFC/ml : unités formant colonie par millilitre
VAG : v*irulence-associated gene* ou gène associé à la virulence
VFR : *Visiting friends and relatives* ou visite d'amis et de la famille
VIM : Verona integron-encoded metallo-β-lactamase

Sommaire

Liste des abréviations *5*

Sommaire *7*

Liste des figures *10*

Liste des tableaux *12*

I. Introduction *13*

1. La résistance aux antibiotiques à travers le monde **13**

A. Généralités 13

B. Résistance aux bêta-lactamines 13

2. Microbiote intestinal **16**

A. Méthode d'analyse du microbiote 16

B. Composition du microbiote 21

C. Fonctions du microbiote intestinal 24

D. Concept d'eubiose et de dysbiose 27

E. Facteurs influençant le microbiote 29

3. Voyages, microbiote intestinal et acquisition de résistance aux antibiotiques **34**

A. Modification de la composition du microbiome intestinal lors des voyages 34

B. Acquisition des EMR 35

C. Durée de portage des EMR après le voyage 36

Objectif de la thèse *39*

II. Matériels et Méthodes *41*

1. Population **41**

2. Extraction d'ADN total et séquençage **42**

A. Extraction d'ADN à partir des échantillons de selles 42

B. Extraction d'ADN à partir de colonies bactériennes 43

C. Séquençage Illumina 44

D. Séquençage Nanopore 45

3. Analyses bioinformatique et statistique **46**

A. Qualité du séquençage et assemblage des *reads* 46

B. Analyse du microbiote intestinal 47

C. Analyse des souches et MAGs de *E. coli* 50
D. Analyse des souches et MAGs de *Bifidobacterium* 51

4. **Tests de compétition bactérienne *in vitro* 52**

A. Mise au point 52
B. Protocole 63

III. Résultats 66

1. Population de l'étude 66

2. Analyse du microbiote intestinal des voyageurs 68

A. Analyse bioinformatique : qualité du séquençage 68
B. Diversité microbienne des échantillons de selles 69
C. Analyse des MAGs de *Bifidobacterium* 73

3. Fond génétique de *E. coli* associé à la persistance 78

A. Analyse bioinformatique : qualité du séquençage 78
B. Phylogroupes 79
C. Gènes associés à la résistance 80
D. Gènes associés à la virulence 82
E. Analyse des MAGs de *E. coli* 84

4. *B. longum* et *B. adolescentis* associés *in vitro* à l'élimination des EMR 88

A. Résultats généraux 88
B. *B. adolescentis* 2 96
C. *B. longum* 3 100

IV. Discussion 103

1. Voyage et modification du microbiote intestinal 103

2. Effet inhibiteur des *Bifidobacterium* 105

3. Fond génétique des souches de *E. coli* 111

V. Conclusion 115

Bibliographie 116

Travaux soumis et publiés 134

Microbiological determinants associated with intestinal clearance of multidrug-resistant *Escherichia coli* in travelers (article soumis) 134

Collaboration : Microbiote, Réanimation et COVID 175

The role of the microbiota in the management of intensive care patients 175

Oropharyngeal and intestinal concentrations of opportunistic pathogens are independently associated with death of SARS-CoV-2 critically ill adults 176

Annexes 177

Annexe 1 : Protocole librairies DNA Flex Library Prep (Illumina), adapté avec volume divisé par 4 177

Tableau 1. Tableau résumant l'ensemble des associations des souches de Bifidobacterium, test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg 181

Liste des figures

Figure 1 : Principe du séquençage Sanger et du séquençage de nouvelle génération 17
Figure 2 : Méthodes de séquençage de nouvelle génération 20
Figure 3 : Richesse et de diversité bactériennes..... 28
Figure 4 : Variations du microbiote chez les patients en unité de soins intensifs et moyens disponibles pour restaurer la dysbiose 34
Figure 5 : Automate *QIAcube* (Qiagen). 43
Figure 6 : Automate *EZ1 Advanced XL* (Qiagen)..... 44
Figure 7 : Automate *NextSeq550* (Illumina) 45
Figure 8 : *MinION Mk1C*™ (ONT)..... 45
Figure 9 : Processus bioinformatique pour obtenir une table de taxonomie..... 48
Figure 10 : Méthodes des puits..... 55
Figure 11 : Méthode des disques..... 56
Figure 12 : Méthodes d'antagonisme différé 58
Figure 13 : Mise au point des co-culture en microplaque de 96 puits..... 60
Figure 14 : Exemple de courbe de croissance d'une souche de *E. coli* seule et de *E. coli* en co-culture avec des souches de *Bifidobacterium* ou leurs surnageants..... 61
Figure 15 : Exemple de courbe de croissance après dénombrement bactérien 63
Figure 16 : Exemple de plan de microplaque pour les tests de co-cultures bactériennes 65
Figure 17 : Exemple de plan de microplaque pour les tests de co-cultures de surnageants acellulaire de *Bifidobacterium.* 65
Figure 18 : Fréquence de contigs assemblés en fonction de leur taille..... 69
Figure 19 : Indicateurs de diversité alpha..... 69
Figure 20 : PCoA pour les deux groupes de voyageurs..... 70
Figure 21 : LDA des MAGs identifiés par l'analyse LEfSe. 71
Figure 22 : PCA sur les 32 espèces identifiées significatives..... 72
Figure 23 : Abondance relative de *Bifidobacterium* entre les deux groupes de voyageurs ... 73
Figure 24 : Qualité des MAGs de *Bifidobacterium* 74
Figure 25 : Distribution l'abondance relative des MAGs de *Bifidobacterium* de chaque voyageur en comparaison avec le phylogroupe des souches de *E. coli* isolées. 75
Figure 26 : Arbre phylogénétique des MAGs de *Bifidobacterium* 77
Figure 27 : Nombre de souches de *E. coli* séquencées en fonction du temps de suivi 78
Figure 28 : Distribution des phylogroupes des *E. coli* isolés chez les voyageurs 79
Figure 29 : Distribution des ARGs selon les phylogroupes des souches de *E. coli* 80
Figure 30 : Evolution du nombre moyen d'ARGs par souche de *E. coli*..... 80

Figure 31 : Probabilité de co-portage des gènes de résistance aux antibiotiques 81
Figure 32 : Evolution du nombre moyen de VAGs par souche de *E. coli* 83
Figure 33 : Nombre de VAGs en fonction des phylogroupes des souches de *E. coli* 83
Figure 34 : Nombre de VAGs (adhésines, des systèmes de capture du fer, des protectines et des toxines) en fonction des phylogroupes des souches de *E. coli* 84
Figure 35 : Qualité des MAGs de *E. coli* 85
Figure 36 : Durée moyenne de persistance des souches de *E. coli* multirésistantes 87
Figure 37 : Différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à *Bifidobacterium* (souches et surnageants acellulaires) 90
Figure 38 : Effet inhibiteur de *Bifidobacterium* (souches et surnageants acellulaires) 91
Figure 39 : Différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à des souches *Bifidobacterium* 92
Figure 40 : Effet inhibiteur des souches de *Bifidobacterium* 93
Figure 41 : Différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à des surnageants acellulaires de *Bifidobacterium* 95
Figure 42 : Effet inhibiteur des surnageants de *Bifidobacterium* 96
Figure 43 : Différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à *B. adolescentis* 2 97
Figure 44 : Effet inhibiteur de *B. adolescentis* 2 98
Figure 45 : Différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à *B. longum* 3 101
Figure 46 : Effet inhibiteur de *B. longum* 3 102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches de *E. coli* testées expérimentalement 64
Tableau 2 : Caractéristiques des voyageurs inclus dans cette étude 67
Tableau 3 : Qualité d'assemblage des *reads* courts Illumina et des assemblages hybrides . 68
Tableau 4 : Qualité d'assemblage des MAGs de *Bifidobacterium* 74
Tableau 5 : Qualité d'assemblage des souches de *E. coli* 79
Tableau 6 : Probabilité de co-portage des gènes de résistance aux antibiotiques 82
Tableau 7 : Qualité d'assemblage des MAGs de *E. coli* 85
Tableau 8 : Gènes uniquement présents chez *B. adolescentis* CIP64.59T 99

I. Introduction

1. La résistance aux antibiotiques à travers le monde

A. Généralités

La résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance représente plus que jamais un enjeu de santé publique majeur. Les bactéries multirésistantes (BMR) constituent en effet aujourd'hui l'une des principales causes de mortalité dans le monde, avec chaque année environ un million de décès attribués à des infections pour lesquelles les options thérapeutiques sont limitées voire inexistantes, en particulier chez les patients en soins intensifs et dans les régions endémiques (1–3). Parmi les BMR les plus associées à la mortalité, on compte les entérobactéries multirésistantes (EMR) définies comme les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EP-BLSE), les entérobactéries productrices de céphalosporinases plasmidiques et les entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC).

L'antibiorésistance frappe en particulier les populations vulnérables, notamment les personnes économiquement défavorisées, les réfugiés et les migrants. Des études ont montré que les taux de résistance aux antibiotiques et d'antibiothérapie inappropriée sont significativement plus élevés dans ces populations, en raison d'un accès limité aux soins, de conditions de vie précaires (surpeuplement, précarité d'accès à l'eau potable) et d'inégalités socio-économiques (4–6). Un bilan mondial récent souligne l'ampleur du défi : environ 4,95 millions de décès ont été associés à des infections bactériennes résistantes en 2019, dont 1,27 million directement imputables à l'antibiorésistance (7). Les modèles estiment que ce chiffre pourrait atteindre 1,9 million de décès par an d'ici 2050, majoritairement dans les pays à faible et moyen revenus, avec des conséquences sociales et économiques dramatiques (8). Ces inégalités constituent un impératif de santé publique : sans action différenciée, les populations les plus fragiles ne seront ni protégées ni soignées, renforçant ainsi des disparités sanitaires déjà profondes.

B. Résistance aux bêta-lactamines

Les individus apparemment sains peuvent héberger dans leur microbiote intestinal des *E. coli* producteurs de BLSE (*E. coli*-BLSE), ce qui constitue une source silencieuse de transmission communautaire. En 2013, Woerther *et al.* ont montré que le portage intestinal de *E. coli*-BLSE

présentait une prévalence élevée et avait tendance à croître chez les personnes vivant en milieu communautaire (par opposition au milieu de soins) à travers le monde (9). Plus récemment une méta-analyse couvrant la période 2000-2021 a montré que la prévalence globale de portage intestinal de *E. coli*-BLSE dans la population communautaire était estimée à 17,6 % (IC 95 % : 15,3 % – 19,8 %), tandis que le taux dans les milieux hospitaliers atteint 21,1 % (IC 95 % : 19,1 % – 23,2 %) (10). À l'échelle mondiale, le taux de portage intestinal de *E. coli*-BLSE dans la communauté est en forte progression dans toutes les régions du monde : il a été multiplié par 8 au cours des deux dernières décennies, passant d'environ 2,6 % à 26,4 % entre 2001 à 2005 et entre 2016 à 2020. Cette tendance illustre une diffusion massive de *E. coli*-BLSE hors du cadre strictement nosocomial, ce qui n'était pas observé avant les années 2000. Les taux les plus élevés ont été observés en Asie du Sud-Est (27 %), suivie de la région Pacifique occidental (24,5 %), de l'Afrique (21,4 %) et de la Méditerranée orientale (20,6 %). Les prévalences les plus faibles ont été rapportées en Europe (6,0 %). À l'échelle nationale, la prévalence communautaire la plus élevée a été observée en Tanzanie (76,3 %), en Inde (71,5 %) suivies du Vietnam (75,1 %), du Laos (70,2 %), de la Chine (58,5 %), de la Thaïlande (56,1 %), de l'Égypte (45,1 %) et du Liban (38,5 %). L'Australie (1,9 %) et les États-Unis (3,5 %) font partie des pays présentant les prévalences les plus faibles (10,11). Ces taux de colonisation sont en augmentation, avec un taux annuel d'environ 5 %, encore plus élevé dans les régions du Pacifique occidental, d'Asie du Sud-Est, d'Afrique et de Méditerranée orientale. La diffusion des EP-BLSE fait suite à l'émergence et au succès des BLSE de type CTX-M (pour "céfotaximase Münich") (12).

Les EP-BLSE sont résistantes aux bêta-lactamines mais aussi fréquemment à d'autres classes d'antibiotiques, ce qui limite d'autant les options thérapeutiques en cas d'infection (13). En effet, les EP-BLSE présentent des taux élevés de résistance à la ciprofloxacine (> 70 %) et au triméthoprime-sulfaméthoxazole (52,8 %) ou aux aminosides (13,14). Les carbapénèmes, actifs sur les EP-BLSE, sont recommandés pour le traitement des infections graves causées par les EP-BLSE et en constituent l'une des dernières lignes de traitement (15). La diffusion des EP-BLSE dans la communauté et les milieux de soins a ainsi causé une augmentation de la consommation de carbapénèmes, favorisant l'émergence et la diffusion des EPC d'abord en milieux de soins puis désormais dans la communauté.

La diffusion des EPC en communauté constitue une menace encore plus grave pour la santé mondiale que celle déjà causée par les EP-BLSE. Les carbapénémases identifiées chez les entérobactéries appartiennent principalement aux classes A (KPC), B (NDM, VIM, IMP) et D (OXA-48-like) selon la classification d'Ambler. Elles confèrent une résistance à presque toutes les bêta-lactamines, y compris les carbapénèmes, et sont comme pour les EP-BLSE souvent

associées à d'autres mécanismes de résistance (conférant la résistance aux aminosides, fluoroquinolones et à la colistine), rendant les bactéries multirésistantes, voire pan-résistantes (16). Comme les EP-BLSE, les EPC peuvent être responsables d'infections graves, associées à une mortalité élevée et à des options thérapeutiques très limitées.

Les hôpitaux restent toutefois un haut lieu de diffusion des EPC, notamment pour les EPC de type VIM et KPC. Leur prévalence varie fortement selon les régions. En Europe, des pays comme la Grèce et l'Italie sont endémiques pour les VIM et KPC depuis plus d'une décennie. En 2020, la surveillance EARS-Net a montré une prévalence de plus de 50 % de résistance aux carbapénèmes chez *Klebsiella pneumoniae* dans ces pays, principalement liée à la production de KPC (17). La situation est aussi marquée en Roumanie, à Chypre et dans certaines régions de France et d'Espagne (18). Aux États-Unis, la prévalence reste faible (environ 1 % des isolats cliniques) mais les EPC, principalement des entérobactéries produisant des KPC, sont classées comme menace sérieuse par les CDC (19). Au Canada, une étude récente montre une hausse continue du taux de colonisation hospitalière par des EPC : 0,02 à 0,78 cas pour 10 000 journées-patients entre 2010 et 2023 (20). L'Inde est considérée comme l'épicentre mondial des carbapénémases de type NDM. La prévalence des EPC dépasse 50 % dans certaines unités de soins intensifs (21). Le Moyen-Orient, en particulier les pays du Golfe, a vu une émergence rapide d'isolats NDM et OXA-48-like (22). Des études menées en Égypte, en Afrique du Sud et au Nigeria ont révélé une prévalence croissante des EPC, souvent sous-diagnostiquée. Les données rapportent jusqu'à 30–50 % d'isolats résistants chez *K. pneumoniae* en soins intensifs (23).

Initialement considérées comme strictement nosocomiales, les EPC sont désormais détectées dans la communauté (pour NDM et OXA-48-like), souvent chez des patients sans antécédents récents d'hospitalisation. Des études ont identifié des cas de portage digestif d'EPC chez des personnes sans antécédents notables notamment des voyageurs revenant d'Asie ou du Moyen-Orient (24). Dans certains pays (Inde, Égypte, Tunisie), la prévalence du portage communautaire peut atteindre 5–10 % (25). L'automédication, l'utilisation agricole d'antibiotiques, l'eau contaminée, les contacts animaux-humains et des mesures préventives suboptimales hospitalières contribuent à cette diffusion (6). L'environnement (eaux usées, sols, aliments) constitue également un réservoir de gènes de résistance (26,27).

Les conséquences sur la morbidité et la mortalité sont majeures. Le manque d'alternatives thérapeutiques efficaces, les coûts associés aux traitements et les longues hospitalisations aggravent le poids socio-économique de l'antibiorésistance. En effet, la mortalité des infections à EPC est élevée, allant de 30 % à plus de 70 % dans certains contextes,

particulièrement en cas de septicémie ou d'infection pulmonaire (28). Une étude multicentrique en Corée du Sud a montré une mortalité à 30 jours de 50 % pour les bactériémies à EPC, quatre fois plus élevée que pour les entérobactéries non-productrices de carbapénémases (29). Par ailleurs, les patients infectés par les EPC restent hospitalisés plus longtemps (séjours > 21 jours), présentent plus de complications (insuffisance rénale, choc septique), et ont une moindre qualité de vie dans la période post-infection. Ces infections nécessitent des traitements souvent toxiques (comme la colistine) ou coûteux (les antibiotiques récemment mis sur le marché) (30). Les options thérapeutiques sont limitées aux traitements les plus toxiques dans les pays à ressources faibles. En effet, les antibiotiques potentiellement actifs comme le ceftazidime-avibactam, le méropénème-vaborbactam ou le céfidérocol restent inaccessibles à un grand nombre de patients dans le monde (31).

2. Microbiote intestinal

A. Méthode d'analyse du microbiote

L'étude du microbiote intestinal constitue un champ de recherche qui a profondément évolué au cours des deux dernières décennies grâce au développement technologique, principalement le séquençage à haut débit et la bioinformatique. Initialement, l'analyse reposait sur la culture bactériologique, permettant la caractérisation phénotypique (comprenant les caractères morphologiques, métaboliques et biochimiques) des souches isolées sur milieux sélectifs ou non sélectifs jusqu'à un seuil de 10^2 UFC/g (unités formant colonie/gramme) de selles (32,33). Plus récemment, l'émergence de la culturomique, fondée sur l'utilisation systématique d'un large éventail de milieux de culture (> 200) couplée à des techniques modernes d'identification comme la spectrométrie de masse (MALDI-TOF, *matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight*) ou le séquençage du gène codant pour l'ARN (acide ribonucléique) ribosomal 16S (ARNr 16S), a permis d'isoler un grand nombre d'espèces (> 1 000) auparavant considérées comme non-cultivables, enrichissant considérablement le répertoire des micro-organismes intestinaux connus (34–36). Bien que cette approche ait permis des avancées initiales, elle reste limitée puisque seule une fraction du microbiote (estimée à 63 %), principalement les bactéries aérotolérantes, est cultivable, laissant une large proportion de micro-organismes anaérobies stricts inaccessibles (37).

L'avènement de la biologie moléculaire dans les années 1990, et en particulier du séquençage par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) du gène codant pour l'ARNr 16S a marqué un tournant

majeur (38–40). L'ARNr 16S est une macromolécule ubiquitaire présente chez les procaryotes, alternant des régions conservées (communes à toutes les bactéries) et des régions variables (spécifiques à chaque espèce bactérienne). Cela permet d'étudier le règne procaryote dans sa globalité et à tous les niveaux taxonomiques. Cette approche, fondée sur l'amplification de cette région d'environ 1 500 paires de bases (pb) et son analyse a permis de révéler une diversité jusque-là mal évaluée, incluant de nombreuses espèces non cultivées, et d'établir un inventaire plus représentatif des communautés bactériennes intestinales. L'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S a longtemps reposé sur la méthode de séquençage décrite par Frederick Sanger, qui présentait de nombreuses limites : peu automatisée, bas-débit, nécessitant de connaître la région à séquencer (sans quoi le clonage était impératif), coûteux et limité en taille (environ 800 pb). L'avènement du séquençage de nouvelle génération (*next-generation sequencing*, NGS) dans les années 2000 a transformé le domaine et a particulièrement accéléré l'étude du microbiote intestinal (Figure 1).

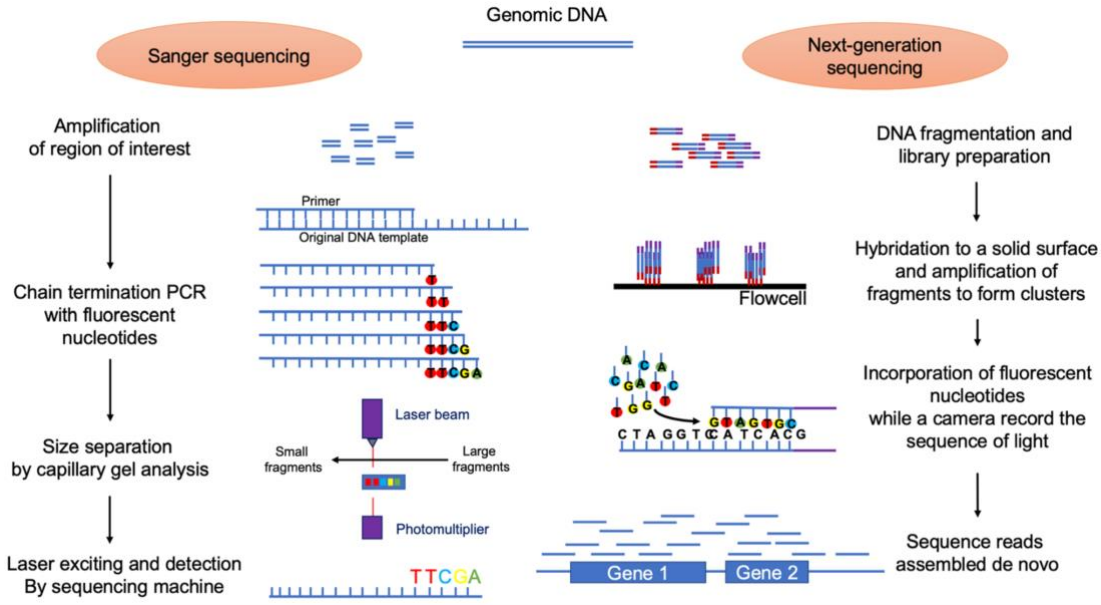


Figure 1 : Principe du séquençage Sanger et du séquençage de nouvelle génération (NGS), issu de la revue de Szychowiak *et al. (41).* La méthode de séquençage Sanger repose sur l'incorporation de nucléotides marqués par un colorant à un brin d'ADN en cours d'élongation, déterminant ainsi chaque base selon la couleur du marqueur. Une des techniques de NGS, telle que la technologie Illumina, permet l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN isolé et fixé sur une flow cell. Cette méthode est basée sur une amplification en pont sur puce qui permet l'identification simultanée des bases d'ADN, lesquelles émettent un signal de fluorescence unique lors de leur incorporation dans la chaîne d'acides nucléiques.

Plusieurs technologies de NGS sont aujourd'hui disponibles, en particulier deux qui sont couramment utilisées en microbiologie : Illumina (San Diego, États-Unis) en *reads* (se traduisant en français par une lecture d'un brin d'ADN) courts et Oxford Nanopore Technologies dite « Nanopore » (ONT, Oxford, Royaume-Uni) en *reads* longs. Le séquençage Illumina, développé initialement par la société Solexa, repose sur le principe du séquençage

par synthèse : l'ADN (acide désoxyribonucléique) est fragmenté, des adaptateurs de séquençage sont fixés à ses extrémités, puis les fragments ainsi préparés sont immobilisés sur une *flow cell* (se traduisant en français par une cellule de flux) où ils subissent une amplification en ponts afin de générer de multiples copies. L'incorporation successive de didésoxynucléotides marqués par des fluorochromes à terminaison réversible permet ensuite une lecture en temps réel de la séquence par détection fluorescente. Cette technologie est aujourd'hui la plus utilisée au monde, représentant plus de 80 % des séquençages de nouvelle génération, et elle est largement reconnue pour sa fiabilité dans la caractérisation des variants du génome humain, l'identification des mutations somatiques associées au cancer et l'étude des bases génétiques de nombreuses maladies héréditaires (42). Elle a également montré une forte corrélation avec d'autres plateformes, notamment le MinION™ (ONT), en termes de diversité alpha et de taxonomie microbienne dans l'étude du microbiote (43). Toutefois, malgré ces avantages, le séquençage Illumina présente certaines limites, principalement liées à la faible longueur des fragments obtenus (150–300 bases), ce qui complique l'assemblage *de novo* des génomes, en particulier dans les régions riches en séquences répétées, et limite la détection de variants structuraux. De plus, les étapes de préparation des échantillons et de génération des données sont souvent longues et laborieuses en l'absence d'automate, restreignant son utilisation dans des contextes où une réponse rapide est nécessaire.

La technologie ONT repose sur l'utilisation de nanopores biologiques, de minuscules pores enchâssés dans une membrane électriquement résistante, permettant le passage de molécules d'ADN dont le transit perturbe le flux ionique mesuré et converti (l'étape de « *base calling* ») en séquence. Cette approche se distingue par la possibilité de séquencer directement l'ADN natif, sans amplification préalable, et de générer des *reads* extrêmement longs, pouvant atteindre plus d'un million de bases. Elle ne nécessite pas non plus de lecture optique complexe et peut être effectuée dans une machine compacte, comme le MinION™. Ce dernier présente plusieurs avantages notables : sa portabilité et son coût relativement faible, sa capacité à produire des résultats en temps réel par *base calling* direct, et sa faculté à générer des *reads* longs permettant de séquencer efficacement les régions répétées et d'améliorer l'assemblage *de novo* des génomes. Il offre en outre une grande flexibilité grâce à la réutilisation possible des *flow cells* et un temps de préparation plus court qu'Illumina, d'autant plus court en cas d'automatisation (appareil VolTRAX™, également développé par ONT). La portabilité de la technologie a été illustrée par des applications variées en dehors du cadre classique du laboratoire, comme l'exploration des communautés microbiennes dans l'Arctique, la surveillance épidémiologique de l'Ebola en Afrique de l'Ouest ou même le séquençage de génomes dans la station spatiale internationale (44). Toutefois, malgré ces atouts, certaines limites subsistent : la profondeur de séquençage demeure relativement

réduite, ce qui peut restreindre la couverture complète d'espèces nouvelles et imposer le recours à des technologies complémentaires ; le taux d'erreurs, historiquement élevé (environ 10 % avec les premières générations de *flow cells*), bien qu'en amélioration constante avec les versions récentes (R9.5, R10, kit Q20+), reste un défi à considérer.

L'assemblage mixte combinant les technologies Illumina et Nanopore pour le séquençage du microbiote intestinal présente des atouts majeurs en tirant parti des complémentarités de chacune (45). En effet, les *reads* courts mais très précis générés par Illumina permettent de corriger les erreurs inhérentes aux *reads* longs produits par Nanopore, tandis que ces dernières, par leur grande longueur, comblent les lacunes et résolvent les régions répétées que les *reads* courts seuls ne peuvent assembler, aboutissant ainsi à des génomes bactériens plus complets et plus fiables. L'approche combinée offre ainsi un profilage taxonomique et fonctionnel plus exhaustif, permettant d'accéder à une vision détaillée de la composition microbienne, y compris des espèces peu abondantes, tout en fournissant une meilleure résolution des fonctions potentielles et des structures génomiques complexes (46,47). Cette approche accroît la précision et la complétude du génome, fournissant des espèces métagénomiques appelés MAGs (*metagenome-assembled genomes*) de meilleure qualité.

En 1999, une équipe française fut pionnière en appliquant le séquençage Sanger d'un échantillon de microbiote intestinal à partir de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S, révélant que 76 % des séquences appartenaient à des organismes non encore cultivés (38). L'essor du NGS a permis de donner plus de profondeur à cette méthode (dite « profilage 16S », « métagénétique 16S », « métagénomique ciblée 16S ») qui reste encore couramment utilisée de nos jours. Néanmoins, cette méthode est limitée par les biais de quantification liés à la multiplicité des copies du gène codant pour l'ARNr 16S et son incapacité à caractériser le potentiel fonctionnel global des écosystèmes. En effet, elle ne cible qu'un seul gène marqueur phylogénétique, et non l'intégralité des gènes des espèces étudiées. Par ailleurs, l'assignation taxonomique de nombreuses bactéries reste imparfaite (Figure 2) (48).

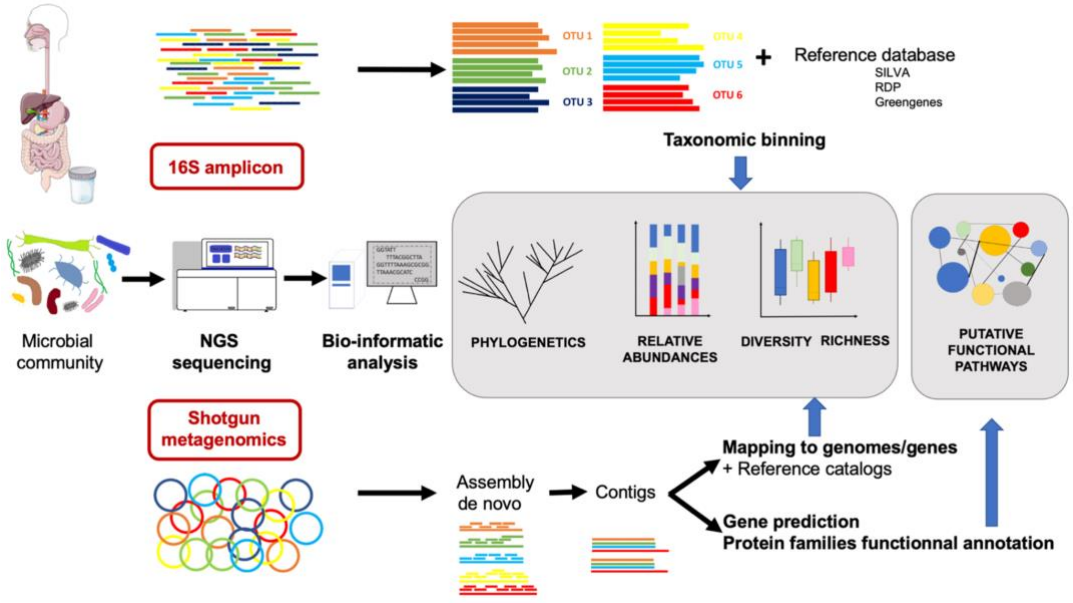


Figure 2 : Représentation schématique des méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS) classiquement employées, issu de la revue de Szychowiak *et al.* (41). L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S et la métagénomique shotgun sont des techniques utilisées couramment pour l'étude du microbiote.

Le NGS a été le point de départ d'approches dites méta-omiques, englobant la métagénomique, la métatranscriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique (49). La métagénomique dite *shotgun* (correspondant à un séquençage global non ciblé) analyse l'ensemble du contenu génétique d'un écosystème, cultivable ou non : elle permet de séquencer directement l'ensemble de l'ADN d'un échantillon sans amplification préalable (50). Elle permet donc une meilleure assignation taxonomique en utilisant des gènes conservés, l'indexation des motifs *k-mers* ou encore la reconstruction des MAGs. Elle permet également une analyse des fonctions du microbiote via l'annotation des gènes. Elle a permis la constitution de vastes catalogues de gènes microbiens, comme le projet MetaHIT *(Metagenomics of the Human Intestinal Tract)* en Europe. Ce projet a été le premier à établir un catalogue de 3,3 million de gènes microbiens non redondants à partir des échantillons fécaux de 124 adultes européens. Ce catalogue est environ 150 fois plus grand que le génome humain (51).

La métatranscriptomique vise à explorer l'activité transcriptionnelle des communautés microbiennes, bien que sa mise en œuvre reste techniquement exigeante du fait de la difficulté de maintenir l'intégrité de l'ARN. La métaprotéomique, en identifiant les protéines produites, permet une analyse directe de l'activité métabolomique microbienne, mais demeure limitée par des contraintes méthodologiques et la nécessité de bases de données robustes. La métabolomique, enfin, permet de dresser un profil des métabolites issus du microbiote et de

leurs interactions avec l'hôte, ouvrant la voie à l'identification de biomarqueurs pertinents et à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques. Cependant, la complexité analytique, le volume des données générées et la nécessité de pipelines bioinformatiques robustes constituent encore des défis méthodologiques majeurs.

L'intégration des différentes approches, de la culture aux analyses multi-omiques, est aujourd'hui nécessaire pour une compréhension holistique du microbiote intestinal. Chacune apporte un éclairage spécifique : la culture permet une exploration fonctionnelle approfondie des souches, l'ARNr 16S renseigne sur la diversité microbienne, la métagénomique et ses dérivés offrent une cartographie fonctionnelle et dynamique, et la métabolomique met en évidence les médiateurs de l'interaction hôte-microbiote. La combinaison de ces outils, associée à des approches bioinformatiques avancées et à des modèles intégratifs, ouvre la voie au développement de la médecine personnalisée, où le microbiote intestinal pourrait être exploité comme biomarqueur et cible thérapeutique.

B. Composition du microbiote

Le microbiote intestinal humain est un écosystème extrêmement complexe et abondant, souvent considéré comme un véritable « organe caché » en raison de son rôle fondamental dans la physiologie, l'immunité et la santé humaine (52). Il représente un consortium microbien dense et diversifié, composé principalement de bactéries, mais aussi de virus, de champignons, d'archées et de protozoaires (53). Le microbiote intestinal abrite environ $3{,}8.10^{13}$ micro-organismes, soit dix fois plus que le nombre de cellules humaines, pour un poids total estimé entre 1 et 2 kg (54). A noter que plus de 90 % de cette diversité est attribuable aux bactéries. Il est difficile de définir un microbiote « sain », chaque individu ayant une composition unique, mais varie tout au long de la vie selon des facteurs génétiques, environnementaux, alimentaires et médicaux.

De plus, la composition et la diversité du microbiote varient considérablement le long du tractus gastro-intestinal (53–59), en fonction de facteurs physiologiques (49,60) tels que le pH, la concentration en oxygène, la disponibilité des substrats et les sécrétions de l'hôte. Le côlon abrite la plus forte concentration et diversité de micro-organismes. Le microbiote se trouve essentiellement au niveau de l'intestin grêle et du côlon, où il est distribué entre la lumière digestive et le biofilm protecteur constitué par le mucus tapissant la paroi intestinale (61–63). En raison de l'acidité élevée, l'estomac constitue un milieu peu propice à la survie de la majorité des micro-organismes et contient ainsi une densité de bactéries commensales environ cent millions de fois inférieure à celle observée dans le côlon. De même, les

populations microbiennes sont multipliées par cent entre le côlon proximal et le côlon distal et l'augmentation est essentiellement due à une augmentation des bactéries strictement anaérobies. Le microbiote associé à la muqueuse est également différent de celui présent dans la lumière intestinale ou dans les selles et constitue une niche écologique spécifique (53,64,65,49). Ce microbiote reste stable dans le temps, avec une composition très homogène de l'iléon jusqu'au rectum chez un même individu. En revanche, la communauté bactérienne prédominante dans le mucus se distingue de celle qui domine la lumière intestinale.

Plus de mille espèces bactériennes distinctes ont été identifiées dans des cohortes humaines, mais chaque individu sain héberge une communauté spécifique composée d'environ 100 à 500 espèces, dont en moyenne 160 sont dominantes. La majorité des bactéries intestinales appartiennent à quatre grands phyla : Bacillota (ex-Firmicutes), Bacteroidota (ex-Bacteroidetes), Actinomycetota (ex-Actinobacteria) et Pseudomonadota (ex-Proteobacteria) (39). Les Bacillota et les Bacteroidota représentent ensemble plus de 90 % de la population bactérienne, les Bacillota constituant généralement 60–75 % et les Bacteroidota 30–40 % (66,67).

Au sein des Bacillota, les classes les plus représentées sont les *Clostridia* (notamment *Faecalibacterium prausnitzii*, biomarqueur d'un intestin sain aux propriétés anti-inflammatoires) et les *Bacilli* (*Blautia*, *Ruminococcus, Clostridium, Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*). Les Bacteroidota sont dominés par les genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*, avec une variabilité interindividuelle marquée. Les Actinomycetota (ex-Actinobacteria) incluent notamment le genre *Bifidobacterium*, reconnu pour ses propriétés bénéfiques, telles que le renforcement de l'immunité et la prévention de la colonisation par des pathogènes. Les Pseudomonadota (ex-Proteobacteria) regroupent des genres commensaux mais aussi pathogènes opportunistes comme les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*, *Helicobacter*) (68). Leur augmentation est souvent considérée comme un marqueur de dysbiose et d'inflammation intestinale. Le genre *Escherichia* est largement représenté, à 80 % par *E. coli*, qui occupe une niche commensale importante. Bien que les entérobactéries soient dix mille fois moins nombreuses (entre 10^7 à 10^8 UFC/g de selles) que les bactéries dominantes du microbiote intestinal, elles sont très fréquemment rencontrées en pathologie humaine et donc largement étudiées, notamment en lien avec leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques. Certaines BMR (comme les EP-BLSE) appartenant à ce phylum sont présentes à l'état sous-dominant et difficilement accessibles par les méthodes de séquençage. Enfin, le phylum des Verrucomicrobiota (ex-Verrucomicrobia) est moins abondant mais inclut *Akkermansia muciniphila*, bactérie mucinophile impliquée dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale et du métabolisme énergétique. La majorité

des bactéries intestinales (> 90 %) sont anaérobies strictes et ne peuvent pas être cultivées par les méthodes classiques, ce qui explique l'apport majeur des méthodes moléculaires dans leur caractérisation (39,66,69). Seules quelques dizaines d'espèces communes à presque tous les individus constituent le « noyau microbien » ou « *core microbiome* », c'est-à-dire la fraction stable et dominante indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale (66,70). Parmi celles-ci, des espèces sont systématiquement retrouvées telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus obeum*, *Subdoligranulum variabile*, *Prevotella melaninogenica*, *Oscillospira guillermondii*, *Bacteroides* sp. et *Bifidobacterium* sp..

A côté des bactéries qui constituent les micro-organismes les plus abondants dans le microbiote intestinal, d'autres microorganismes doivent être cités. Le virome intestinal comprend l'ensemble des virus présents dans l'écosystème digestif humain. Il inclut des virus infectant directement l'hôte, des rétrovirus endogènes intégrés au génome humain, mais surtout des bactériophages, qui infectent les bactéries intestinales. Ces derniers jouent un rôle essentiel dans la régulation des populations bactériennes, la modulation de leur virulence et la dynamique de l'écosystème. Le virome intestinal se caractérise par une diversité et une variabilité interindividuelle remarquables, encore sous-explorées. Bien que représentant moins de 1 % du microbiote intestinal, les champignons ou mycobiote sont de plus en plus reconnus pour leur rôle potentiel dans la modulation du système immunitaire et certaines pathologies (32,71). Les phyla les plus fréquemment observés sont les Ascomycota (comprenant les *Saccharomyces* et *Candida*), les Basidiomycota et les Zygomycota. Les archées intestinales, bien que minoritaires (moins de 0,2 %), jouent un rôle fonctionnel significatif. *Methanobrevibacter smithii* (détectée chez 25 à 95 % de la population) et *Methanosphaera stadtmanae* sont les plus représentées. Ce sont des anaérobies obligatoires méthanogènes, capables de produire du méthane dans l'intestin, facilitant la fermentation et la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC). Enfin, les protozoaires et helminthes peuvent également être présents, selon les contextes géographiques et niveaux de développement. Certains helminthes intestinaux comme *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura* ou *Strongyloides stercoralis*, sont associés à une diversité microbienne accrue et à une modulation des réponses immunitaires, en particulier dans les zones d'endémie parasitaire (72,73).

Avec une telle diversité, le microbiote intestinal représente un vaste répertoire génétique, estimé à plus de 50 millions de gènes, soit environ 2 500 fois le nombre de gènes du génome humain (environ 20 000) (74). Plus de 99 % de ces gènes sont d'origine bactérienne.

Si la composition du microbiote intestinal est propre à chaque individu, l'analyse d'un grand nombre d'échantillons a permis de les regrouper (« *clusteriser* »), amenant le concept d'entérotypes (56). Trois entérotypes ont été décrits selon la prédominance de certains genres : *Bacteroides* (entérotype 1), *Prevotella* (entérotype 2) et *Ruminococcus* (entérotype 3). Les entérotypes sont fortement corrélés aux habitudes alimentaires à long terme. Par exemple, l'entérotype *Bacteroides* est lié à une alimentation riche en graisses et protéines animales, tandis que l'entérotype *Prevotella* est associé à un régime riche en glucides et fibres. Le nombre exact d'entérotypes reste incertain : entre deux et cinq ont été isolés chez l'adulte, avec en leur sein de multiples branches (75,76).

C. Fonctions du microbiote intestinal

Ses fonctions sont multiples et couvrent des aspects métaboliques, nutritionnels, immunitaires, neurocognitifs et de barrière :

1) Fonctions métaboliques

Le microbiote intestinal agit comme un régulateur majeur de la physiologie digestive et de la nutrition, mais aussi comme producteur de métabolites essentiels (67,77). Sa capacité à fermenter les glucides complexes non digestibles dans l'intestin grêle (partie initiale) permet la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), tels que l'acétate, le propionate et le butyrate (67,32,78). Ces métabolites fournissent jusqu'à 70 % des besoins énergétiques des colonocytes et contribuent à environ 5 à 15 % de l'apport calorique quotidien de l'hôte. Des genres tels que *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* ou encore *Clostridium* participent activement à ces processus, *F. prausnitzii* étant un producteur majeur de butyrate. La majorité des AGCC, produit principalement dans le côlon proximal, est absorbée par l'épithélium intestinal avant d'être distribuée par voie sanguine vers divers organes cibles, notamment le foie, le tissu adipeux, les muscles, le pancréas et l'intestin. Ces métabolites assurent des fonctions variées et complémentaires. Ils participent au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale en stimulant la sécrétion de mucus protecteur et en renforçant les jonctions serrées entre colonocytes (79). Sur le plan métabolique, ils servent de substrats à la lipogenèse, à la gluconéogenèse et à la biosynthèse du cholestérol (80). Leur capacité à abaisser le pH luminal contribue à limiter la prolifération de bactéries pathogènes (81). Les AGCC contribuent également à la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel par la stimulation d'hormones anorexigènes et l'augmentation de la dépense énergétique basale (82). Ils interviennent dans l'homéostasie glycémique grâce à un effet insulinotrope sur les cellules β pancréatiques et influencent le métabolisme lipidique en réduisant le stockage des graisses et l'adiposité (81,83). Enfin, ils modulent la réponse

immunitaire en orientant la différenciation des cellules effectrices et régulatrices (81). Parmi eux, le butyrate occupe une place particulière, en raison de son rôle central dans l'homéostasie intestinale et de ses propriétés anticancéreuses potentielles (80).

Le microbiote intervient également dans la biosynthèse de vitamines essentielles, notamment la vitamine K et plusieurs vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 et B12), ainsi que dans la synthèse *de novo* de certains acides aminés (84). En effet, le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la gestion des protéines alimentaires, à la fois en synthétisant des acides aminés protéinogènes et en fermentant les protéines non digestibles, produisant ainsi une large gamme de métabolites (80,85). Ces produits intermédiaires peuvent exercer des effets bénéfiques tels que des molécules favorables à la barrière intestinale ou au système nerveux (par exemple des indoles) ou des effets délétères (par exemple des composés azotés potentiellement toxiques) selon la nature du régime et des substrats fermentés. Par ailleurs, le microbiote influence le métabolisme du tryptophane par trois voies métaboliques distinctes : la voie des indoles activant le récepteur AhR et participant à l'immunité muqueuse, la voie de la sérotonine, et la voie de la kynurénine via l'Indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), toutes conditionnant la réponse immunitaire, l'inflammation ainsi que le fonctionnement neuronal (86). En parallèle, il joue un rôle crucial dans le métabolisme des xénobiotiques et la détoxification en modulant l'efficacité ou la toxicité de nombreux médicaments administrés par voie orale (87).

Le microbiote intestinal exerce une influence déterminante sur le métabolisme lipidique de l'hôte en produisant des métabolites tels que les acides biliaires secondaires, la triméthylamine N-oxyde (TMAO) et le lipopolysaccharide (LPS) (88,89). Les acides biliaires secondaires, par activation des récepteurs FXR et TGR5, orchestrent la régulation du métabolisme lipidique, de la dépense énergétique et de l'inflammation (88). D'autres molécules dérivées du microbiote, comme TMAO ou LPS, interviennent dans des mécanismes pro-athérogènes ou inflammatoires, perturbant l'homéostasie lipidique (90). Enfin, des déséquilibres microbiens (ou dysbiose) associés à des altérations de ces métabolites sont impliqués dans le développement de troubles dyslipidémiques telles que la stéatose hépatique non alcoolique et l'athérosclérose, par des mécanismes métaboliques et immunitaires croisés (88).

2) Modulation du système immunitaire

Le microbiote intestinal est essentiel à la maturation et au fonctionnement optimal du système immunitaire présent dans la muqueuse intestinale (32). Les modèles murins axéniques ont montré que l'absence de microbiote entraîne une hypoplasie des plaques de Peyer, une diminution des lymphocytes, des IgA sécrétoires et des cytokines. Ces anomalies sont

corrigées après recolonisation (67,91). Outre son rôle de barrière écologique contre les pathogènes (compétition pour les nutriments et production de bactériocines), le microbiote participe activement à la régulation de l'équilibre immunitaire. Il influence notamment la balance entre les lymphocytes T effecteurs (par exemple les Th17 pro-inflammatoires stimulés par les bactéries filamenteuses segmentées) et les lymphocytes T régulateurs (par exemple les Treg, anti-inflammatoires) (67,92–95). Certaines bactéries comme *Bacteroides fragilis* favorisent la différenciation des Treg producteurs d'IL-10 par l'intermédiaire des AGCC.

3) Maintien de l'intégrité de la barrière intestinale

L'intégrité de la barrière intestinale est maintenue par le microbiote qui renforce les jonctions serrées entre les cellules épithéliales et réduit ainsi la pénétration des toxines et des pathogènes (32,96,97). Il stimule la production de mucines qui forment une couche protectrice sur l'épithélium intestinal et favorise la prolifération et la différenciation des entérocytes (98). De plus, il contribue au développement de l'angiogenèse. Certains métabolites bactériens, comme l'indole, participent à la régulation positive des jonctions cellulaires et à la maturation de l'épithélium intestinal (90).

Le microbiote protège activement l'hôte contre les pathogènes exogènes, ce qu'on appelle l'effet de barrière ou résistance à la colonisation (99,100). Ce mécanisme repose sur des interactions microbiennes complexes et dynamiques, et sur les réponses immunitaires de l'hôte. Les mécanismes directs incluent la compétition pour les nutriments (ex. *Citrobacter rodentium* ou *Clostridioides difficile*) (101). Les mécanismes indirects impliquent la stimulation de l'immunité innée comme la production de peptides antimicrobiens comme RegIIIγ contre *Enterococcus faecium* ou *Listeria monocytogenes* (102).

4) Influence sur le système nerveux central : l'axe intestin-cerveau

Le microbiote intestinal interagit avec le système nerveux central (SNC) à travers l'axe intestin-cerveau, une voie de communication bidirectionnelle qui intègre les systèmes neurologique, endocrinien, immunitaire et métabolique (103–105). Le système nerveux entérique (SNE), souvent qualifié de « deuxième cerveau », est un réseau neuronal complexe situé dans le tractus gastro-intestinal, capable de fonctionner indépendamment du SNC (106). Le SNE influence la motricité intestinale et les sécrétions. Le nerf vague représente la principale voie de communication anatomique entre l'intestin et le cerveau (103). Les signaux microbiens, qu'ils soient directs ou indirects via des métabolites ou neurotransmetteurs comme la sérotonine (95 % produite dans l'intestin par les cellules entéro-chromaffines), la dopamine, la noradrénaline ou encore l'acide gamma-aminobutyrique, capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, peuvent activer ou inactiver le nerf vague, influençant ainsi les régions

cérébrales impliquées dans la gestion des émotions et le comportement (107,108). De plus, les cellules entéro-endocrines constituent le plus grand organe endocrinien du corps humain et agissent comme des intermédiaires essentiels en sécrétant divers neuropeptides et hormones qui peuvent influencer la motricité intestinale et l'activité sécrétoire, et communiquer avec le cerveau via des synapses avec les nerfs adjacents (106,109). Ainsi plusieurs études ont montré qu'une altération de la fonction de la barrière intestinale est présente dans des pathologies du SNC comme l'autisme, la schizophrénie et la dépression (110–112). Par ailleurs, certains neurones hypothalamiques peuvent détecter directement les signaux bactériens via des récepteurs NOD2, influençant ainsi des fonctions physiologiques telles que la thermorégulation ou l'appétit (agissant ainsi sur l'obésité).

D. Concept d'eubiose et de dysbiose

L'eubiose représente l'état "normal" ou d'équilibre du microbiote intestinal humain. L'eubiose est caractérisée par une grande abondance microbienne (environ 10^{13} à 10^{14} bactéries) mais aussi une richesse importante (54). Le microbiote intestinal a co-évolué avec son hôte pour établir une relation mutualiste qui assure l'homéostasie physiologique. La dysbiose se définit comme une altération de l'équilibre de la communauté microbienne, liée à un déséquilibre entre espèces commensales et pathogènes ou bien une altération au niveau de ses fonctions comparé à l'eubiose (71,113,114). Ce déséquilibre est souvent associé à une dysfonction de la barrière intestinale et à l'activation des voies de l'inflammation. Ce concept a été décrit très tôt, notamment dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), et plusieurs espèces bactériennes impliquées dans cette altération ont depuis été identifiées (115,116). Néanmoins, l'étude d'un écosystème aussi complexe demeure difficile, et il reste ardu de déterminer précisément de quelle manière les variations de composition et d'abondance des communautés microbiennes contribuent au développement de ces maladies. Diverses situations pathologiques ont été associées à une dysbiose (117–119).

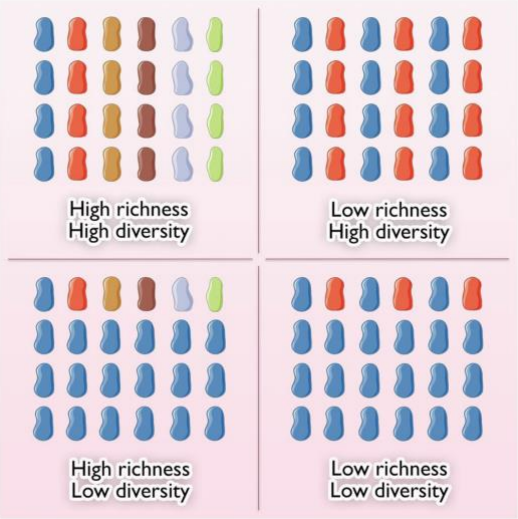


Figure 3 : Représentation schématique illustrant les concepts de richesse et de diversité bactériennes, issu de la revue de Szychowiak *et al.* (41). Dans la figure, chaque couleur symbolise un taxon bactérien distinct. La richesse et la diversité peuvent être évaluées à différents niveaux taxonomiques, allant du phylum à l'espèce. La richesse correspond à la variété des communautés bactériennes observées dans un écosystème spécifique ; elle augmente proportionnellement au nombre d'espèces bactériennes différentes qui y sont recensées. La diversité est corrélée à la prépondérance de certaines communautés bactériennes sur d'autres au sein de l'écosystème : la diversité microbienne diminue lorsqu'un taxon bactérien est surreprésenté dans le milieu.

Dans les MICI, notamment la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, on observe une diminution de la diversité microbienne et un changement dans certains taxons bactériens, notamment une baisse de certaines espèces anaérobies strictes appartenant aux Bacillota (en particulier *F. prausnitzii* qui produit des AGCC comme le butyrate) et une augmentation de l'abondance relative des entérobactéries (120–124). *F. prausnitzii* est une bactérie commensale connue pour ses propriétés protectrices et anti-inflammatoires (118,123).

Dans l'obésité et les maladies métaboliques, la dysbiose se traduit par un microbiote moins riche avec une altération du rapport Bacteroidota/Bacillota et également un enrichissement en fonctions métaboliques favorisant l'accumulation énergétique, parallèlement à une réduction de la biosynthèse du butyrate (125–127). A l'inverse, les AGCC produits par le microbiote intestinal favorisent la sécrétion de glucagon-like peptide 1 (GLP–1), un peptide intestinal qui réduit la prise alimentaire, abaisse la glycémie et augmente la sensibilité à l'insuline (128). D'autres mécanismes sont impliqués comme le métabolisme des acides biliaires, le LPS, les substances endocannabinoïdes et les métabolites du tryptophane (129).

Le diabète de type 2 s'accompagne d'une raréfaction des bactéries productrices de butyrate et d'une augmentation des pathogènes opportunistes, tandis que les allergies sont favorisées

par une colonisation insuffisante en *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, ou par une colonisation précoce par *C. difficile* (130–135).

Enfin, plusieurs troubles neurologiques ont été associés à la dysbiose : la dépression (136) est corrélée à une diminution des bactéries productrices d'AGCC (ex. *Faecalibacterium*, *Coprococcus*) et à une augmentation de genres pro-inflammatoires, tandis que dans la maladie de Parkinson (137–139), une altération généralisée du microbiote (jusqu'à 30 % des espèces et gènes) est observée, avec une expansion de bactéries Gram négatif productrices de LPS et une réduction des producteurs d'AGCC (140). Par ailleurs, le microbiote intestinal pourrait également contribuer au développement de la maladie d'Alzheimer par différents mécanismes, incluant la modulation du système immunitaire en favorisant la neuro-inflammation, les interactions directes avec le SNC via l'axe intestin-cerveau par modifications de la composition microbienne, et la production de métabolites comme les AGCC (141–143). Le microbiote intestinal émerge comme un acteur clé dans la physiopathologie du cancer et dans la modulation de la réponse aux immunothérapies utilisées dans leur traitement. Plusieurs travaux ont mis en évidence son rôle dans la tumorigenèse, notamment dans le cancer colorectal. La dysbiose intestinale a été associée à une augmentation du risque de carcinogenèse, notamment par la présence de bactéries pathogènes telles que *Fusobacterium nucleatum (144,145)*. Ce pathogène est retrouvé en abondance dans les tumeurs colorectales et son impact sur la réponse immunitaire varie en fonction du statut d'instabilité des microsatellites (145). De plus, certaines signatures microbiennes fécales pourraient permettre un dépistage plus précoce du cancer colorectal (146). Au-delà de son rôle dans la carcinogenèse, le microbiote module également l'efficacité des immunothérapies (147,148). Par exemple, une flore enrichie en certaines bactéries commensales, comme *Akkermansia muciniphila*, a été associée à une meilleure efficacité des anti-PD-1 (148). Paradoxalement, il a été montré récemment que *F. nucleatum* pourrait favoriser la réponse aux anti-PD-1 dans les cancers colorectaux microsatellites stables dans certains contextes (149). Ces résultats illustrent la complexité de l'interaction entre microbiote, cancer et immunité. Ainsi, l'intégration du microbiote dans les stratégies thérapeutiques en oncologie, allant de la prévention à l'optimisation de l'immunothérapie, constitue un champ de recherche en pleine expansion (150).

E. Facteurs influençant le microbiote

Le microbiote intestinal est un écosystème dynamique, dont la composition et la diversité sont le reflet d'une interaction constante avec l'hôte et son environnement. Les principaux facteurs qui modulent la composition et la diversité du microbiote intestinal sont (114) :

1) Facteurs liés à l'hôte et au développement :

● Âge : Avant la naissance, le tube digestif du fœtus est stérile, et la colonisation débute immédiatement après l'accouchement (151–155). Le microbiote néonatal est très hétérogène, instable et dominé initialement par des bactéries anaérobies facultatives (comme *E. coli*, *Staphylococcus* ou *Streptococcus*), qui créent un environnement anaérobie propice à l'établissement des bactéries anaérobies strictes de la flore vaginale (telles que les *Bifidobacterium sp*.) après un accouchement par voie basse (156,157). La diversité microbienne augmente pendant l'enfance, atteignant une configuration proche de l'adulte vers 2-3 ans en passant par 3 phases, bien que sa maturité réelle soit encore débattue (parfois estimée à 5 ans) (32,154,157,158). Une première phase de développement entre 3 et 14 mois est dominée par les bactéries du genre *Bifidobacterium* ; suivie entre 15 et 30 mois de la phase de transition qui est marquée par une diversification bactérienne ; et enfin à partir de 31 mois, la phase finale est caractérisée par une forte diversité et une prédominance des Bacillota. Les « mille premiers jours » de vie (de la conception aux deux ans) sont considérés comme une période cruciale (« fenêtre d'opportunité ») pour le développement du microbiote et la santé future (32,114,159).

Chez l'adulte, la composition du microbiote dominant est relativement stable dans le temps, bien que la diversité des souches puisse fluctuer (32,114).

Avec le vieillissement, la diversité du microbiote a tendance à diminuer, avec une réduction des *Bifidobacterium* et une augmentation de streptocoques, staphylocoques et entérobactéries, ce qui peut entraîner un ralentissement du transit et une vulnérabilité accrue à certaines infections comme *C. difficile* (119,160).

● Mode d'accouchement : La naissance par voie basse permet l'établissement plus rapide du microbiote intestinal, le bébé étant exposé aux microbiotes vaginal et intestinal de sa mère (161–163). Ainsi, le microbiote des bébés nés par voie basse est souvent enrichi en *Bifidobacterium (B. catenulatum* et *B. longum*). En revanche, la césarienne est associée à une acquisition retardée des groupes microbiens dominants habituels et à une colonisation par des bactéries issues de l'environnement hospitalier et de la peau maternelle (*Staphylococcus*, *Cutibacterium*, *Corynebacterium*) (157,161,162). Le « *vaginal seeding* » (ensemencement vaginal) tente de compenser cette différence, mais son efficacité est partielle et controversée en raison des risques infectieux qui en découlent (164,165).

● Mode d'allaitement : L'allaitement maternel a un impact incontestable et positif sur l'ensemencement et la maturation du microbiote intestinal (166–168). Le lait maternel est un liquide complexe, riche en lipides, lactose et oligosaccharides du lait humain ou HMO (*human milk oligosaccharides,* HMO) qui sont des glucides bioactifs uniques non digérés par l'hôte mais fermentés par les bactéries, notamment les *Bifidobacterium*, pour produire des AGCC (169). Les HMO inhibent également les agents pathogènes et favorisent la croissance des bactéries bénéfiques (170). Le lait artificiel, bien que diversifié, peut introduire des bactéries potentiellement pathogènes et demeure moins riche en HMO.

● Génétique de l'hôte : Bien que l'environnement domine généralement la génétique de l'hôte dans la formation du microbiote, une faible proportion (environ 2 %) est influencée par le patrimoine génétique (171). Les profils microbiens de jumeaux monozygotes sont plus étroitement liés que ceux d'individus non apparentés, ce qui suggère un rôle du génotype dans la structuration des populations bactériennes (172). Les études sur des jumeaux monozygotes ayant passé de longues périodes de leur vie séparés ont mis en évidence une forte ressemblance dans la composition de leur microbiote. En revanche, une telle convergence n'a pas été observée chez les conjoints partageant pourtant le même cadre de vie et des habitudes alimentaires similaires.

2) Mode de vie :

L'alimentation est un facteur déterminant de la composition et de la diversité du microbiote intestinal. Les régimes alimentaires riches en fibres et en polyphénols favorisent une capacité fermentative stable et une plus grande diversité taxonomique (55,117,119). Les régimes pauvres en fibres, riches en protéines animales et en graisses peuvent exacerber l'inflammation intestinale et sont associés à une moindre diversité microbienne (173). Les régimes occidentaux actuels riches en graisses et protéines, sont associés à une diversité microbienne réduite par rapport aux populations non industrialisées et au régime méditerranéen (174,175).

L'activité physique soutient la diversité et la stabilité du microbiote, tandis qu'un mode de vie sédentaire est associé à une diversité réduite. De même, le stress (physique ou social) peut diminuer la stabilité du microbiote, affecter la motilité et la perméabilité intestinale, et favoriser la dysbiose (176).

Par ailleurs, les conditions d'hygiène peuvent influencer la dynamique de colonisation, un environnement trop stérile pouvant retarder l'acquisition de groupes microbiens habituels

(177,178). Le lieu géographique de naissance et de vie peut avoir un impact sur le développement et la composition du microbiote (56,156,174,179).

Enfin, la pollution (matières particulaires, ozone) peut altérer la composition du microbiote intestinal et augmenter la perméabilité intestinale (105,180).

3) Interventions médicales :

La consommation d'antibiotiques est un facteur majeur de perturbation du microbiote intestinal. Les antibiotiques affectent aussi bien les bactéries pathogènes que les bactéries bénéfiques, réduisant la diversité et la richesse microbienne et entraînant une dysbiose. L'effet des antibiotiques dépend de l'activité de l'antibiotique vis-à-vis des bactéries du microbiote (son spectre d'activité), le degré d'excrétion biliaire (qui dépend elle-même de la voie d'administration et des paramètres pharmacocinétiques de l'antibiotique) et de la posologie (dose et durée de traitement) (181). Bien que le microbiote puisse retrouver son état initial de façon complète ou incomplète (phénomène de résilience) après quelques semaines pour une antibiothérapie courte, des perturbations fortes ou chroniques, surtout en début de vie, pourraient entraîner des altérations irréversibles et avoir des effets néfastes à long terme (182,183).

De plus, les antibiotiques diminuent également la résistance à la colonisation, qui est la capacité du microbiote à s'opposer à la colonisation durable par des bactéries exogènes et appelé aussi l'« effet barrière » (184). Ce phénomène est essentiellement porté par les espèces bactériennes anaérobies majoritaires du microbiote. Enfin, les antibiotiques augmentent les concentrations intestinales des entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération (C3G) et des entérocoques résistants aux glycopeptides entraînant une augmentation du risque d'infections à ces bactéries ainsi que la diffusion dans l'environnement (185–189).

Les probiotiques, définis pour la première fois par Lilly et Stillwell en 1965, sont d'après la définition de l'OMS, des micro-organismes qui, ingérés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, notamment en modifiant l'équilibre de son microbiote intestinal (190,191). Les résultats de nombreuses études *in vitro*, sur modèles animaux et lors d'essais cliniques, ont confirmé le potentiel de ces probiotiques dans la gestion de multiples pathologies. Ils peuvent renforcer la barrière intestinale, sécréter des substances antimicrobiennes et moduler le système immunitaire. Les prébiotiques sont des composés non digestibles (principalement des fibres alimentaires) qui modulent sélectivement la composition

et/ou l'activité du microbiote intestinal, en favorisant la croissance des bactéries bénéfiques (192). Enfin, les postbiotiques sont des préparations de micro-organismes inactivés et/ou de leurs composants qui confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (193).

La transplantation de microbiote fécal (TMF) et ses dérivés biothérapeutiques visent à moduler le microbiote en vue de restaurer les fonctions de barrière au microbiote et consistent à introduire des selles d'un donneur sain chez un patient receveur pour rééquilibrer la flore intestinale altérée (194,195). Une dysbiose est fréquemment observée après antibiothérapie et favorise les infections récidivantes, notamment à *C. difficile* ainsi que la prolifération de BMR (101,102,196). C'est dans ce contexte que la TMF a d'abord émergé comme une stratégie efficace dans les infections récidivantes à *C. difficile*. Cette indication est aujourd'hui sa principale application clinique (197,198). Ces approches incluent désormais des formulations standardisées comme REBYOTA® ou SER-109, dont l'efficacité et la sécurité ont été validées dans des essais de phase avancée et approuvées par la FDA (199,198). De plus, les consortiums bactériens définis tels que VE303, développés comme alternatives plus contrôlées à la TMF, se sont révélés prometteurs dans la prévention des récidives (200). L'essai CIMON a montré la faisabilité et la sécurité d'une TMF orale dans le contexte post-chimiothérapie, ouvrant la voie à une utilisation en oncologie (201). La TMF et ses dérivés représentent une avancée majeure dans la prise en charge des pathologies liées à la dysbiose. La conception de consortia bien décrits et indiqués dans des utilisations précises ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques en infectiologie, hématologie et oncologie.

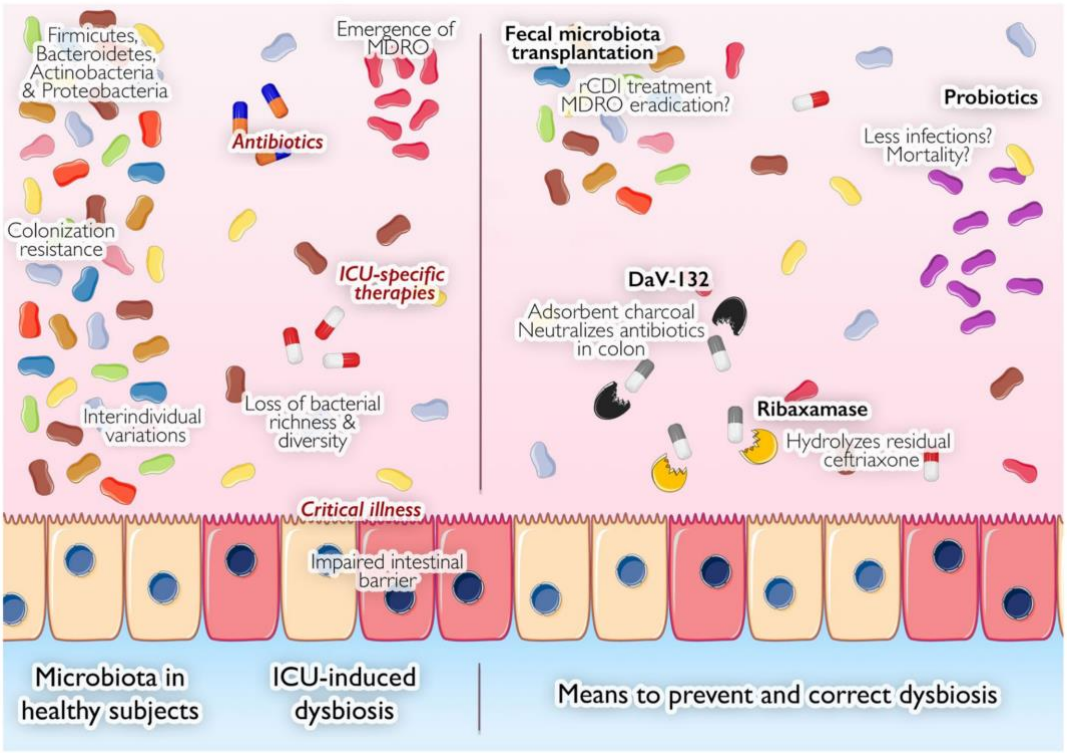


Figure 4 : Principales variations du microbiote chez les patients en unité de soins intensifs et moyens disponibles pour restaurer la dysbiose, issu de la revue de Szychowiak *et al.* (41). De multiples facteurs (représentés en couleur rouge rouille) altèrent l'intégrité du microbiote, entraînant de nombreuses conséquences délétères. La partie droite de la figure illustre les traitements classiquement décrits (indiqués en gras et en noir) qui interviennent sur le microbiote, dans une optique de compensation ou de prévention des altérations.

3. Voyages, microbiote intestinal et acquisition de résistance aux antibiotiques

A. Modification de la composition du microbiome intestinal lors des voyages

Les voyages internationaux, en raison des modifications environnementales qu'ils impliquent, représentent un facteur susceptible d'induire des fluctuations intra-individuelles significatives du microbiote intestinal (171,202,203). Ces variations peuvent survenir même en l'absence de symptômes cliniques, comme chez les voyageurs asymptomatiques, et se traduisent par des altérations de la composition microbienne (204). Les effets observés sur la diversité du microbiote restent néanmoins hétérogènes selon les études. Certaines n'ont pas mis en évidence de changement significatif de la diversité globale, indépendamment de la durée ou du type de voyage et de l'éventuelle survenue d'une infection gastro-intestinale (205–208). En revanche, d'autres travaux ont rapporté une réduction notable de la diversité, avec une diminution de l'indice de Shannon, particulièrement marquée chez les voyageurs ayant

présenté une diarrhée, et chez ceux ayant reçu un traitement antibiotique (209). Sur le plan de la composition bactérienne, une augmentation transitoire mais significative de l'ordre des *Enterobacterales* a été fréquemment rapportée (206,208–210). Celui-ci inclut des genres tels que *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Salmonella, Citrobacter et Shigella,* dont l'augmentation régresse généralement en quelques semaines à quelques mois après le retour. Parallèlement, une diminution de la famille des *Christensenellaceae* a été observée (208). Enfin, il apparaît que certains voyageurs présentent une certaine stabilité de leur microbiote intestinal au cours du séjour. Cette résilience est fréquemment associée à une abondance initiale plus élevée de bactéries probiotiques, telles qu'*Agathobaculum*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Roseburia* et *Lactobacillus* (203,211–215). Ces taxons, en particulier les producteurs d'AGCC comme *Agathobaculum*, *Faecalibacterium* et *Roseburia*, jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie intestinale et pourraient contribuer à limiter les perturbations induites par les changements environnementaux liés au voyage (216).

B. Acquisition des EMR

Le microbiote intestinal est considéré comme le principal réservoir des EMR. La colonisation intestinale favorise donc la dissémination (horizontalement entre individus via l'environnement, la sécurité sanitaire alimentaire ou le voyage) et le passage vers des infections difficiles à traiter (13,14). D'autre part, le portage intestinal est préalable à la survenue d'infections (urétrites, infections urinaires, bactériémies, infections intra-abdominales) à ces bactéries.

Les voyages internationaux constituent un facteur majeur dans la dissémination mondiale des EMR en particulier des EP-BLSE, EPC ou encore des souches résistantes à la colistine via l'acquisition des gènes *mcr* (24,217–221). Les EP-BLSE sont particulièrement répandues dans les régions tropicales à niveau d'hygiène suboptimale notamment en Asie du Sud-Est et Afrique subsaharienne. Le taux d'acquisition varie en fonction des régions visitées allant de 10 % jusqu'à 70 à 90 % après un voyage vers le sous-continent indien par exemple, et près d'un tiers des individus restent porteurs pendant au moins six mois (206,209,222). La diarrhée du voyageur représente également un risque associé à l'acquisition d'EMR, témoignant de l'exposition au « péril fécal ». La survenue de diarrhée durant le voyage a été associée à une abondance accrue de *Prevotella copri* avant le voyage (210,209), suggérant une prédisposition particulière de certains individus. L'utilisation d'antibiotiques (notamment fluoroquinolones et bêta-lactamines) pendant le séjour, bien que souvent incriminée, n'est pas une condition indispensable, puisque l'acquisition de souches résistantes peut également survenir en l'absence de traitement (209,210). De même, la visite d'établissements de santé pendant le voyage est un facteur de risque, car ces environnements sont des lieux courants

d'exposition aux EMR (206). Certaines modalités de voyage, telles que les séjours chez des proches (VFR, *visiting friends and relatives*) ou l'hébergement en milieu privé, augmentent également le risque de colonisation par des souches multirésistantes. Les habitudes alimentaires constituent un autre facteur contributif, la consommation de légumes crus non lavés ou d'aliments de restauration de rue étant régulièrement associée à une exposition accrue (209).

Comme nous avons pu le voir, le microbiote intestinal sain joue un rôle central dans la résistance à la colonisation, mécanisme essentiel de protection contre l'implantation de bactéries exogènes, notamment les EMR (223–227). Toutefois, cette fonction protectrice peut être altérée lors de perturbations du microbiote, par exemple à la suite d'un traitement antibiotique ou d'un épisode de diarrhée, créant ainsi une vulnérabilité temporaire favorable à la colonisation (228–231). Dans le contexte des voyages, l'usage de probiotiques a été exploré comme approche préventive (232,233). Par exemple, l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* GG n'a pas montré d'efficacité significative pour prévenir la colonisation par des EP-BLSE chez les voyageurs en Inde.

C. Durée de portage des EMR après le voyage

La durée du portage des EMR varie considérablement. Elle est de courte durée (moins de 6 mois suivant le retour) pour la majorité des voyageurs revenus porteurs d'EMR. En considérant l'ensemble des voyageurs revenant de zones tropicale, environ 95 % ne sont pas porteurs d'EMR trois mois après le retour (218). Néanmoins, une minorité peut devenir porteur à long terme (plus de six mois, et jusqu'à un an) (222,234). Les études de suivi montrent généralement une diminution progressive du taux de colonisation. Par exemple, chez des voyageurs revenant d'Inde, la prévalence de colonisation par des EMR passait de 76 % après le voyage à 33 % après trois mois, 26 % après six mois et 18 % après un an (207). Une autre étude a rapporté qu'environ 20 % des voyageurs initialement colonisés l'étaient encore jusqu'à cent jours après leur retour, tandis que le portage persistant d'EMR pouvait se maintenir chez certains individus jusqu'à trente jours voire six mois (206,217). Le portage est asymptomatique mais peut conduire à des infections difficiles à traiter comme des infections urinaires. Les voyageurs colonisés peuvent transmettre les EMR à leur entourage intra-familial ou à la communauté.

Des études ont montré que la persistance des EMR après un voyage est associée à plusieurs facteurs : concentration intestinale élevée de EMR, destination, antibiothérapie durant le séjour, présence de $bla_{\text{CTX-M-9}}$ (en comparaison à d'autres variants de BLSE) et colonisation

par *E. coli* (en comparaison à d'autres espèces) (13,210,218,235). La composition initiale (avant le voyage) du microbiote intestinal pourrait également jouer un rôle important : une richesse et une diversité bactériennes plus faibles avant le départ est en effet associées à une persistance du portage de EMR un mois après le retour, tandis qu'une élimination rapide est liée à un profil enrichi en bactéries telles que *Bifidobacterium adolescentis* et certaines *Clostridiales* (*Agathobaculum*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Lactobacillus*) (210). Ces espèces, associées à une plus grande stabilité microbienne, pourraient protéger la communauté intestinale contre les perturbations liées au voyage (203). Bien qu'aucune étude n'a montré que la composition du microbiote initial avait un rôle sur le risque d'acquisition de EMR, une autre a montré qu'il pouvait intervenir dans la élimination une fois l'acquisition survenue (207). La nature transitoire de certaines colonisations suggère également l'existence d'une compétition entre les souches résistantes nouvellement acquises et le microbiote résident, contribuant à la élimination naturelle au fil du temps (207,209). Enfin, des facteurs comportementaux et liés à la destination comme un séjour en Asie du Sud, la visite à des proches ou la consommation de légumes crus, influencent le type et la quantité de bactéries résistantes rencontrées, déterminant ainsi indirectement le potentiel de portage à long terme (207,209).

Les voyages internationaux induisent des modifications marquées de l'écologie intestinale, en particulier par une augmentation transitoire et parfois persistante des entérobactéries (222). Notamment, on observe une augmentation de l'abondance relative de *Escherichia spp*. en raison de l'acquisition de nouvelles souches plutôt que de l'expansion de celles déjà présentes avant le départ (206,208–210). Ce phénomène est généralement réversible, les niveaux revenant à leur état basal en quelques semaines (208). Les modifications s'accompagnent également d'un basculement des phylogroupes des *E. coli* dominants. Alors que les voyageurs occidentaux sont initialement porteurs de souches appartenant majoritairement aux groupes B2 et D, reconnues pour leur forte capacité de colonisation et leur association aux infections extra-intestinales, le voyage favorise l'acquisition de souches issues des phylogroupes A et B1, généralement commensaux et plus fréquemment rencontrés chez les animaux, suggérant une origine zoonotique ou environnementale (209,236–244). Si la majorité des souches acquises sont éliminées rapidement, certaines peuvent persister durablement : ainsi, près d'un tiers des voyageurs revenant d'Inde demeurent colonisés par des *E. coli* multirésistantes six mois après leur retour (218,233–235,245). Ce portage prolongé s'explique par l'établissement d'une souche unique appartenant souvent aux phylogroupes B2, D ou F et caractérisée par la présence de gènes dits de virulence (*virulence-associated genes*, VAG) qui agissent en réalité comme facteurs d'adaptation ou de *fitness*, tels que les adhésines (*pap, nfaE, daaF, ecpA, flu*), systèmes de capture du fer (sidérophore yersinia-bactine codé par *fyuA/irp*) ou toxines

(*sat, senB*), favorisant sa survie dans le côlon (236,246–254). Ces souches sont fréquemment associées à des complexes clonaux épidémiques producteurs de BLSE (STc131, STc648, STc14, STc69, STc38) (234,255–258). Une fois implantées, elles évoluent très peu au sein de l'hôte, comme en témoigne la faible accumulation de polymorphismes nucléotidiques au fil du temps, traduisant une dérive génétique plus qu'une adaptation active (234). Leur plasticité génomique repose toutefois sur la perte ou l'acquisition d'éléments génétiques mobiles, tels que plasmides ou intégrons, qui contribuent à la dissémination de gènes de résistance. En définitive, la dynamique des *E. coli* lors des voyages repose sur une exposition massive à de nouvelles souches, le plus souvent transitoires, et sur la possibilité plus rare mais préoccupante d'un portage prolongé lié à l'acquisition d'une souche particulièrement bien adaptée à l'écosystème intestinal.

Objectif de la thèse

Notre travail s'inscrit dans la continuité de l'étude VOYAG-R qui a suivi des volontaires sains voyageant en régions tropicales entre février 2012 et avril 2013 (218). Cette cohorte visait à évaluer l'évolution du portage intestinal d'EMR durant et après le voyage. Le risque d'acquisition s'est révélé élevé : la moitié des voyageurs sont revenus porteurs de BMR, avec une moyenne de 1,8 souche acquise par individu. De manière significative, si certains voyageurs ont éliminé rapidement le portage, d'autres l'ont maintenu pendant plus d'un mois, voire jusqu'à 6 à 12 mois dans certains cas. Une durée de portage prolongée était associée à la destination du voyage, notamment l'Asie, et à une abondance relative plus élevée de BMR au retour.

Une étude exploratoire de notre groupe menée par Leo *et al.* a suivi un sous-groupe de 43 voyageurs issu de cette même cohorte de voyageurs (210). 104 échantillons fécaux ont été collectés (pré-voyage, retour, 1 mois après), avec questionnaires de santé et séquençage de l'ADN complémentaire 16S et 23S. 20,9 % des voyageurs ont eu une diarrhée au cours du voyage et 39,5 % ont acquis des EMR. La diarrhée était liée à une diminution de la diversité microbienne. L'acquisition d'EMR était corrélée à des profils microbiens spécifiques (augmentation des Proteobacteria, diminution des Bacillota). Certaines espèces (*B. adolescentis*, *Clostridiales*) étaient associées à la décolonisation. Les échantillons pré-voyage montraient des signatures microbiennes distinctes chez les porteurs. L'étude souligne l'importance de la diversité microbienne dans la résistance à la colonisation. La diarrhée perturbe le microbiote et favorise la colonisation par EMR. Toutefois, cette étude avait des limites méthodologiques : taille d'échantillon réduite, résolution faible de l'analyse par séquençage des gènes ARNr 16S/23S. Cela n'a pas permis d'identifier précisément les espèces bactériennes associées à l'élimination des EMR et leur validation expérimentale subséquente.

Notre hypothèse principale est que la persistance de certaines souches résistantes dans le microbiote intestinal est multifactorielle, liée à un contexte favorable incluant un microbiote « avantageux » (diversité, richesse), un environnement nutritionnel spécifique, et des facteurs génétiques bactériens (comme la virulence) favorisant leur adaptation. Les objectifs sont d'identifier et de valider expérimentalement les bactéries intestinales responsables de l'effet barrière contre la colonisation par *E. coli* multirésistants chez des sujets colonisés par des *E. coli* multirésistants au retour d'un voyage en zone tropicale.

Les objectifs de ce travail sont de :

- Identifier et valider expérimentalement les bactéries intestinales spécifiques responsables de l'effet barrière contre la colonisation par *E. coli* multirésistants
- Caractériser les déterminants génomiques des souches de *E. coli* qui sont associées à leur persistance dans le microbiote intestinal de l'hôte

II. Matériels et Méthodes

1. Population

L'étude VOYAG-R (ClinicalTrials.gov identifier NCT01526187) a suivi le portage d'EMR défini comme l'acquisition d'entérobactéries résistantes aux C3G par la production de BLSE et/ou de céphalosporinases plasmidiques, et/ou de carbapénémases, dans le microbiote intestinal de volontaires sains voyageant vers des régions tropicales et qui n'en portaient pas avant leur départ (218). La cohorte étudiée comprenait 824 voyageurs adultes se rendant dans des régions tropicales pour une durée de 3 jours à 3 mois. Le recrutement a été effectué entre février 2012 et avril 2013 dans six centres de vaccination internationaux de la région parisienne. Les critères d'inclusion retenaient uniquement les individus non porteurs d'EMR avant le départ, soit 574 participants après application des autres facteurs d'exclusion. Les destinations concernaient l'Afrique subsaharienne, l'Amérique latine (incluant les Caraïbes) et l'Asie, avec une répartition équilibrée. Des échantillons fécaux ont été collectés avant et après le voyage, puis à 1, 2, 3, 6 et 12 mois chez les voyageurs porteurs d'EMR au retour, jusqu'à négativation. Les données recueillies incluaient des paramètres démographiques, alimentaires et médicaux, ainsi que des informations relatives au voyage (destination, durée, type, prophylaxie antipaludique, survenue de diarrhée, prise d'antibiotiques, recours aux soins sur place). L'abondance relative fécale des EMR a été quantifiée parmi l'ensemble des entérobactéries. Les échantillons ont été conservés à -80°C dans du bouillon cœur-cerveau glycériné à 10 %.

L'acquisition a concerné 292 sur 574 voyageurs (50,9 %), parmi lesquels 46,2 % (n = 135) ont acquis au moins deux souches distinctes (portage moyen de 1,8 BMR/voyageur). L'Asie présentait le taux le plus élevé (72,4%), suivie de l'Afrique subsaharienne (47,7 %) et de l'Amérique latine (31,1 %) ($p < 0,001$). Les destinations à plus haut risque comprenaient le Vietnam, l'Inde, le Pérou et le Togo. Trois voyageurs revenant d'Inde (0,5 %) ont acquis des EPC. La majorité des BMR correspondait à *E. coli* (93,3 %). Le mécanisme de résistance prédominant était la production de BLSE (91,8 %), essentiellement de type CTX-M (95,4 %), en particulier le groupe 1 (83,7 %). Le portage s'avérait généralement transitoire. À 1 mois, 33,9 % des porteurs restaient positifs, proportion qui diminuait à 19,1 % à 2 mois, 4,7 % à 3 mois, 2,1 % à 6 mois et 1 % à 12 mois. La durée du portage était plus longue chez les voyageurs revenant d'Asie ($p < 0,001$). Un niveau élevé d'abondance relative d'EMR au retour était associé à une persistance prolongée. À l'inverse, le portage de *E. coli* multirésistants

s'accompagnait d'un risque moindre de persistance comparé aux autres espèces (HR 0,58 ; IC95% : 0,38–0,90 ; p = 0,01).

L'analyse multivariée a identifié plusieurs facteurs significatifs associés à l'acquisition d'EMR: la région visitée (p < 0,001), l'utilisation de bêta-lactamines durant le séjour (OR 4,08 ; IC95% : 1,39–11,97 ; p = 0,011) et la survenue de diarrhée (OR 1,90 ; IC95% : 1,31–2,75 ; p < 0,001). Les voyages organisés en hôtels-clubs fermés étaient associés à un risque moindre comparativement aux visites familiales ou aux séjours en sac à dos (p = 0,033). L'utilisation de doxycycline en prophylaxie antipaludique n'était pas corrélée au risque d'acquisition.
Au total, l'étude VOYAG-R a mis en évidence une fréquence particulièrement élevée d'acquisition d'EMR chez les voyageurs en zone tropicale, notamment en Asie. L'acquisition est favorisée par la survenue de diarrhée et l'utilisation de bêta-lactamines durant le séjour. Néanmoins, le portage demeurait majoritairement transitoire, avec une disparition dans plus de 95 % des cas au-delà de trois mois.

Dans cette étude, 75 voyageurs de la cohorte VOYAG-R ayant acquis puis éliminé une EMR dans le mois suivant leur retour et désignés comme les « éliminateurs », ont été appariés 1 : 1 à 75 porteurs persistants à un mois désignés comme les « persistants », sur la base des concentrations intestinales d'EMR au retour, selon la méthode du plus proche voisin. Après appariement, la concentration moyenne en log était de -2,26 (écart-type 1,86) chez les cas et de -2,61 (écart-type 1,63) chez les contrôles pour les échantillons obtenus un mois après le retour. La différence moyenne observée était de 0,35 et la valeur de *p* obtenue par le test de Wilcoxon était de 0,14.

2. Extraction d'ADN total et séquençage

A. Extraction d'ADN à partir des échantillons de selles

L'ADN total a été extrait à partir des échantillons de selles (obtenus un mois après le retour) conservés à -80°C dans du bouillon cœur-cerveau glycériné à 10 % à l'aide du système automatisé *QIAcube* (Qiagen, Courtabœuf, France) (Figure 5) à l'aide du kit *QIAamp Power Fecal Pro* (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Ce kit, spécifiquement conçu pour l'extraction d'ADN microbien à partir d'échantillons de selles et d'intestins, associe un tube à billes et une lyse chimique, permettant une lyse plus efficace des bactéries et une élimination plus performante des inhibiteurs. Cette approche permet d'obtenir des rendements élevés en

ADN avec une pureté accrue (ratios A260/A280 avoisinant 1,8) et une variabilité réduite entre échantillons, ce qui en fait une méthode largement utilisée pour le séquençage à haut débit et l'étude du microbiote intestinal. L'intégration au *QIAcube* permet en outre l'automatisation du flux de travail et la réalisation en série de 12 extractions après une étape initiale de préparation (Figure 5). 500 µL de selles est déposé dans un microtube *PowerBead Pro Tube* (Qiagen) contenant des billes et la solution CD1, puis soumis à une homogénéisation dans un *TissueLyser II* (Qiagen) à vitesse maximale pendant 15 min. La combinaison de la lyse mécanique et chimique assure une rupture rapide et homogène des cellules, optimisant ainsi la préparation des échantillons. Le tube est ensuite centrifugé à 15 000 g pendant 1 minute et le surnageant transféré dans un nouveau micro-tube destiné au *QIAcube* qui réalisera la suite de l'extraction d'ADN. Les inhibiteurs sont éliminés, tandis que l'ADN génomique est retenu sur une membrane de silice intégrée à une colonne de centrifugation. Après les étapes de purification, l'ADN est élué dans 50 µL. La concentration d'ADN a été mesurée avec le kit *Qubit DNA HS Assay kit* (Life Technologies, Reinach, Suisse).



Figure 5 : Automate *QIAcube* (Qiagen) disponible dans notre laboratoire.

B. Extraction d'ADN à partir de colonies bactériennes

L'ADN génomique des souches de *E. coli* et de *Bifidobacterium* a été extrait avec le système automatisé *EZ1 Advanced XL* (Qiagen), à l'aide du kit *EZ 1 & 2 DNA Tissue* (Qiagen) selon les recommandations du fabricant (Figure 6). Les réactifs sont fournis sous forme de cartouches préremplies et scellées qui contiennent l'ensemble des réactifs et consommables nécessaires à l'extraction de l'ADN à partir de colonies bactériennes incubées 24h. L'extraction est basée sur un principe de particules magnétiques recouvertes de silice. La lyse des cellules après incubation dans le tampon G2 contenant de la protéinase K est d'abord réalisée, suivie d'une homogénéisation. Les échantillons ainsi prétraités sont ensuite chargés

dans l'instrument, où l'ADN génomique est purifié en une seule étape, puis élué dans un volume final de 50 µL. La concentration d'ADN a été mesurée avec le kit *Qubit DNA HS Assay* (Life Technologies, Reinach, Suisse).



Figure 6 : Automate *EZ1 Advanced XL* (Qiagen) disponible au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Bichat-Claude Bernard (Paris, France).

C. Séquençage Illumina

Les librairies *shotgun* ont été préparées à partir de l'extrait d'ADN des échantillons de selles et des souches bactériennes à l'aide du kit Illumina *DNA library prep kit* (Illumina) associé aux index *Nextera DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)* (Illumina) selon un protocole adapté du fabricant (Annexe 1). Les échantillons ont ensuite été séquencés sur la plateforme *NextSeq550* (Illumina) avec une *flow cell* à haut débit (séquençage *paired-end* 2x150 pb permettant jusqu'à 800 millions de *reads*) (Figure 7). Concernant le séquençage des selles, entre 20 et 22 échantillons de selles ont été multiplexés par séquençage (sept au total) avec l'objectif d'avoir entre 36 et 40 millions de *reads* par échantillon pour obtenir une bonne profondeur de séquençage et permettre d'identifier les populations les moins dominantes ainsi qu'une meilleure reconstruction des génomes. Concernant le séquençage des souches, entre 200 à 220 souches ont été multiplexées par séquençage (deux au total) avec l'objectif d'avoir 4 millions de *reads* par souche soit une profondeur théorique attendue de 240X.



Figure 7 : Automate *NextSeq550* (Illumina) disponible au laboratoire de génétique de l'hôpital Bichat-Claude Bernard (Paris, France).

D. Séquençage Nanopore

En complément, un séquençage des échantillons de selles par la technologie Nanopore a été réalisé. Les librairies ont été préparées à l'aide du kit *Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109* (ONT), à partir d'ADN total extrait de selles, conformément aux recommandations du fabricant (https://nanoporetech.com/document/gDNA-sqk-lsk109). Ensuite, les librairies ont été chargées sur des *flow cells* de type R9 (première génération), et le séquençage a été conduit sur un *MinION Mk1C* ™ (Figure 8).

Au total, sept séquençages ont été effectués, chacun incluant entre 21 et 24 échantillons de selles multiplexés.



Figure 8 : MinION Mk1C ™ (ONT) disponible dans notre laboratoire.

3. Analyses bioinformatique et statistique

A. Qualité du séquençage et assemblage des *reads*

Dans le cas des données Illumina, les *reads* bruts fournis au format FASTQ sont associés pour chaque *read* de la séquence nucléotidique à un score *Phred* attribué à chaque base. Ce score est logarithmiquement corrélé à la probabilité d'erreur : ainsi, un Q20 correspond à une précision de 99 % (1 erreur sur 100 bases), tandis qu'un Q30 reflète une précision de 99,9 % (1 erreur sur 1000 bases). Le taux d'erreur global d'un séquençage Illumina est généralement inférieur à 1 %.

Plusieurs outils bioinformatiques permettent d'évaluer ces paramètres dont FastQC qui est l'outil de référence, produisant un rapport détaillé incluant notamment (259):

- *Per Base Sequence Quality*, c'est-à-dire la distribution des scores par position, mettant souvent en évidence une baisse de qualité en extrémité 3'.
- *Per Sequence Quality Scores*, c'est-à-dire la distribution de la qualité moyenne par *read*, qui devrait idéalement être élevée pour la majorité des lectures.
- *Per Tile Sequence Quality* qui permet de vérifier l'homogénéité de la qualité sur la *flow cell*.
- *Per Base Sequence Content*, soit la proportion de chaque base par position, utile pour détecter des biais éventuels.
- *Per Base N Content*, soit la proportion de bases indéterminées (N), qui doit rester faible.
- *Adapter Content* qui permet la détection d'adaptateurs résiduels à éliminer si nécessaire.

MultiQC agrège les rapports de FastQC (et d'autres outils) pour l'ensemble des échantillons, facilitant ainsi la comparaison et l'identification rapide d'anomalies (260).

Pour la technologie Nanopore, l'évaluation de la qualité est étroitement liée au processus de *base calling*, qui convertit les signaux électriques bruts enregistrés lors du passage des acides nucléiques à travers un nanopore en séquences de bases. Les signaux bruts, enregistrés dans des fichiers POD5 par le logiciel MinKNOW, sont transformés en séquences (FASTQ ou BAM). Différents modèles de *base calling* sont disponibles selon le compromis vitesse/précision : *Fast, High Accuracy* (HAC) et *Super Accurate* (SUP). Le score *Phred* est attribué à chaque base comme pour Illumina. La qualité brute d'un *read* (moyenne des scores *Phred* par *read*) et la précision brute (alignement sur une référence et comptage des erreurs) sont des indicateurs clés. Une précision de 99 % signifie que 99 bases sur 100 sont correctement

identifiées. Les modèles de *base calling* développés par Nanopore sont validés sur des régions génomiques indépendantes de l'entraînement initial. Les performances sont évaluées en termes de précision d'alignement, de capacité à traiter des régions difficiles (ex. homopolymères), de qualité d'assemblages *de novo* et de fiabilité dans la détection de variants (SNPs, indels). L'analyse peut être effectuée en temps réel via MinKNOW (ONT), ou via la plateforme EPI2ME (ONT), qui propose des processus de travail (*workflows*) préconfigurés pour différentes applications. Le taux d'erreur global d'un séquençage Nanopore est attendu est de 10 % en avec les *flow cells* de type R9 utilisée dans le cadre de notre étude.

Assemblage de reads obtenus après séquençage des échantillons de selles

Les *reads* Illumina ont d'abord été filtrés avec Trim Galore!, un outil intégrant Cutadapt et FastQC, permettant à la fois la suppression des adaptateurs résiduels et l'élimination des *reads* de faible qualité, tout en fournissant un contrôle qualité standardisé (261,262). Un assemblage hybride a ensuite été généré à l'aide de metaSPAdes (*St. Petersburg genome assembler*), qui combine les *reads* courts Illumina avec les *reads* longs Nanopore, afin d'optimiser la longueur et la qualité des contigs (se traduisant en français par séquence d'ADN continue obtenue après l'assemblage de fragments de séquençage qui se chevauchent) obtenus (263,264). La qualité des assemblages obtenus a été évaluée avec QUAST (*Quality Assessment Tool for Genome Assemblies*), qui calcule divers indicateurs de performance, notamment le nombre de contigs total, la taille totale de l'assemblage, les valeurs N50/L90 et la présence de gènes essentiels (265,266).

Assemblage de reads obtenus après séquençage des souches bactériennes

Premièrement, un contrôle de qualité des données brutes a été réalisé avec FastQC, déjà abordé plus haut. Les assemblages *de novo*, c'est-à-dire sans utiliser un génome de référence pour guider la reconstruction, ont été générés avec SPAdes.

B. Analyse du microbiote intestinal

Reconstruction des métagénomes

Toutes les étapes permettant la reconstruction des MAGs sont détaillées dans la Figure 9. L'objectif est de reconstruire des génomes individuels ou ébauches de génomes, appelés génomes assemblés à partir de métagénomes ou MAGs (*metagenome-assembled genomes)*, en triant et regroupant des contigs dans des « corbeilles » virtuelles, ou bins, en fonction de leurs caractéristiques. Les algorithmes se basent sur des indices comme leur abondance relative dans l'échantillon et leur composition en ADN pour déduire quels contigs appartiennent au même génome.

Ici, pour la reconstruction des génomes issus des données métagénomiques, MetaBAT2 (*Metagenome Binning with Abundance and Tetranucleotide frequencies*) a été utilisé (267). Celui-ci utilise le *binning* non supervisé qui repose sur deux signatures caractéristiques des contigs utilisées conjointement : (i) la composition en séquences basée sur la fréquence des tétra-nucléotides, stable et spécifique à chaque génome microbien, qui permet de distinguer des fragments appartenant à des espèces différentes, et la probabilité de distance de fréquence des tétra-nucléotides permettant de quantifier la similarité de composition entre deux contigs; et (ii) l'abondance ou couverture qui suppose qu'un même organisme devrait avoir une couverture de séquence similaire entre différents échantillons et permettant de calculer la probabilité de distance d'abondance, qui mesure la similarité des profils de couverture entre contigs.

L'abondance relative de chaque MAG dans les différents échantillons a ensuite été estimée à l'aide du module Quant_bins du pipeline metaWRAP, qui aligne les *reads* bruts sur les *binned contigs* et normalise la couverture, fournissant ainsi un profil quantitatif comparatif des populations microbiennes reconstruites (268).
La classification taxonomique de ces MAGs a été effectuée avec GTDB-Tk (*Genome Taxonomy Database Toolkit*), qui assigne les génomes au niveau taxonomique le plus précis possible, en s'appuyant sur la *Genome Taxonomy Database* (GTDB), une base de données de référence normalisée pour la phylogénie bactérienne et archéenne (269). Enfin, la qualité des MAGs a été estimée à l'aide de CheckM2, un outil basé sur l'identification de gènes marqueurs universels, qui permet de calculer des métriques de complétude (proportion de gènes attendus présents) et de contamination (redondance de gènes marqueurs), garantissant ainsi l'évaluation de leur fiabilité pour des analyses ultérieures (270,271).

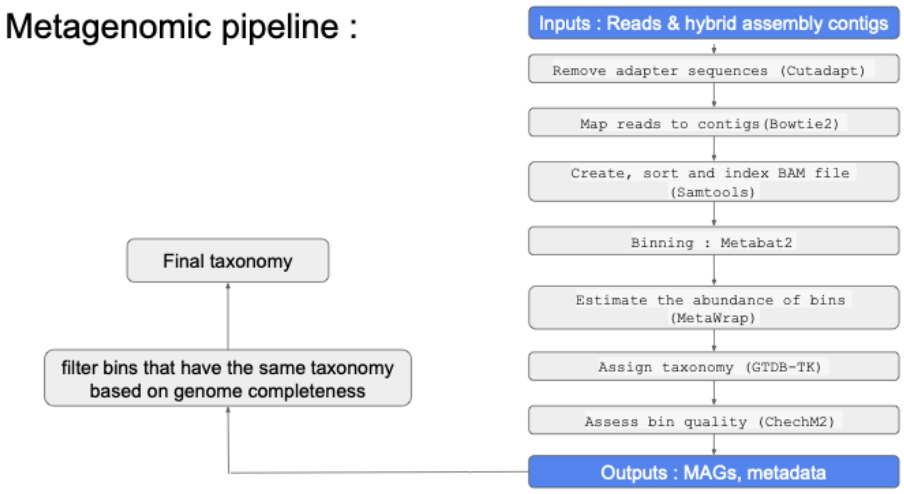


Figure 9 : Organigramme résumant les étapes du processus bioinformatique permettant d'obtenir une table de taxonomie à partir de contigs.

Analyse du microbiote

À partir des données taxonomiques, l'abondance relative des populations bactériennes a été évaluée et testée pour détecter des différences selon divers paramètres : l'analyse de la diversité du microbiote combine l'estimation de la richesse intra-échantillon, c'est-à-dire la diversité alpha, et la comparaison inter-échantillons, c'est-à-dire la diversité bêta.

La diversité alpha fait référence au nombre total de taxons dans un échantillon donné et mesure la variabilité observée au sein d'un échantillon individuel et se mesure à l'aide d'indices tels que l'indice de Shannon et Simpson inverse, qui prend en compte à la fois la richesse taxonomique et l'équitabilité de la distribution. Ces indicateurs ont permis de comparer les deux groupes statistiquement en réalisant des tests de Wilcoxon.

La diversité bêta évalue les différences de composition microbienne entre échantillons. Elle est souvent analysée au moyen de méthodes d'ordination telles que l'analyse en composantes principales (PCA) qui repose sur la réduction de dimensionnalité par calcul des valeurs propres d'une matrice de covariance, ou l'analyse en coordonnées principales (PCoA) qui est une alternative plus flexible, car elle peut intégrer différentes métriques de distance et est mieux adaptée aux données du microbiote pour fournir une représentation plus fidèle des variations communautaires. La diversité bêta a été calculée sur la base de la dissimilarité de Bray-Curtis et visualisée sur un nuage de points, telle qu'implémentée dans le package R vegan (272). La PCA a été effectuée avec la fonction *prcomp* du package R de base, en s'appuyant sur la distance euclidienne appliquée aux abondances relatives d'un ensemble restreint d'espèces sélectionnées. De plus, la PCoA a été conduite à l'aide de la fonction *ordinate* du package phyloseq (sans application de raréfaction), en utilisant cette métrique de distance.

Analyse statistique

L'identification des taxons microbiens associés à l'élimination des EMR a été réalisée à l'aide de l'analyse LEfSe (*Linear Discriminant Analysis Effect Size*) (273). LEfSe est une méthode de détection des taxons (genres, espèces, etc.) différentiellement abondants entre des groupes, par exemple « cas *versus* témoins ». Elle combine des tests statistiques non paramétriques (ex. test de Kruskal-Wallis) avec une analyse linéaire discriminante (LDA) pour estimer l'ampleur de la différence. Le test non paramétrique (Kruskal-Wallis ou Wilcoxon) identifie les taxons dont les abondances diffèrent significativement entre les groupes. Ensuite, l'analyse en composantes discriminantes linéaires (LDA) est appliquée pour évaluer dans quelle mesure ce taxon contribue à la séparation entre les groupes, c'est-à-dire son effet discriminant. Le score LDA (souvent sur une échelle logarithmique, ex. log10) quantifie l'importance de ce taxon comme biomarqueur potentiel. Un taxon avec un score LDA élevé et

une valeur de *p* significative est non seulement différent statistiquement entre les groupes mais contribue aussi fortement à les distinguer. Si le taxon a une valeur de LDA moyenne ou faible et une valeur de *p* significative, le taxon est différent, mais sa contribution à la classification est plus faible ; il peut s'agir d'un effet plus modeste, ou d'une variabilité individuelle.

Nous avons choisi de réaliser une analyse LEfSe car c'est celle qui avait été utilisée dans l'étude preuve de concept de Leo *et al.* sur laquelle repose notre étude afin d'en comparer les résultats et que vous avons appariés nos deux groupes de voyageurs.

C. Analyse des souches et MAGs de *E. coli*

PETA'n'C

Le pipeline interne développé au sein de notre unité de recherche IAME, nommé PETA'n'C (« *Plasmid-Exploration, Typing, Assembly N'Contig-ordering* »), a été utilisé. Celui-ci intègre plusieurs outils couramment employés pour l'analyse génomique bactérienne.

Les groupes phylogénétiques (ou phylogroupes) ont été déterminés *in silico* à l'aide de la méthode *ClermonTyping*, qui repose sur l'identification de marqueurs génomiques permettant de classer les isolats de *E. coli* dans les principaux groupes phylogénétiques décrits (274).

Le *multi-locus sequence typing* (MLST) a été effectué selon le schéma Warwick, ce qui a permis d'assigner à chaque souche un type de séquence (ST) basé sur le profil allélique de sept gènes de ménage (275). Par ailleurs, les sérotypes O:H ont été déterminés à partir des données génomiques, et les allèles *fimH* ont été identifiés afin de fournir une résolution supplémentaire dans la discrimination clonale (276,277).

Le résistome, le virulome et les types de plasmides ont été caractérisés avec le logiciel Abricate (https://github.com/tseemann/abricate) (278). Les gènes de résistance aux antibiotiques (*antibiotic resistance genes*, ARG) ont été détectés à l'aide de la base ResFinder 4.0, les gènes de virulence (*virulence-associated genes*, VAG) ont été recherchés dans une base personnalisée, et les réplicons plasmidiques ont été identifiés grâce à PlasmidFinder (279,280). L'ensemble de ces analyses a permis d'obtenir une description détaillée des déterminants de résistance et des facteurs de virulence au sein des génomes de *E. coli* étudiés.

Analyse de survie

Concernant l'analyse de survie des souches résistantes, la persistance au cours du temps des souches de *E. coli* multirésistantes a été analysée à l'aide de modèles de temps de défaillance accélérée (*accelerated failure time models*, AFT), implémentés dans le package Survival de R

(281,282). Ces modèles de survie paramétriques décrivent la relation entre la durée de persistance d'une bactérie et un ensemble de facteurs explicatifs. Les modèles AFT supposent que le temps de persistance suit une loi de probabilité spécifique. Quatre lois ont été testées : exponentielle, de Weibull, log-normale et log-logistique. Les ensembles de variables explicatives considérés étaient les suivants : (i) le phylogroupe de la souche et celui de la souche dominante lorsque celle-ci appartenait à *E. coli* (notée « Non-*Escherichia* » dans le cas contraire) ; (ii) le nombre total de VAGs associés portés par la souche ; (iii) le nombre de VAGs associés à cinq catégories de facteurs : les adhésines, protectines, systèmes de capture du fer, invasines et toxines ; (iv) le nombre total d'ARGs identifiés.

Les souches dominantes ont été définies comme celles détectées dans les MAGs de *E. coli* présentant une complétude ≥ 60 % et une contamination ≤ 5 %, selon les estimations du logiciel CheckM2. Pour chaque ensemble de variables, la distribution du temps de persistance la plus adaptée a été sélectionnée à l'aide du critère d'information d'Akaike (*Akaike information criterion*, AIC), tandis que les facteurs explicatifs inclus dans le modèle final ont été sélectionnés par méthode séquentielle ascendante (*forward*) et descendante (*backward*), basée également sur l'AIC (283,284).

D. Analyse des souches et MAGs de *Bifidobacterium*

Un arbre phylogénétique a été construit à partir de trois types de génomes de *Bifidobacterium* : (i) les génomes de référence (extraits de la base RefSeq en 2022, n = 799), (ii) les MAGs issus issu de l'analyse du microbiote intestinal des voyageurs (n = 149), et (iii) les génomes des souches expérimentales de *B. longum* 1, 3 et 4 et de *B. adolescentis* 1, 2, 3 et 4 (n = 7). Tous les génomes inclus dans l'arbre présentaient une abondance de contamination prédite inférieure à 5 %, à la fois selon CheckM2 v.1.0.2 et GUNC v.1.0.6, ainsi qu'une complétude supérieure à 60 % d'après CheckM2 (271,285). L'annotation génétique a été réalisée avec le logiciel Prokka v.1.14 (286). À partir de ces trois groupes de génomes, un pangénome a été construit avec Panaroo v.1.5.0 (287). Le seuil pour qu'un gène appartienne au *core genome* a été abaissé à 90 % (au lieu de 95 % par défaut), afin de maintenir un nombre élevé de gènes alignés dans le *core genome*.

À partir de l'alignement des gènes du *core genome*, un arbre phylogénétique a été construit avec IQ-TREE v.2.2.0 (288). Il s'agit d'un arbre de vraisemblance maximale (*maximum likelihood*), pour lequel le choix du modèle d'évolution a été réalisé avec l'outil ModelFinder, intégré à IQ-TREE (289). Cet outil a retenu le modèle de substitution nucléotidique GTR+F+I+G4 : un modèle basé sur le *Generalised Time Reversible* d'après Tavaré (1986),

avec (i) les fréquences nucléotidiques tirées d'une distribution empirique (F), (ii) une probabilité pour chaque site d'être invariant (I), et (iii) les probabilités de substitution tirées d'une distribution gamma discrète avec quatre catégories (G4) (290,291). Un *bootstrapping* a été réalisé pour tester la robustesse de l'arbre, avec 1 000 réplicas. Les scores de *bootstrapping* obtenus (en %) sont représentés dans l'arbre sous la forme de rectangles colorés sur les nœuds intérieurs, avec une échelle continue allant du jaune (0 %) au noir (100 %) en passant par l'orange, le rouge et le violet (Figure 24). Le seul nœud proche du *midpoint* présentant un faible score de *bootstrap* est celui séparant *B. pullorum* du reste de l'arbre (branche menant à *B. bifidum, B. longum et B. adolescentis*) et représenté graphiquement à la racine de l'arbre. Cela s'explique probablement par le faible nombre de génomes de référence de *B. pullorum* (n = 1).

L'arbre a ensuite été visualisé avec le logiciel TreeViewer v.2.2.0, en forme d'éventail avec la racine placée au *midpoint* (290). Les génomes de référence (en noir) étaient, comme attendu, groupés ensemble sur l'arbre initial. Pour faciliter la visualisation, un seul génome de référence est représenté sur l'arbre final : il a été choisi pour présenter la distance co-phénétique médiane la plus faible avec les autres génomes de référence de la même espèce. Son GCF, qui correspond aux assemblages issus de RefSeq, est indiqué pour l'identifier, ainsi que le nombre de représentants de cette espèce utilisés pour calculer l'arbre (par exemple n306 pour 306 génomes de *B. longum*). Le phénotype de persistance ou d'élimination du métagénome auquel le MAG est associé détermine la couleur du nom du MAG (rouge pour les MAGs issu des voyageurs persistants, bleu pour les MAGs issu des voyageurs éliminateurs).

4. Tests de compétition bactérienne *in vitro*

A. Mise au point

Étapes préliminaires

Dans le cadre de compétitions bactériennes, les souches candidates correspondaient aux *Bifidobacterium* : quatre souches de *B. adolescentis* issues de la Collection de l'Institut Pasteur (https://catalogue-crbip.pasteur.fr/recherche_catalogue.xhtml) et quatre souches cliniques de *B. longum* isolées dans le sang de patients hospitalisés à l'hôpital Bichat (AP-HP, Paris, France) ont été testées. Tandis que les souches cibles étaient représentées par des *E. coli* issues de la cohorte VOYAG-R, incluant 6 voyageurs avec une souche de *E. coli* isolée au

retour appelée “S2” et une souche de *E. coli* isolée à un mois appelée “M1” (12 souches de *E. coli* au total).

Pour les expériences, des géloses solides de Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) de 20 ml et 16,5 ml ont été préparées dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre, ainsi que des géloses molles de LB à 0,75 %.

Concernant les souches de *Bifidobacterium*, les cultures sur milieu solide ont été réalisées sur gélose au sang Columbia supplémentée avec 5 % de sang de mouton (Biomérieux®, Marcy-l'Étoile, France), incubées à 37 °C en conditions anaérobies générées par des sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L (Thermo Scientific™, Waltham, États-Unis) pendant 16 à 18 h. Les cultures en milieu liquide ont été réalisées soit en bouillon LB, soit en bouillon de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Thermo Scientific™) par ensemencement d’une oese pleine de 1 µl de colonie dans 5 ml, incubées à 37 °C dans un agitateur-incubateur MULTITRON (INFORS HT, Bottmingen, Suisse), en condition anaérobie obtenue par recouvrement à l’huile de paraffine liquide (Thermo Scientific™), jusqu’à atteindre une densité optique (DO) à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5.

Les surnageants de culture acellulaires de *Bifidobacterium* ont été obtenus à partir de cultures liquides incubées pendant 16 à 18h (l’équivalent d’une nuit) et centrifugées à 12 000 g pendant 10 min à 4 °C, puis filtrées à travers une membrane de 0,22 µm. Trois conditions expérimentales ont été testées : un surnageant acellulaire ajusté à pH neutre (avec une solution de NaOH 3M), un surnageant acellulaire ajusté à pH acide (avec une solution de HCl 0,1M) et un surnageant acellulaire chauffé à 100 °C pendant 20 min. Pour la mise au point, les surnageants acellulaires ont été mélangés afin de tester 3 modalités expérimentales : (i) P1 correspondant au mélange des surnageants des quatre *B. adolescentis*, (ii) P2 correspondant au mélange des surnageants des quatre *B. longum*, et (iii) P3 correspondant au mélange des surnageants des quatre *B. adolescentis* associés aux quatre *B. longum*.

Concernant les souches de *E. coli*, elles ont été cultivées en milieu solide sur gélose LB à 37 °C en condition aérobie, et en milieu liquide par ensemencement d’une colonie dans 10 ml de LB, incubées à 37 °C dans un agitateur-incubateur MULTITRON jusqu’à atteindre une DO à 600 nm d’environ 0,8.

Méthode des puits

La méthode des puits (Figure 10) est une technique de diffusion sur gélose utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne, en particulier sur l'effet de substances extracellulaires comme celles présentes dans le surnageant de culture acellulaire.

Le protocole de la méthode des puits est le suivant (292,293) :

1. Préparation de la souche indicatrice : Une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé est inoculée de manière confluente avec la souche bactérienne indicatrice.
2. Création des puits : Des puits de diamètre défini (par exemple, 6 ou 7 mm) sont percés dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Parfois, le fond des puits est scellé avec une petite quantité de gélose pour éviter les fuites (294).
3. Dépôt de la solution à tester : Une quantité fixe de la solution à tester est pipetée dans chaque puits. Cette solution est souvent un surnageant de culture de la souche productrice (288). Des dilutions en série du surnageant peuvent être utilisées pour quantifier l'effet.
4. Incubation et mesure : Après incubation, si la solution contient des substances antimicrobiennes, celles-ci diffusent dans la gélose et inhibent la croissance de la souche indicatrice. Cela se traduit par une zone d'inhibition circulaire et claire autour du puits. Le diamètre de cette zone est alors mesuré (295).

Cette méthode des puits permet de quantifier l'activité antimicrobienne (293). En effet, il existe une relation linéaire entre le diamètre de la zone d'inhibition et le logarithme de la concentration de la substance inhibitrice permettant d'établir des courbes dose-inhibition et de calculer un titre d'activité en unités arbitraires par millilitre (UA/ml) (296). Une unité arbitraire est souvent définie comme l'inverse de la plus haute dilution qui inhibe la croissance de la souche indicatrice (293).

Une suspension bactérienne de *E. coli* à 10^8 UFC/ml est préparée à partir d'un bouillon de *E. coli* incubé pendant 16 à 18h (l'équivalent d'une nuit) (dilution 1/10 du bouillon à une DO 600 nm à 0,8), puis 100 µl de cette suspension ont été mélangés à 3,5 ml de gélose LB molle à 0,75 % avant d'être répartis en surcouche sur une gélose solide LB de 16,5 ml, soit une concentration finale de *E. coli* à 10^6 UFC/ml. Après solidification, quatre puits ont été réalisés à l'aide de cônes stériles de 200 µL retournés, et chacun a été rempli avec 100 µL de surnageant acellulaire P1, P2 et P3. Un contrôle négatif correspondant à 100 µl de bouillon LB et un contrôle positif constitué d'un disque imprégné d'ertapénème (antibiotique de la classe des carbapénèmes hydrolysant les souches de *E.coli*-BLSE) chargé à 10 µg (Bio-Rad, Hercules, États-Unis) ont été utilisés. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 37 °C en condition anaérobie générée par des sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2,5 pendant 16-18h. Les résultats ont été évalués à 24h et 48h par la recherche de zone d'inhibition autour des puits ou du disque de papier, l'effet inhibiteur étant retenu pour des diamètres supérieurs à 6 mm.

Aucune activité inhibitrice n'a été mise en évidence avec cette méthode. L'évaluation réalisée sur les 12 souches de *E. coli* n'a révélé aucun effet inhibiteur.

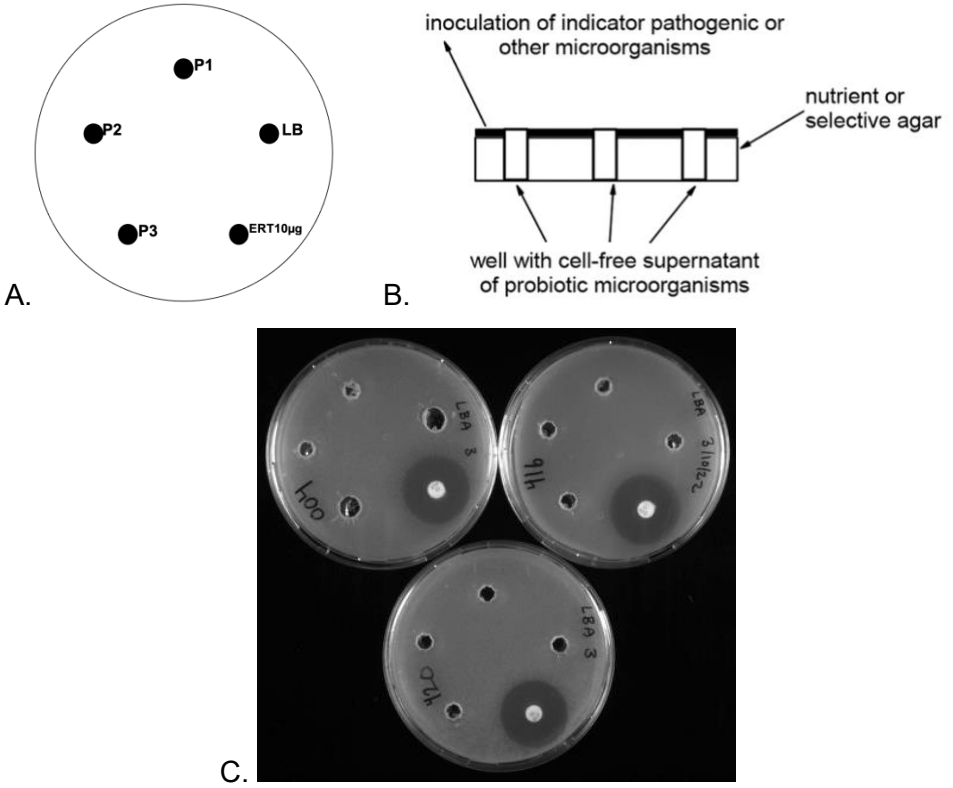


Figure 10 : Méthodes des puits. (A) Représentation d'une boîte de Pétri de 55mm de diamètre vue d'en haut illustrant la répartition des différents dépôts réalisés avec 100 µl de P1, 100 µl P2 et 100 µL P3, LB (témoin négatif) et ERT 10 µg (témoin positif); (B) Représentation d'une boite de Pétri de 55mm de diamètre en coupe coronale montrant les différentes couches qui constitue la méthode : la couche LB, la couche LB 0,75% contant la souche indicatrice *E. coli* et les puits contenant le surnageant, issu de Fijan *et al.* (292); et (C) Example d'une photo des résultats obtenus à 48h pour trois souches de *E. coli* pour lesquelles aucun diamètre d'inhibition n'a été observé hormis autour du témoin positif.

Méthode des disques

La méthode des disques (Figure 11) est une technique de diffusion sur gélose utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de substances, notamment des surnageants de culture acellulaires d'une bactérie probiotique à tester (292,293,297). Elle est présentée comme une modification de la méthode des puits.

Le principe général est le suivant :

1. Préparation de la culture indicatrice : Une gélose est préparée dans une boîte de Pétri et inoculée avec la souche bactérienne indicatrice que l'on souhaite inhiber.
2. Imprégnation des disques : Des disques de papier filtre stériles, d'un diamètre de 6 mm, sont imbibés avec une quantité précise du surnageant de culture acellulaire (298).
3. Application et incubation : Les disques imbibés sont ensuite placés sur la surface de la gélose. La boîte est incubée dans des conditions appropriées.

4. Observation des résultats : Si le surnageant contient des substances antimicrobiennes, celles-ci diffusent depuis le disque dans la gélose et inhibent la croissance de la souche indicatrice. L'activité inhibitrice est évaluée en mesurant le diamètre de la zone claire d'inhibition qui se forme autour du disque.

Un ensemencement par diffusion a été réalisé sur des géloses rondes LB de 20 ml à partir d'une suspension de *E. coli* ajustée à 1 McFarland (soit environ 3 x 10^8 UFC/ml), étalée à l'aide d'un écouvillon en trois directions, selon la méthode utilisée pour les antibiogrammes. Cinq disques stériles de 6 mm de diamètre ont ensuite été déposés en surface, chacun imprégné respectivement de 20 µl de culture bactérienne, de 20 µl de surnageant filtré, de 20 µl de surnageant filtré ajusté à pH neutre et de 20 µl de bouillon de LB (témoin négatif). Les disques imprégnés ont été réalisés en réplicas. Une fois que les disques ont été placés sur la gélose LB, les géloses ont été incubées à 37 °C en condition anaérobie à l'aide de sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L.

La lecture a été réalisée à 24h et 48h en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques, une inhibition étant considérée comme significative pour des diamètres supérieurs à 6 mm. Aucune activité inhibitrice n'a été mise en évidence avec cette méthode. L'évaluation réalisée sur les 12 souches de *E. coli* n'a révélé aucun effet inhibiteur.

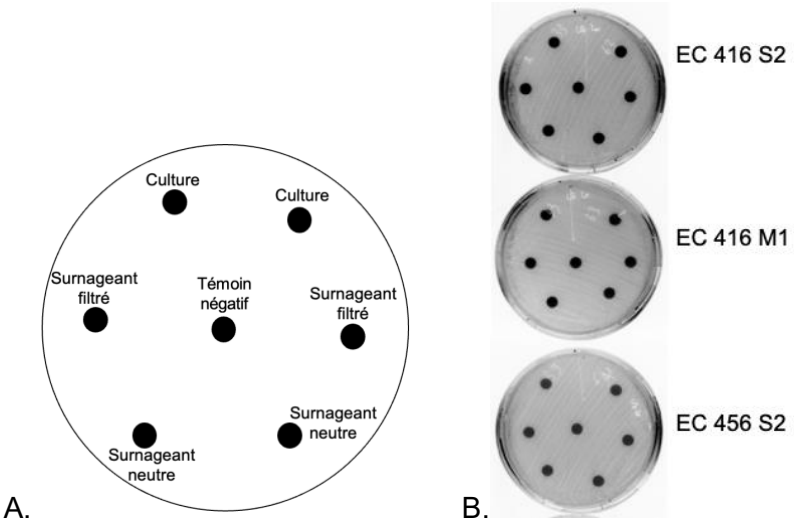


Figure 11 : Méthode des disques. (A) Représentation d'une boîte de Pétri de 55mm de diamètre vue d'en haut illustrant la répartition des disques imprégnés de 20 µL de culture, 20 µL de surnageant filtré, 20 µL de surnageant filtré et ajusté à pH neutre, 20 µL LB (témoin négatif), réalisé en duplicate ; (B) Example d'une photo des résultats obtenus à 48h pour 3 souches de *E. coli* pour lesquelles aucun diamètre d'inhibition n'a été observé.

Méthode d'antagonisme différé

Cette technique permet de détecter ou mesurer la production d'antibiotiques et la sensibilité d'une bactérie à une autre. Son principe repose sur l'idée de laisser une première bactérie productrice se développer avant d'introduire la seconde bactérie indicatrice (299). Cela permet à la souche productrice de sécréter des substances inhibitrices dans le milieu de culture avant d'être confrontée à la souche indicatrice. Cette méthode est également connue sous d'autres noms, tels que "*agar spot assay*" ou "*critical dilution assay*" ou "*spot-on-lawn assay*" (Figure 12) (292).

Le protocole général se déroule en plusieurs étapes :

1. Croissance de la souche productrice : Une suspension de la bactérie productrice est déposée au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé approprié. La boîte est ensuite incubée pour permettre à la colonie de se développer.
2. Élimination de la souche productrice : Une fois la croissance établie, les cellules de la souche productrice sont tuées ou retirées par exposition à des vapeurs de chloroforme, irradiation aux rayons ultraviolets (UV) ou retrait physique des cellules de la colonie productrice avec un écouvillon stérile (300). Une technique améliorée d'antagonisme différé a été proposée pour éviter l'utilisation de chloroforme, qui est toxique et peut inactiver certains antibiotiques (301). Cette modification consiste à ajouter un antibiotique dans la gélose molle de surcouche. Cet antibiotique est choisi de manière à être actif sur la souche productrice mais inactif sur la souche indicatrice, ce qui permet d'inhiber la croissance de la productrice sans affecter l'indicatrice.
3. Surcouche de la souche indicatrice : Une couche de gélose molle, ensemencée avec une culture de la souche indicatrice, est versée sur toute la surface de la boîte.
4. Incubation et observation : Après une nouvelle période d'incubation, on observe la croissance de la souche indicatrice. Si la souche productrice a sécrété une substance inhibitrice, une zone claire d'inhibition, où la bactérie indicatrice n'a pas pu pousser, apparaîtra autour de l'emplacement de la colonie productrice.

À partir de géloses LB de 16,5 ml, 10 µL de P1, P2 et P3 ont été déposés en surface, tandis qu'une solution de LB a été utilisée comme témoin négatif et un disque d'ertapénème 10 µg comme témoin positif.

Les boîtes ont ensuite été pré-incubées pendant 2h à 37 °C en atmosphère anaérobie à l'aide de sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L. Parallèlement, un bouillon de *E. coli* à 10^8 UFC/ml est préparé à partir d'un bouillon incubé pendant 16 à 18h (l'équivalent d'une nuit) de *E. coli* (dilution 1/10 du bouillon à une DO 600 nm à 0,8), puis 100 µL de cette suspension ont été mélangés à 3,5 ml de gélose LB molle à 0,75 %. A l'issue des 2h de pré-incubation, la

suspension de *E. coli* est répartie en surcouche sur une gélose solide LB de 16,5 ml, correspondant à une concentration finale de *E. coli* à 10^6 UFC/ml. L'incubation a été réalisée en condition aérobie à 37 °C pendant 16 à 18 h.

La lecture a été réalisée à 24h et 48h en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des dépôts, une inhibition étant considérée comme significative pour des diamètres supérieurs à 6 mm. Aucune croissance de *Bifidobacterium* n'ayant été observée sur le milieu LB, l'expérience a été répétée sur gélose Columbia enrichie à 5 % de sang de mouton, avec une phase de pré-incubation de 3h à 37 °C en atmosphère anaérobie générée par les mêmes sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L.

Aucune activité inhibitrice n'a été mise en évidence avec cette méthode. L'évaluation réalisée sur les 12 souches de *E. coli* n'a révélé aucun effet inhibiteur.

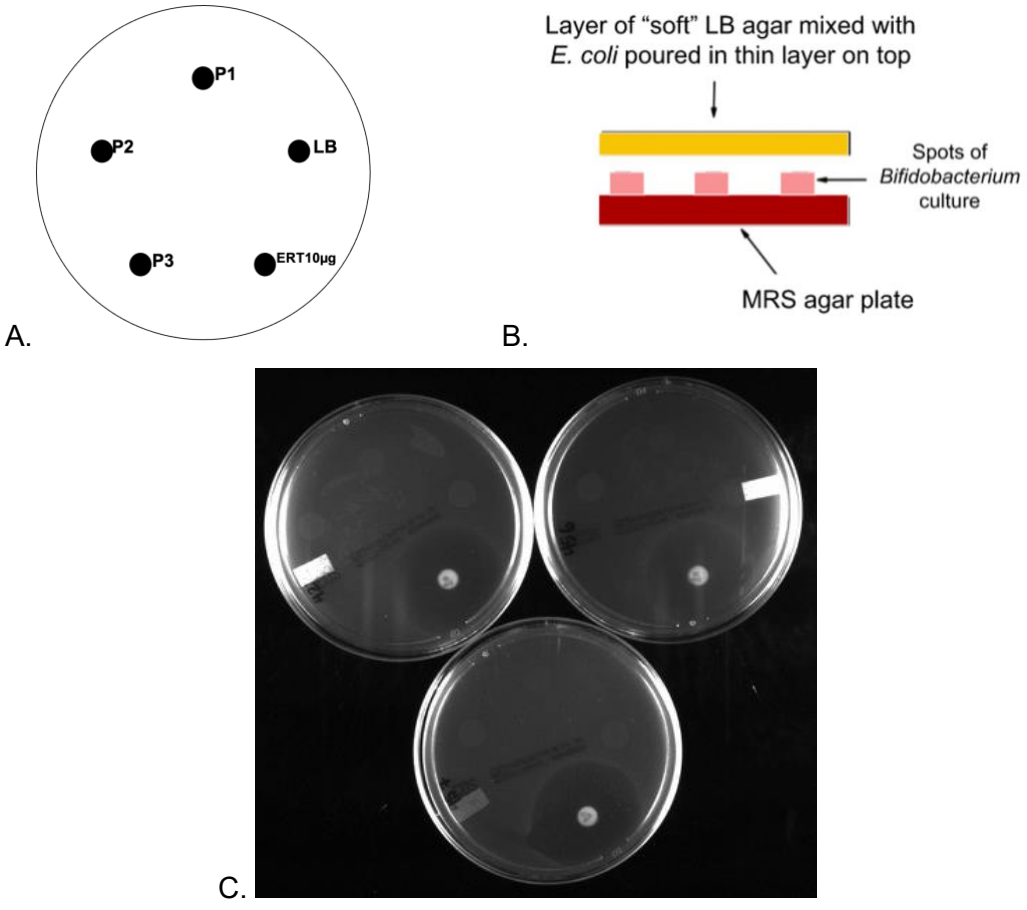


Figure 12 : Méthodes d'antagonisme différé. (A) Représentation d'une boîte de Pétri de 55mm de diamètre vue d'en haut illustrant la répartition des différents dépôts réalisé de 10 µL de P1, 10 µL de P2 et 10 µL de P3, 10 µL de LB (témoin négatif) et un disque d'ertapénème ERT 10 µg (témoin positif),; (B) Représentation d'une boîte de Pétri de 55mm de diamètre en coupe coronale montrant les différentes couches qui constitue la méthode : la couche MRS, les dépôts et la couche LB 0,75% avec *E. coli*, d'après Fijan *et al.* (292); et (C) Example de photo des résultats obtenus après 48h pour 3 souches de *E. coli* pour lesquelles aucun diamètre d'inhibition n'est observé hormis autour du témoin positif.

Méthode de co-culture en milieu liquide

Cette approche permet d'étudier l'activité antimicrobienne de certaines bactéries candidates en les faisant croître directement avec les bactéries ciblées dans un milieu de culture liquide. (292,302–305)

Le protocole général implique les étapes suivantes :

1. Préparation du milieu : Il peut s'agir de bouillons nutritifs ou de milieux plus complexes simulant des aliments comme du lait par exemple.
2. Inoculation : Des aliquotes des cultures de bactéries candidates et indicatrices sont inoculées dans le même milieu liquide. L'inoculation peut être simultanée ou séquentielle par exemple, la bactérie candidate est ajoutée à une culture de bactérie indicatrice ayant déjà poussé pendant la nuit.
3. Incubation : Les échantillons sont bien mélangés et incubés dans des conditions contrôlées (température, durée).
4. Évaluation : Après incubation, l'effet antimicrobien est déterminé en comptant la population de bactéries indicatrices par dénombrement bactérien (304). Une réduction significative du nombre de bactéries indicatrices par rapport à un contrôle (culture de la bactérie indicatrice seule) indique une inhibition. Les résultats sont généralement exprimés en UFC/ml, souvent sur une échelle logarithmique (log UFC/ml).

Une adaptation de cette méthode a été proposée par Ratsep *et al.* avec l'utilisation de microplaque permettant l'inoculation des surnageants de culture de bactérie candidate mélangée aux cultures de bactéries indicatrices dans les puits d'une microplaque puis incubé dans un lecteur automatisé de DO (303). L'inhibition de la croissance est mesurée par la DO avant et après incubation, et les résultats sont calculés en pourcentage d'inhibition.

Les tests de co-culture en milieu liquide ont été réalisés en microplaque à 96 puits (Figure 13-A) et à l'aide d'un lecteur Infinite® 200 PRO (Tecan, Life Sciences, Suisse). Pour chaque condition, une souche indicatrice (*E. coli*) a été mise en présence d'une souche candidate (*Bifidobacterium*) selon quatre modalités expérimentales : (i) co-culture directe, (ii) exposition au surnageant acellulaire ajusté à pH acide, (iii) exposition au surnageant acellulaire ajusté à pH neutre, et (iv) exposition au surnageant acellulaire chauffé. Les préparations ont été effectuées comme suit : 20 µl de suspension de *E. coli* ont été ajoutés à 162 µl de surnageant (pH acide, pH neutre ou chauffé) complétés par 18 µl de LB ; dans la condition co-culture, 20 µl de *E. coli* ont été mélangés à 50 µl de culture de *Bifidobacterium*, 112 µl d'eau stérile et 18 µl de LB. Trois témoins ont été inclus : (i) *Bifidobacterium* seul (132 µl d'eau + 50 µl de bouillon de culture + 18 µl de LB), (ii) *E. coli* seul (20 µl de *E. coli* + 162 µl d'eau stérile + 18 µl de LB), et (iii) contrôle négatif (182 µl d'eau stérile + 18 µl de LB). L'ensemble des conditions a été

réalisé en trois réplicats (trois puits pour chaque condition sur une microplaque). Une goutte de paraffine liquide a été déposée sur chaque puits avant de sceller la microplaque avec un film adhésif pour créer une atmosphère anaérobie. Les cultures ont ensuite été incubées dans le lecteur Infinite® 200 PRO (Tecan), permettant un suivi cinétique des croissances. La DO 600 nm a été mesurée toutes les 3 min pendant 24 heures.

A.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20
B	H20	T1	T1	T2	T2	T3	T3	EC	TB1	P1acid	P2acid	H20
C	H20	T1	T1	T2	T2	T3	T3	EC	TB1	P1neut	P2neut	H20
D	H20	T1	T1	T2	T2	T3	T3	EC	TB1	P1heat	P2heat	H20
E	H20	T1	T1	T2	T2	T3	T3	T-	TB2	TB3	P3acid	H20
F	H20	T1	T1	T2	T2	T3	T3	T-	TB2	TB3	P3neut	H20
G	H20	T1	T1	T2	T2	T3	T3	T-	TB2	TB3	P3heat	H20
H	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20	H20

Pour 1 souche indicatrice EC et 1 pool de Bifidobacterium :	LB	H20	surnag	EC	BF
• 20µL EC + 162µL surnageant pH « acide » + 18µL LB	18		162 acid	20	
• 20µL EC + 162µL surnageant pH7 + 18µL LB	18		162 neut	20	
• 20µL EC + 162µL surnageant chauffé + 18µL LB	18		162 heat	20	
• 20µL EC + 20 µL de culture bifido préincubé + 142 µL H20 + 18µL LB	18	142		20	20
• Témoin Bifido : 162 µL H20 + 20µL culture bifido préincubé + 18µL LB	18	162			20
• Témoin EC : 20µL EC + 162µL H20+ 18µL LB	18	162		20	
• Témoin nég : 162 µL H20 + 38µL LB	38	162			
• Témoin surnageant : 20 µL H20 + 162 µL surnageant + 18µL LB	18	20	162		

T1 : EC + Pool 1
T2 : EC + Pool 2
T3 : EC + Pool 3
EC : témoin EC
TB : témoin Bifido (1 pour pool 1, 2 pour pool 2, 3 pour pool 3)
T- : témoin nég
P : témoin surnageant

B.

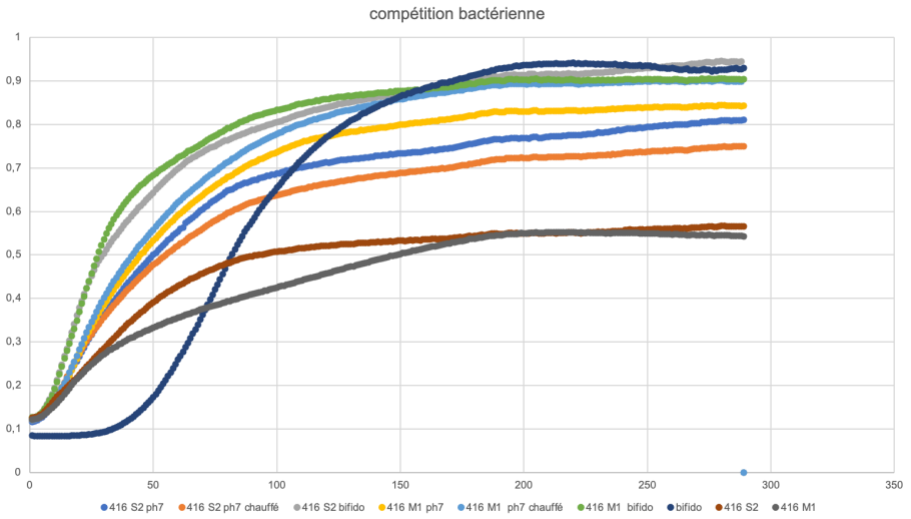


Figure 13 : Mise au point de co-culture en microplaque 96 puits. (A) Protocole de manipulation avec le plan de la microplaque et (B) Example de courbes de croissances obtenues avec en abscisse le temps en secondes et en ordonnées la valeur de DO 600 nm des différentes conditions testées.

Un décalage initial a été observé entre la croissance de *E. coli* et celle des *Bifidobacterium* (Figure 13-B), rendant nécessaire la mise en place d'une pré-incubation des *Bifidobacterium* en milieu LB pendant 2 heures afin d'harmoniser l'entrée des deux populations dans leur phase

exponentielle. Cela a permis d'optimiser les conditions de compétition en milieu liquide en assurant un démarrage simultané des cultures. Par ailleurs, afin d'accroître la concentration initiale en *Bifidobacterium*, les cultures incubées sur la nuit ont été réalisées en milieu liquide MRS plutôt qu'en LB, ce qui a permis d'atteindre des DO 600 nm d'environ 0,3 après 24 heures d'incubation (au lieu de 48h). Enfin, nous avons constaté que des concentrations initiales équivalentes de *E. coli* et de *Bifidobacterium* conduisaient à des courbes de croissance présentant des DO finales plus élevées, renforçant ainsi la robustesse de la comparaison des dynamiques compétitives.

Deux types d'inhibition ont été observés : durant la phase exponentielle avec un délai retardé de croissance en présence de *Bifidobacterium*, et une diminution de la croissance bactérienne totale atteinte en phase stationnaire (Figure 14) (306,307). L'activité inhibitrice a été évaluée par le pourcentage de réduction de la croissance de la souche résistante de *E. coli* exposée à une souche de *Bifidobacterium* ou à son surnageant par rapport à la croissance de *E. coli* seul. En phase exponentielle, nous avons comparé l'aire sous la courbe entre la souche de *E. coli* témoin et la souche de *E. coli* associée à *Bifidobacterium* après 6h45 (24310 secondes) de culture. En phase stationnaire, nous avons comparé les valeurs de DO finale à 24h entre la souche de *E. coli* témoin et la souche de *E. coli* associée au *Bifidobacterium*.

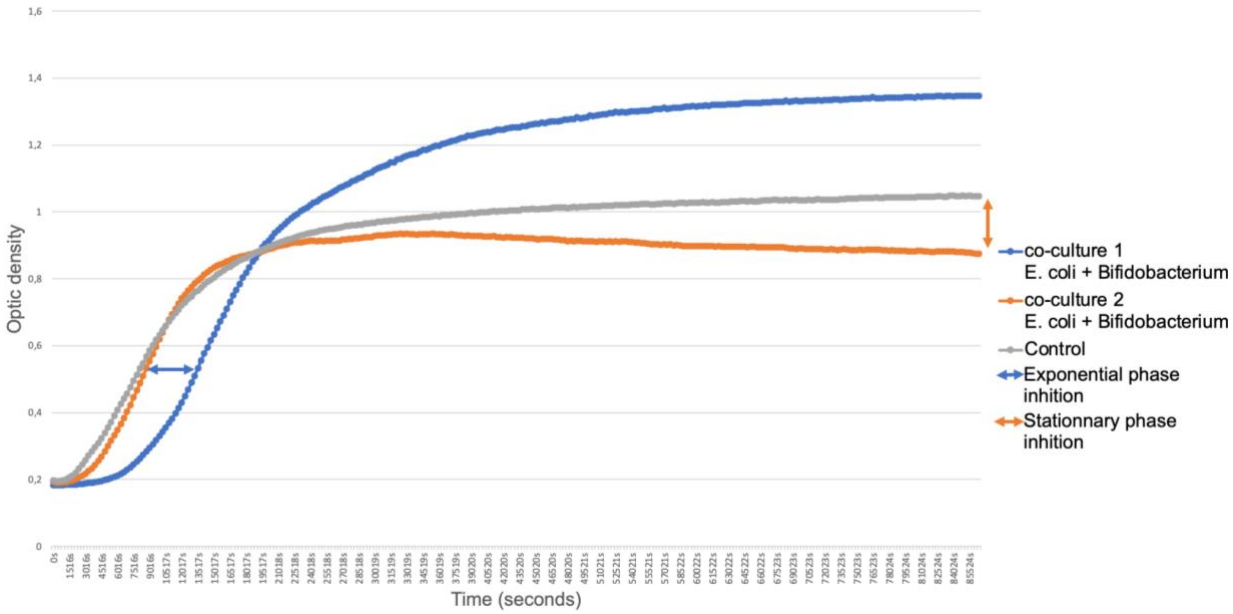


Figure 14 : Exemple de courbe de croissance d'une souche de *E. coli* seule (en gris) et de *E. coli* en co-culture avec des souches de *Bifidobacterium* ou leurs surnageants, montrant un retard de croissance durant la phase exponentielle (en bleu) ou une diminution de la concentration bactérienne en phase stationnaire (en orange).

Le dénombrement bactérien

Le dénombrement bactérien n'est pas une méthode de compétition, mais une technique de quantification essentielle utilisée pour mesurer les résultats des essais de co-culture en milieu liquide (292,305). Le dénombrement sur plaque permet de quantifier les bactéries viables et repose sur des dilutions en série de l'échantillon de co-culture. Les dilutions sont ensemencées sur des milieux gélosés. Des milieux sélectifs sont utilisés pour compter spécifiquement une espèce bactérienne dans une culture mixte. Après incubation en conditions adaptées aux bactéries candidates et cibles, les colonies sur les boîtes sont comptées. Le résultat est exprimé en UFC/ml ou log UFC/ml.

Différents milieux gélosés ont été préparés. Les *E. coli* multirésistants ont été cultivés sur gélose Drigalski (39 g/l) (Bio-Rad, Hercules, États-Unis) supplémentée en céfotaxime en poudre (Thermo Scientific™, Waltham, États-Unis) à une concentration finale de 4 mg/l, l'antibiotique étant ajouté au milieu refroidi à environ 40 °C après stérilisation. Les *Bifidobacterium* ont été cultivés sur gélose MRS (62 g/L).

Les *Bifidobacterium* et *E. coli* multirésistants ont été préalablement cultivés séparément en bouillon MRS et LB respectivement pendant 24 h à 37 °C en atmosphère anaérobie à l'aide de sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L et aérobie respectivement. Les compétitions bactériennes ont ensuite été réalisées en milieu liquide, dans un volume final de 50 ml réparti en cinq tubes Falcon de 10 ml correspondant aux temps de prélèvement (t0, t1, t4, t6 et t24). 25 ml de culture de *Bifidobacterium* ajustée à 10^8 UFC/ml ont été mélangés à 25 ml de culture de *E. coli* à 10^8 UFC/ml. Les cultures ont été incubées à 37 °C sous agitation (200 rpm) dans le MULTITRON en condition anaérobie générée par l'ajout de gouttes d'huile de paraffine en surface.

Les comptages bactériens ont été réalisés à partir de dilutions décimales successives préparées dans une plaque à puits profonds *deepwell* 96 puits (dilution en cascade de 10^0 à 10^{-8}). Cent microlitres des dilutions 10^{-4}, 10^{-6} et 10^{-8} ont été étalés de manière homogène à l'aide d'un râteau sur géloses sélectives : Drigalski supplémentées en céfotaxime (4 mg/L) pour la sélection des *E. coli* multirésistants, et MRS pour la sélection des *Bifidobacterium*. Les géloses Drigalski ont été incubées en conditions aérobies, tandis que les géloses MRS ont été incubées en anaérobiose à l'aide de sachets Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5 L pendant 24 h.

Cette manipulation a permis de confirmer l'effet inhibiteur visible lors des tests en microplaque (Figure 15).

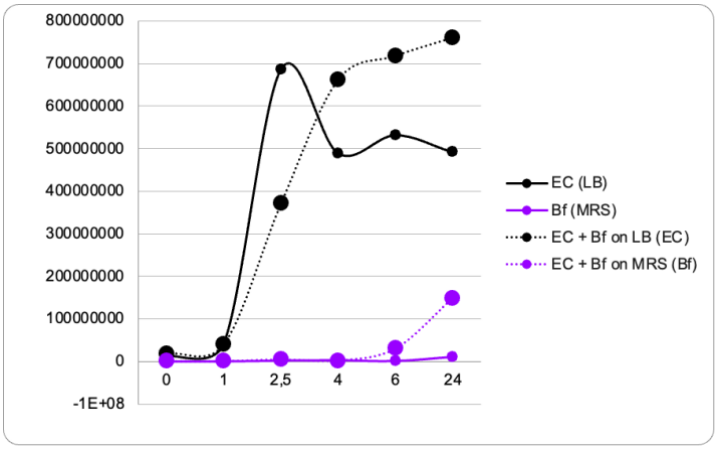


Figure 15 : Exemple de courbe de croissance (UFC/ml) en fonction du temps (heure) obtenue après dénombrement bactérien : on observe ici en phase exponentielle un retard de croissance des *E. coli* en présence de *Bifidobacterium* (ligne en pointillé) par rapport à *E. coli* seul (ligne pleine).

B. Protocole

La méthode retenue pour l'étude des compétitions bactériennes a été la co-culture en microplaque, car elle permet de détecter deux types d'inhibition quantifiable de manière fiable et reproductible. Cette approche présente l'avantage de tester simultanément plusieurs souches et plusieurs conditions expérimentales à la fois, et d'être robuste grâce à la réalisation systématique de trois réplicas. Par ailleurs, les trois lecteurs Infinite® 200 PRO disponibles au laboratoire ont été comparés pour vérifier la reproductibilité des mesures et une concordance satisfaisante des résultats a été obtenue.

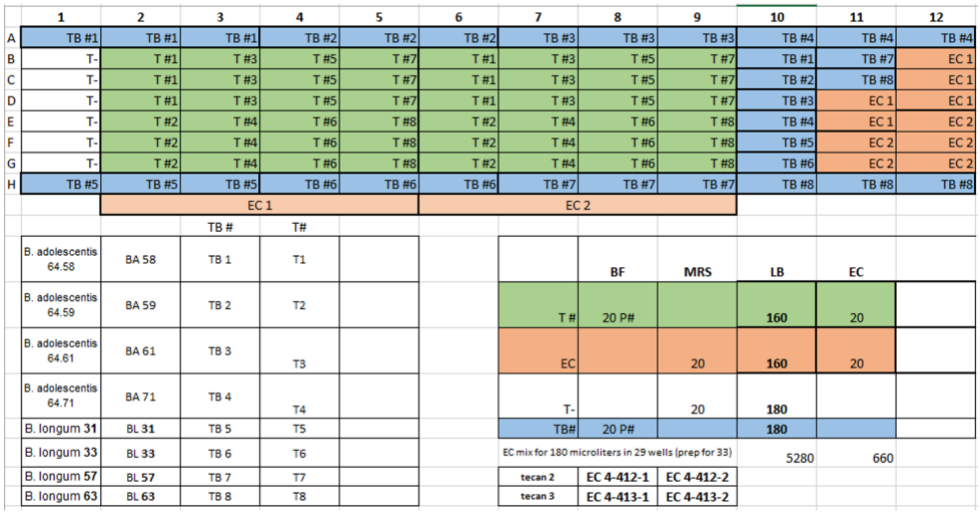
Quatre souches de *B. adolescentis* ont été sélectionnées à partir de la Collection de l'Institut Pasteur, et quatre souches de *B. longum* ont été isolées de patients hospitalisés à l'hôpital Bichat (AP-HP, Paris, France).

Au total, vingt-six souches de *E. coli* multirésistantes ont été sélectionnées chez seize voyageurs participant à l'étude VOYAG-R 5, incluant 20 souches de *E. coli* isolée au retour « S2 » et 6 souches de *E. coli* persistantes à un mois « M1 » et appartenant à des phylogroupes différents (Table 1).

Tableau 1 : Liste des souches de *E. coli* testées expérimentalement avec leur phylogroupe et leur présence ou non à un mois après le retour de voyage.

Souche *E. coli*	Phylogroupe	Présence à M1
6-004-1_S2	A	Absent
6-004-1_M1	B2	Présent
4-416-2_S2	A	Absent
4-416-1_M1	D	Présent
4-420-1_S2	D	Absent
4-420-1_M1	A	Présent
4-422-1_S2	D	Absent
4-422-1_M1	D	Présent
4-456-1_S2	B1	Absent
4-456-1_M1	B2	Présent
4-457-1_S2	F	Absent
4-457-1_M1	B2	Présent
1-179-1_S2	B1	Absent
4-412-1_S2	A	Absent
4-412-2_S2	A	Absent
4-413-1_S2	A	Absent
4-413-2_S2	A	Absent
4-417-1_S2	A	Absent
4-417-2_S2	B2	Absent
4-421-2_S2	A	Absent
4-421-1_S2	A	Absent
4-433-1_S2	E	Absent
4-507-1_S2	A	Absent
5-66-1_S2	A	Absent
2-009-1_S2	F	Absent
6-009-1_S2	A	Absent

Dans un premier temps, les co-cultures bactériennes en milieu liquide ont été réalisées en microplaques à 96 puits (Figure 16). Chaque condition expérimentale associait une souche cible (*E. coli*) et une souche candidate (*Bifidobacterium*). Une microplaque permettait de tester deux souches de *E. coli* simultanément en présence des huit souches de *Bifidobacterium*. Les préparations ont été réalisées comme suit : 20 µl de suspension de *E. coli* étaient mélangés à 20 µl de suspension de *Bifidobacterium* et complétés par 160 µl de LB. Trois témoins ont été inclus : (i) *Bifidobacterium* seul (180 µl de MRS + 20 µl de suspension de *Bifidobacterium*), (ii) *E. coli* seul (20 µl de suspension de *E. coli* + 20 µl de MRS + 160 µl de LB), et (iii) contrôle négatif (20 µl de MRS + 180 µl de LB). L'ensemble des conditions a été réalisé en trois réplicas. Une goutte de paraffine liquide a été déposée dans chaque puits avant de sceller la microplaque avec un film adhésif afin de maintenir des conditions anaérobies. Les microplaques ont ensuite été incubées dans le lecteur Infinite® 200 PRO, permettant le suivi cinétique de la croissance bactérienne par mesure de la DO600 nm toutes les 3 min pendant 24 heures.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB #1	TB #1	TB #1	TB #2	TB #2	TB #2	TB #3	TB #3	TB #3	TB #4	TB #4	TB #4
B	T-	T #1	T #3	T #5	T #7	T #1	T #3	T #5	T #7	TB #1	TB #7	EC 1
C	T-	T #1	T #3	T #5	T #7	T #1	T #3	T #5	T #7	TB #2	TB #8	EC 1
D	T-	T #1	T #3	T #5	T #7	T #1	T #3	T #5	T #7	TB #3	EC 1	EC 1
E	T-	T #2	T #4	T #6	T #8	T #2	T #4	T #6	T #8	TB #4	EC 1	EC 2
F	T-	T #2	T #4	T #6	T #8	T #2	T #4	T #6	T #8	TB #5	EC 2	EC 2
G	T-	T #2	T #4	T #6	T #8	T #2	T #4	T #6	T #8	TB #6	EC 2	EC 2
H	TB #5	TB #5	TB #5	TB #6	TB #6	TB #6	TB #7	TB #7	TB #7	TB #8	TB #8	TB #8
		EC 1					EC 2					

		TB #	T#	
B. adolescentis 64.58	BA 58	TB 1	T1	
B. adolescentis 64.59	BA 59	TB 2	T2	
B. adolescentis 64.61	BA 61	TB 3	T3	
B. adolescentis 64.71	BA 71	TB 4	T4	
B. longum 31	BL 31	TB 5	T5	
B. longum 33	BL 33	TB 6	T6	
B. longum 57	BL 57	TB 7	T7	
B. longum 63	BL 63	TB 8	T8	

	BF	MRS	LB	EC	
T #	20 P#		160	20	
EC		20	160	20	
T-		20	180		
TB#	20 P#		180		

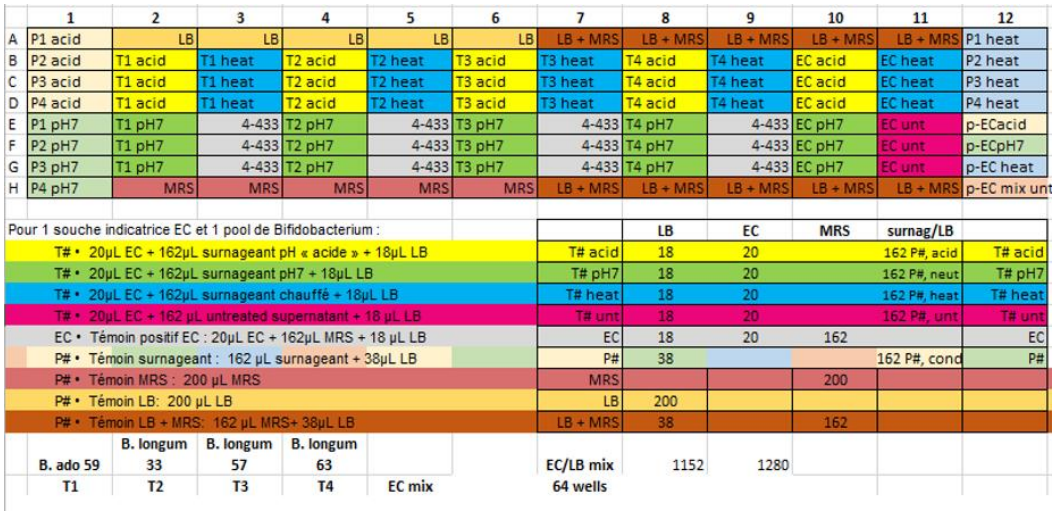
EC mix for 180 microliters in 29 wells (prep for 33) 5280 660

tecan 2	EC 4-412-1	EC 4-412-2
tecan 3	EC 4-413-1	EC 4-413-2

Figure 16 : Exemple de plan de microplaque pour les tests de co-cultures bactériennes couplant une souche de *E. coli* et une souche de *Bifidobacterium*.

Dans un second temps, l'effet des surnageants acellulaires de *Bifidobacterium* sur la croissance des souches multirésistantes de *E. coli* a été évalué (Figure 17). Les surnageants ont été préparés selon le protocole indiqué lors de l'étape préliminaire dans un volume final de 50 ml et conservés à – 80°C. Le même surnageant pour l'ensemble des manipulations a été utilisé. Les préparations ont été obtenues par l'addition de 20 µl de suspension de *E. coli* à 162 µl de surnageant et 18 µl de LB. Cinq témoins ont été inclus : (i) *E. coli* seul (20 µl de suspension de *E. coli* + 162 µl de MRS + 18 µl de LB), (ii) contrôle surnageant (162 µl de surnageant + 38 µl de LB), (iii) contrôle MRS (200 µl de MRS), (iv) contrôle LB (200 µl de LB), et (v) contrôle mixte (162 µl de MRS + 38 µl de LB). Comme pour les co-cultures, toutes les conditions ont été testées avec trois réplicas.

A noter qu'aucune croissance n'a été observée en présence de surnageant acidifié.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1 acid	LB	LB	LB	LB	LB	LB + MRS	LB + MRS	LB + MRS	LB + MRS	LB + MRS	P1 heat
B	P2 acid	T1 acid	T1 heat	T2 acid	T2 heat	T3 acid	T3 heat	T4 acid	T4 heat	EC acid	EC heat	P2 heat
C	P3 acid	T1 acid	T1 heat	T2 acid	T2 heat	T3 acid	T3 heat	T4 acid	T4 heat	EC acid	EC heat	P3 heat
D	P4 acid	T1 acid	T1 heat	T2 acid	T2 heat	T3 acid	T3 heat	T4 acid	T4 heat	EC acid	EC heat	P4 heat
E	P1 pH7	T1 pH7	4-433	T2 pH7	4-433	T3 pH7	4-433	T4 pH7	4-433	EC pH7	EC unt	p-ECacid
F	P2 pH7	T1 pH7	4-433	T2 pH7	4-433	T3 pH7	4-433	T4 pH7	4-433	EC pH7	EC unt	p-ECpH7
G	P3 pH7	T1 pH7	4-433	T2 pH7	4-433	T3 pH7	4-433	T4 pH7	4-433	EC pH7	EC unt	p-EC heat
H	P4 pH7	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	LB + MRS	LB + MRS	LB + MRS	LB + MRS	LB + MRS	p-EC mix unt

Pour 1 souche indicatrice EC et 1 pool de Bifidobacterium :		LB	EC	MRS	surnag/LB	
T# • 20µL EC + 162µL surnageant pH « acide » + 18µL LB	T# acid	18	20		162 P#, acid	T# acid
T# • 20µL EC + 162µL surnageant pH7 + 18µL LB	T# pH7	18	20		162 P#, neut	T# pH7
T# • 20µL EC + 162µL surnageant chauffé + 18µL LB	T# heat	18	20		162 P#, heat	T# heat
T# • 20µL EC + 162 µL untreated supernatant + 18 µL LB	T# unt	18	20		162 P#, unt	T# unt
EC • Témoin positif EC : 20µL EC + 162µL MRS + 18 µL LB	EC	18	20	162		EC
P# • Témoin surnageant : 162 µL surnageant + 38µL LB	P#	38			162 P#, cond	P#
P# • Témoin MRS : 200 µL MRS	MRS			200		
P# • Témoin LB: 200 µL LB	LB	200				
P# • Témoin LB + MRS: 162 µL MRS+ 38µL LB	LB + MRS	38		162		

	B. longum	B. longum	B. longum				
B. ado 59	33	57	63		EC/LB mix	1152	1280
T1	T2	T3	T4	EC mix	64 wells		

Figure 17 : Exemple de plan de microplaque pour les tests de co-cultures couplant une souche de *E. coli* et les trois conditions de surnageants acellulaire de *Bifidobacterium*.

III. Résultats

1. Population de l'étude

Les données de 75 individus sains de la cohorte VOYAG-R ayant acquis au moins une EMR au cours d'un voyage en zone tropicale et l'ayant éliminée dans le mois suivant, désignés comme les « éliminateurs », ont été comparées à celles de 75 porteurs persistants restés colonisés un mois après leur retour, constituant le groupe « persistants ». Les caractéristiques des participants sont décrites dans le tableau 2.
La majorité des participants étaient des femmes (67,3 %), avec un âge moyen de 33 ans [min. 18 ; max. 72], et avaient principalement voyagé en Asie du Sud-Est (60,7 %). Près de la moitié des voyageurs avaient rapporté un épisode diarrhéique (51,3 %). L'utilisation d'antibiotiques et le recours à un établissement de santé concernaient respectivement 26 % et 5,3 % des participants. Une grande partie des voyageurs avait effectué leur séjour sous forme de voyage en sac à dos (46 %).

Au total, 150 échantillons de selles recueillis un mois après le retour ont été analysés.

Tableau 2: Caractéristiques des voyageurs inclus dans cette étude.

	Eliminateurs (No.)	Persistants (No)	*p*-Value
Total	75	75	
Sexe			
M	24	25	0,89
Âge			
18-34	50	50	1,00
34-49	18	11	0,26
49-64	4	10	0,12
≥ 65	3	4	0,73
Diarrhées			
Oui	42	35	0,48
Prise d'antibiotiques			
Oui	22	17	0,52
Séjour à l'hôpital lors du voyage			
Oui	2	6	0,18
Prophylaxie anti-malarique			
Non (Ni antibiotique ni antipaludéen)	21	28	0,31
Autre antipaludéen et pas d'antibiotique	32	29	0,79
Antibiotique (non doxycycline) et autre antipaludéen	3	8	0,14
Doxycycline et autre antibiotique	9	5	0,42
Antibiotique (non doxycyline) et pas antipaludéen	10	3	0,09
Destination de voyage			
Asie	31	60	0,00
Amérique du Sud	18	9	0,12
Afrique Sub-Saharienne	26	6	0,00
Modalités de voyage			
Mixte	7	11	0,36
Ouvert type circuit organisé-hôtel	18	16	0,86
Ouvert type sac-à-dos	32	37	0,54
Famille et amis	18	9	0,12
Fermé type hôtel club	0	2	0,25
Profession			
Cadres, professions intellectuelles	31	30	1,00
Sans activité	20	23	0,65
Employés	9	7	0,80
Professions intermédiaires	10	11	0,83
Artisans, commerçants, chefs d'entreprise	0	1	0,50
Ouvriers	5	2	0,45
Données manquantes	1	1	1,00

2. Analyse du microbiote intestinal des voyageurs

A. Analyse bioinformatique : qualité du séquençage

La qualité de l'assemblage a été évaluée à l'aide des indices N50 et L50, et la taille du contig le plus long. Le N50 correspond à la taille du contig pour laquelle 50 % de la taille totale de l'assemblage est contenue dans des contigs de longueur supérieure ou égale à cette valeur. Une valeur élevée de N50 traduit donc une meilleure qualité de l'assemblage avec une moindre fragmentation. Le L50 correspond au nombre minimal de contigs dont la somme des longueurs couvre au moins 50 % de la taille totale de l'assemblage. Plus il est petit, plus l'assemblage est continu.

L'utilisation d'un assemblage hybride combinant des *reads* courts (Illumina) et longs (Nanopore) a permis d'obtenir des contigs de plus grande longueur, améliorant ainsi la continuité et la représentativité des assemblages (Tableau 3, Figure 18).

Tableau 3 : Tableau illustrant les indices (nombre de contigs total, taille du contig le plus long en pb, N50 en pb et L50 en pb) de qualité d'assemblage *reads* courts Illumina "Illumina" et *reads* courts Illumina associés aux *reads* longs Nanopore "Hybride" à l'aide du logiciel QUAST. La moyenne, la médiane, l'écart-type (EC) moyen, l'écart-type (EC), la valeur minimale et la valeur maximale ont été reportées.

	Nombre total de contigs		**Contig le plus long (pb)**		**N50 (pb)**		**L50 (pb)**	
	Illumina	Hybride	Illumina	Hybride	Illumina	Hybride	Illumina	Hybride
Moyenne	277477	671332	3985	6527	4479	7345	169375	458784
Médiane	251126	637481	3240	5493	4300	6679	167042	431995
EC moyen	88598	157554	1608	2606	1618	3261	29511	121495
EC	122758	206706	2235	3282	2000	4229	36954	151947
Min	58936	316861	1137	2162	1058	1542	89280	200316
Max	801575	1348046	16350	18293	12211	20113	270454	832230

L'approche hybride a permis la reconstruction de MAGs au sein de chaque échantillon. Le marqueur FastANI (*Fast Average Nucleotide Identity*) a été utilisé pour estimer l'identité moyenne en nucléotides (ANI) entre génomes procaryotes complets ou partiels (308). L'ANI constitue une mesure de similarité génomique, avec un seuil classique de 95–96 % retenu pour distinguer deux espèces bactériennes différentes. Au total, sur les 150 échantillons de selles analysés, 8 565 espèces ont été identifiées, dont 943 espèces distinctes, définies sur la base d'une valeur de FastANI > 95 %. Aucun génome n'a été exclu sur la base de critères de complétude ou de contamination.

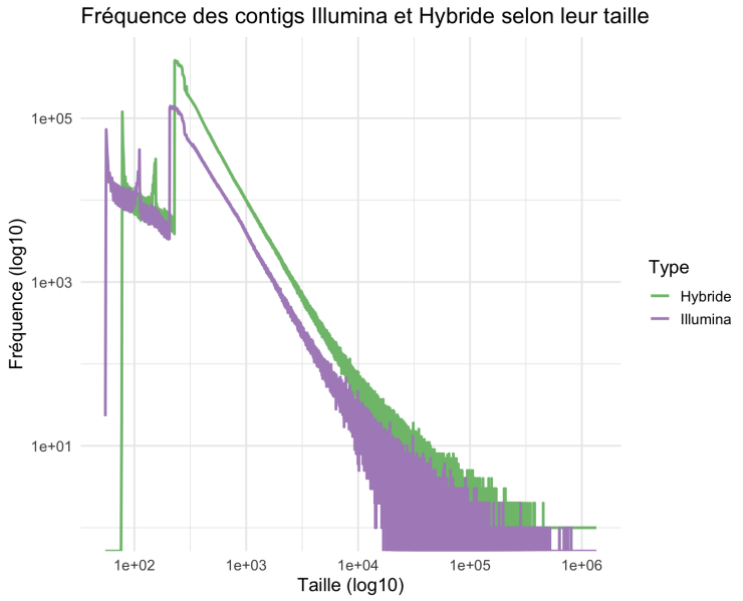


Figure 18 : Fréquence des contigs assemblés (log10) en fonction de leur taille (pb) (log10).

B. Diversité microbienne des échantillons de selles

Diversité alpha

Aucune différence significative de diversité alpha du microbiote n'a été observée entre les groupes éliminateurs et persistants, avec un nombre moyen d'espèces de 55 et 60 respectivement (test de Wilcoxon, p = 0,25 ; Figure 19). De même, les indices de diversité de Shannon et de Simpson inversé ne différaient pas entre les deux groupes : un indice de Shannon moyen de 3,5 et 3,6 respectivement (test de Wilcoxon, p = 0,21 ; Figure 19) et un indice de Simpson inverse de 1,1 et 1,0 respectivement (test de Wilcoxon, p = 0,28 ; Figure 18).

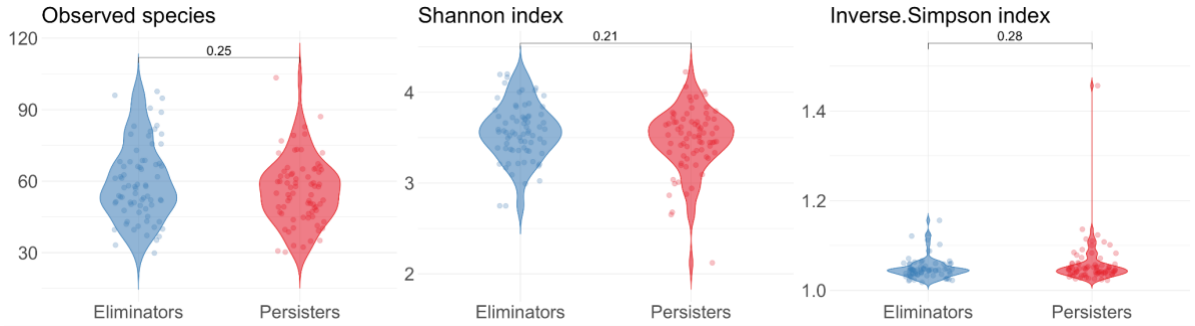


Figure 19 : Diagramme en violon (*violin-plots*) illustrant les indicateurs de diversité alpha (nombre d'espèces, indice de Shannon, indice de Simpson inverse) pour les deux groupes de voyageurs. Les couleurs indiquent les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « *eliminators* » (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « *persisters* » (rouge).

Diversité bêta

En ce qui concerne la diversité bêta, calculée à partir de la dissimilarité de Bray-Curtis, les groupes « éliminateurs » et « persistants » se distinguaient significativement le long de l'axe 1 de l'analyse en coordonnées principales (test de Mann-Whitney, $p < 0{,}001$), mais pas sur l'axe 2 (test de Mann-Whitney, $p = 0{,}14$) (Figure 20).

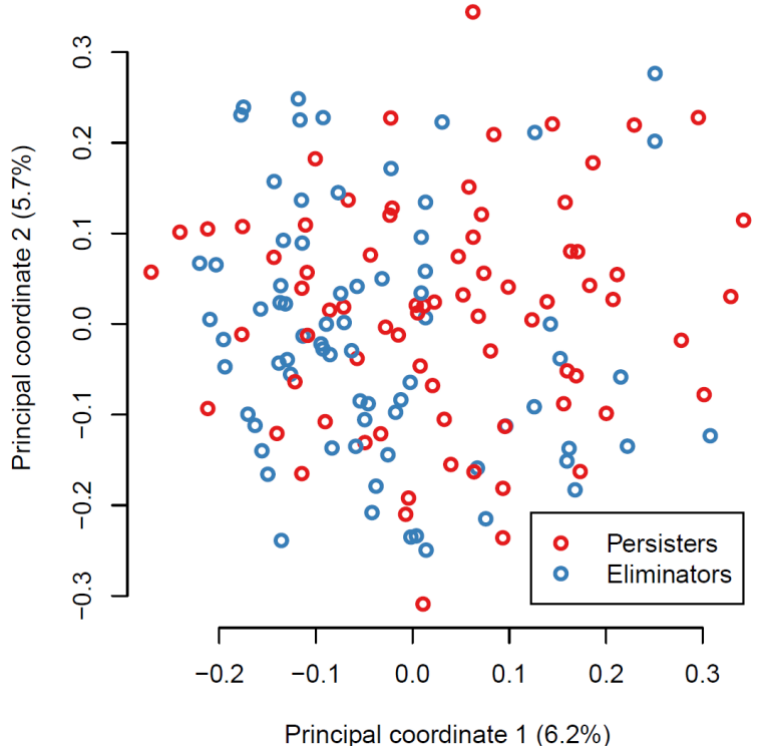


Figure 20 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) utilisant la distance de Bray-Curtis sur les 943 espèces identifiées pour les deux groupes de voyageurs. Les couleurs indiquent les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « *eliminators* » (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « *persisters* » (rouge).

L'analyse LEfSe a permis d'identifier cinq genres associés à l'élimination des EMR : *Bifidobacterium*, *Brachyspira*, KLE1615 (bactérie de l'ordre des *Clostridiales*), *Thermophilibacter* et *Hafnia* ; tandis que quatre genres étaient associés à la persistance : *Flavonifractor*, *Ventrimonas*, *Parabacteroides* et *Bacteroides*. L'analyse discriminante linéaire (LDA) a permis d'identifier 20 espèces associées à l'élimination tandis que 12 espèces étaient associées à la persistance (Figure 21).

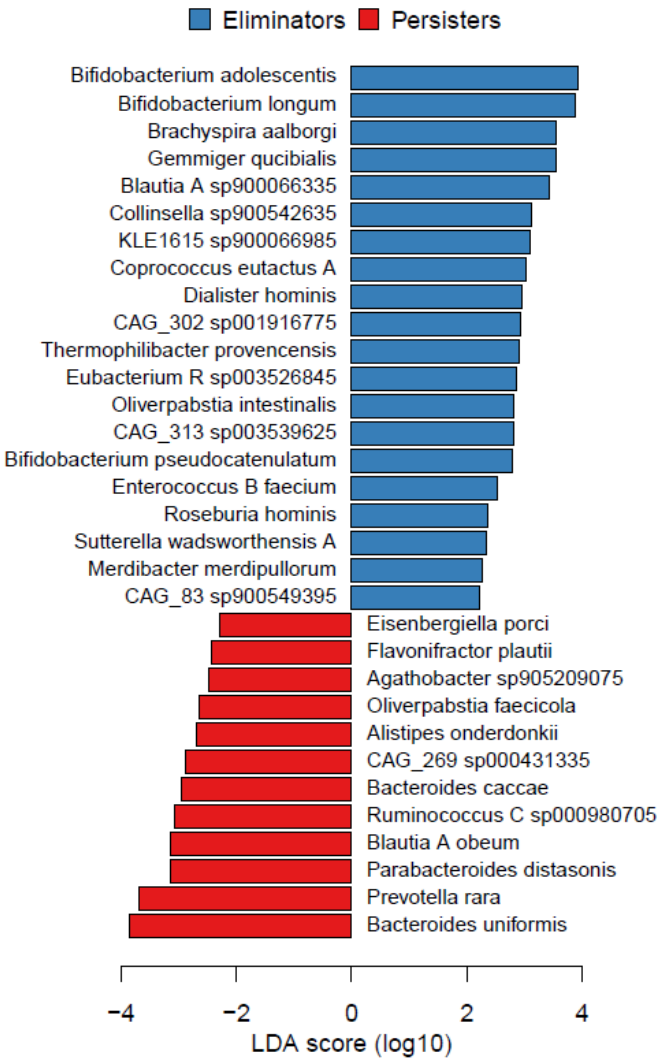


Figure 21 : Diagramme en barres affichant les scores issus de l'analyse discriminante linéaire (LDA) transformés en log10 pour les MAGs identifiés par l'analyse LEfSe illustrant les espèces associées significativement à l'élimination rapide et à la persistance des EMR un mois après le retour (valeur p < 0,05). Les couleurs indiquent les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « *eliminators* » (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « *persisters* » (rouge).

Parmi elles, *B. adolescentis* et *B. longum* étaient significativement liées à la élimination des EMR un mois après le retour (test de Wilcoxon, p = 0,04 et 0,008 respectivement), alors que *Prevotella rara* et *Bacteroides uniformis* étaient significativement liées à la persistance des EMR un mois après le retour (test de Wilcoxon, p = 0,008 et 0,008 respectivement). Une analyse en composantes principales (PCA) réalisée uniquement sur les 32 espèces associées significativement à la persistance ou à l'élimination par l'analyse LEfSe a montré une colinéarité entre *B. adolescentis* et *B. longum* tendant vers le groupe éliminateur, contrairement à *Parabacteroides diastonis* et *Bacteroides uniformis* qui semblent être associées au groupe persistant (Figure 22).

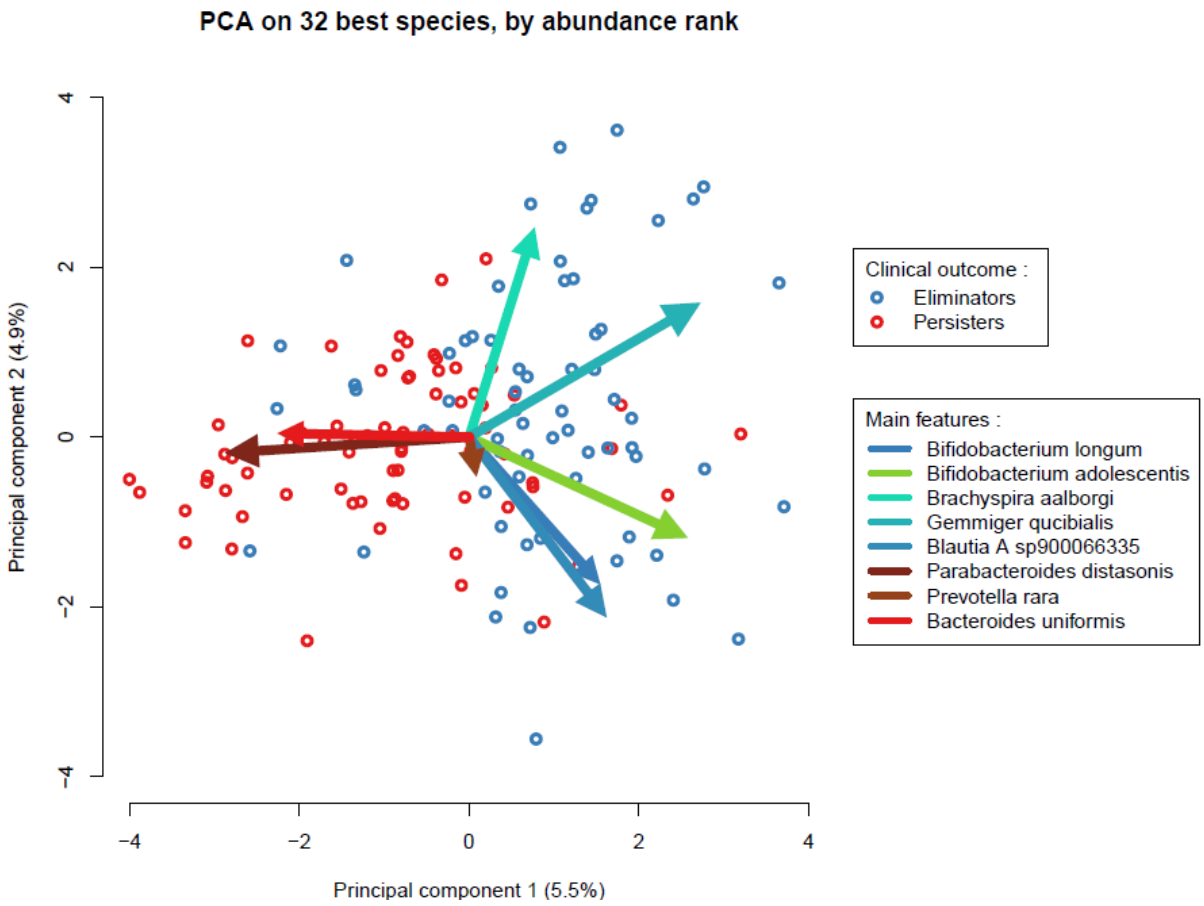


Figure 22 : Analyse en composantes principales (PCA) illustrant la distribution des échantillons de voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « *eliminators* » (cercles bleus) et de voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « *persisters* » (cercles rouges). Seules les 32 espèces identifiées comme significatives par l'analyse LEfSe sont utilisées. Les flèches de différentes couleurs représentent les bactéries clés (variables dominantes de l'analyse PCA).

De plus, l'analyse de l'abondance relative des espèces les plus fortement associées à l'élimination ou à la persistance des EMR réalisée par LefSe, a mis en évidence des profils différenciés selon les groupes (Figure 23). Ainsi, *B. adolescentis* et *B. longum* présentaient des abondances relatives plus élevées, tout en étant détectés chez un nombre comparable de voyageurs du groupe « éliminateurs ». De manière similaire, *P. rara* et *B. uniformis* présentaient des abondances relatives plus élevées, tout en étant détectés chez un nombre comparable de voyageurs du groupe « persistants ». Enfin, *P. distasonis* présentait également une abondance relative plus élevée dans le groupe des persistants tout en étant détectée plus fréquemment dans ce groupe.

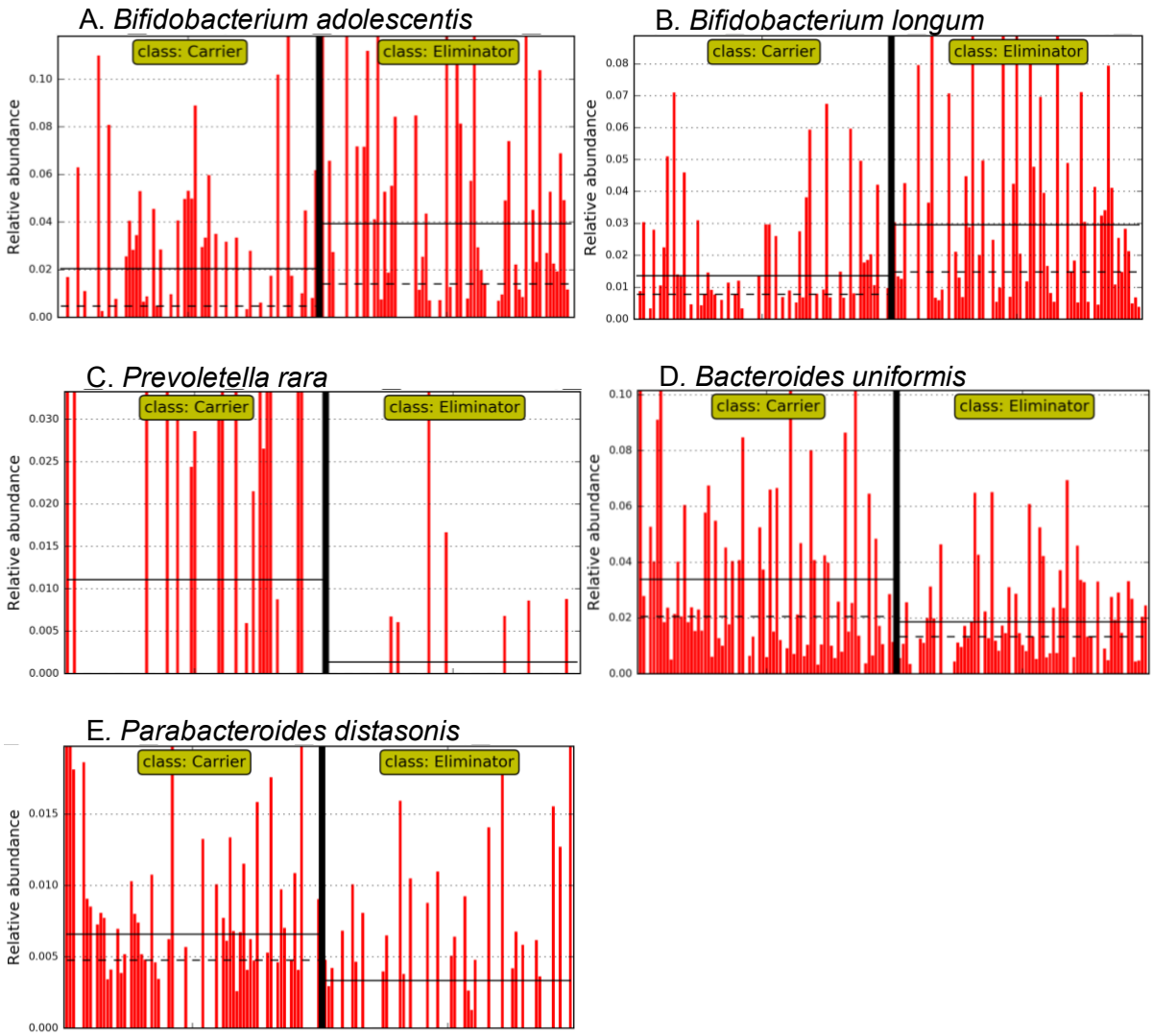


Figure 23 : Diagrammes différentiel obtenus par l'analyse LEfSe comparant l'abondance relative de *B. adolescentis* (A), *B. longum* (B), *P. rara* (C), *B. uniformis* (D) et *P. distasonis* (E) entre les deux groupes persistants ("*carrier*") et éliminateurs ("*eliminator*"). Chaque barre verticale représente l'abondance relative pour un individu. Les lignes horizontales noires pleines et en pointillés indiquent respectivement la moyenne et la médiane de l'abondance relative pour les deux groupes.

C. Analyse des MAGs de *Bifidobacterium*

Puisque les *Bifidobacterium* ont été associées à une élimination rapide des EMR, nous avons cherché à déterminer si certaines lignées spécifiques pouvaient être liées à cet effet. Nous avons donc analysé l'ensemble des MAGs de *Bifidobacterium* retrouvés dans le microbiote des 150 voyageurs afin d'évaluer leurs associations potentielles avec les *E. coli* multirésistants. A cette fin, nous avons sélectionné uniquement les MAGs dont la complétude était supérieure à 60 % et avec un seuil de contamination inférieur à 5 %, après filtrage de qualité avec CheckM2 (Figure 24).

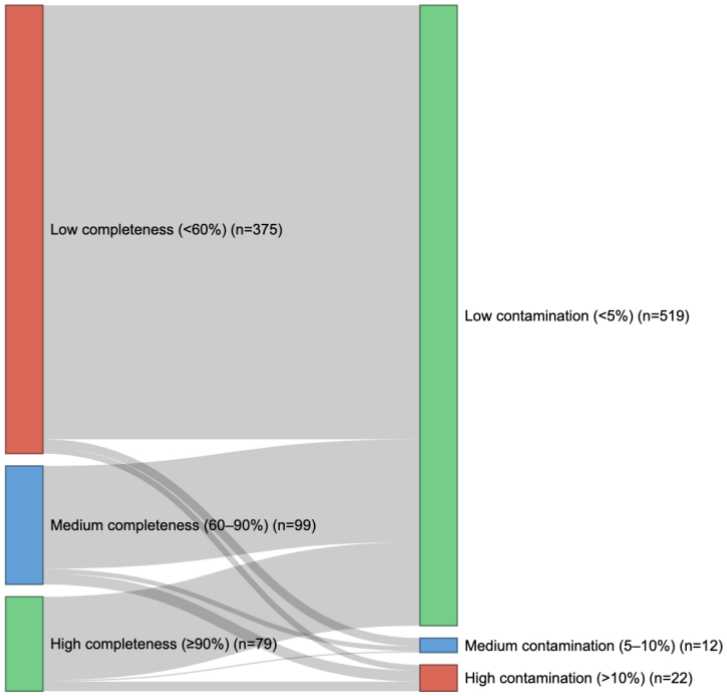


Figure 24 : Diagramme de Sankey illustrant la qualité des MAGs de *Bifidobacterium* (taux de complétude en % et taux de contamination en %) évalué à l'aide du logiciel CheckM2. Nous avons inclus uniquement les MAGs ayant une complétude de plus de 60 % et un taux de contamination < 5%.

Au total, 554 MAGs de *Bifidobacterium* ont été identifiés. Parmi eux, 178 souches présentaient une complétude de plus de 60 % et 157 MAGs avec également un taux de contamination inférieur à 5 %. La taille moyenne du génome était de 0,6 Mb [min. 0,002Mb ; max. 1,8Mb], la couverture moyenne du génome de *Bifidobacterium* était de 30,7 % [min. 0 % ; max. 85,6 %] (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau montrant les indices (nombre de contigs total, taille du contig le plus long en pb, taille totale alignée en pb, N50 en pb, L50 en pb et la couverture du génome en %) de qualité d'assemblage des MAGs de *Bifidobacterium* à l'aide du logiciel QUAST. La moyenne, la médiane, l'écart-type (EC) moyen, l'écart-type (EC), la valeur minimale et la valeur maximale ont été reportées.

	Nombre total de contigs	**Contig le plus long (pb)**	**Taille totale alignée (pb)**	**N50 (pb)**	**L50 (pb)**	**Couverture du génome (%)**
Moyenne	62	160586	667379	89167	14	30,7
Médiane	24	140228	440205	62836	5	22,2
EC moyen	62	79861	529067	61270	15	22,6
EC	90	102882	616019	85654	23	26,7
Min	2	7227	242	2201	1	0,0
Max	584	628727	1840238	628727	156	85,6

Nous avons cherché à établir un lien entre les MAGs de *Bifidobacterium* et les souches de *E. coli* au sein du microbiote des voyageurs (Figure 25). Aucune association n'a été mise en évidence entre l'abondance relative des MAGs de *Bifidobacterium sp., B. adolescentis ou B. longum* et les phylogroupes des souches de *E. coli* (test de Kruskal-Wallis, respectivement p = 0,24, p = 0,08 et p = 0,54)

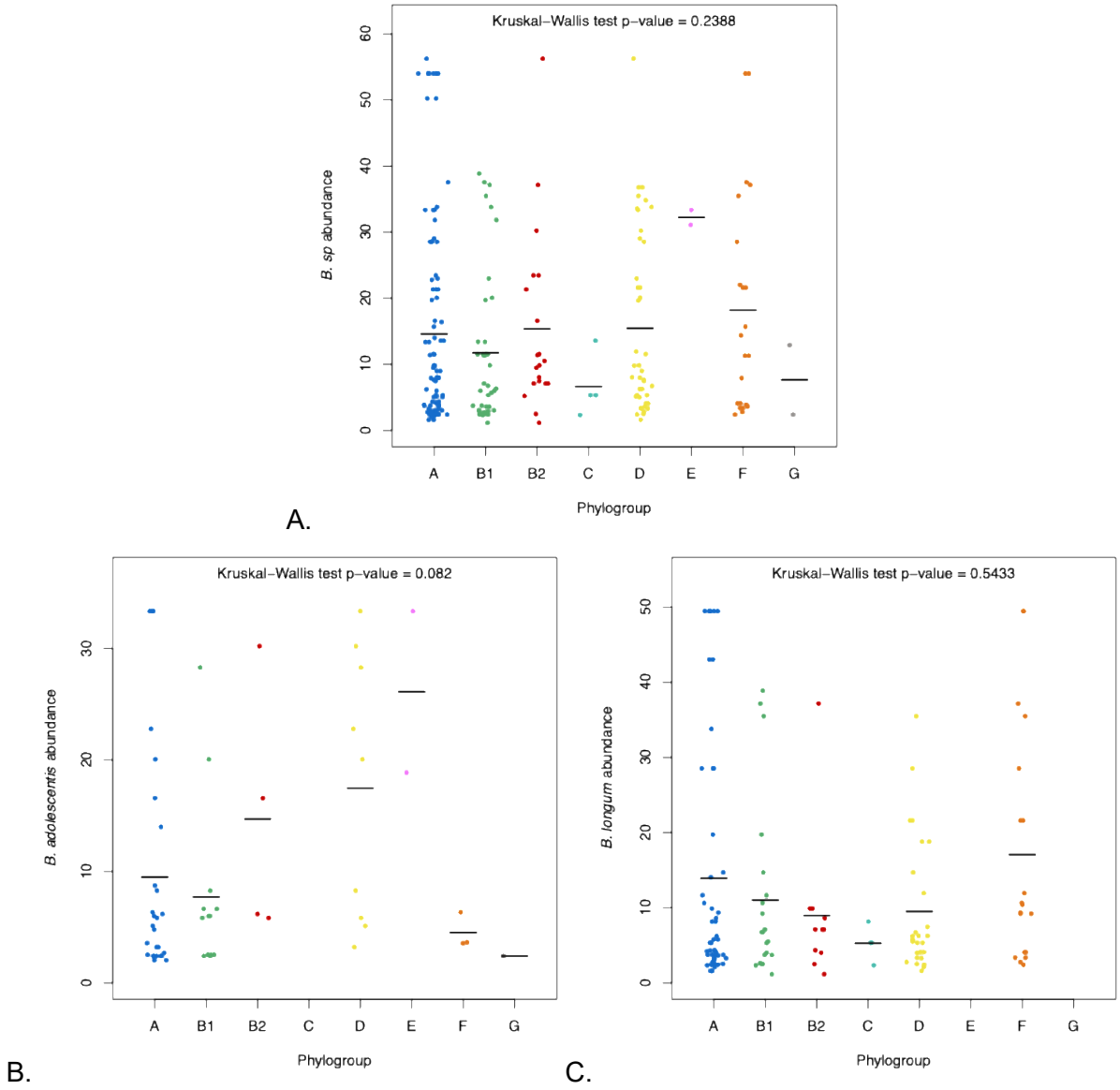


Figure 25 : Diagramme en nuage de points (*scatter plot*) illustrant la distribution l'abondance relative des MAGs de *Bifidobacterium* (A), *B. adolescentis* (B) et *B. longum* (C) de chaque voyageur en comparaison avec le phylogroupe des souches de *E. coli* isolées. La barre horizontale noire indique la moyenne des abondances relatives des MAGs au sein de chaque phylogroupe.

L'alignement du *core genome* a été réalisé sur 154 gènes présents dans 90 à 99 % des génomes, avec un seuil de *core genome* fixé à 90 % (au lieu de 95 % par défaut). Cette approche a permis de construire un arbre phylogénétique plus robuste, malgré (i) la grande diversité au sein des espèces de *Bifidobacterium* et (ii) l'incomplétude de certains MAG, qui ne contiennent pas l'ensemble des gènes d'un génome complet. Par ailleurs, le pangénome comprenait 2 431 gènes présents dans 15 à 90 % des génomes, désignés comme *shell genome*, et 25 205 gènes présents dans 0 à 15 % des génomes, désignés comme *cloud genome*, soit un total de 27 790 gènes uniques présents dans au moins un génome.

Parmi les 72 MAG de *B. adolescentis* et 105 MAG de *B. longum*, seuls 27 de *B. adolescentis* et 66 de *B. longum* ont été retenus pour l'analyse après filtrage qualité.
Les quatre souches expérimentales de *B. adolescentis* se situent sur une même branche, regroupant également un seul MAG de *B. adolescentis* provenant d'un voyageur éliminateur. Les souches expérimentales de *B. longum* sont réparties de manière homogène parmi les MAG de *B. longum*. Il est à noter que la souche *B. longum* 2 n'avait pas encore été séquencée au moment de l'analyse.

Aucune répartition spécifique n'a été observée entre les MAGs de *B. adolescentis* issus des voyageurs éliminateurs et ceux issus des voyageurs persistants. Cette absence de distribution particulière est également constatée pour les MAGs de *B. longum*, ainsi que pour les autres espèces de *Bifidobacterium* incluses dans l'étude.

A noter, seuls deux MAGs (avec un phénotype associé de persistance) ont une assignation taxonomique non résolue au niveau de l'espèce : 8_4_Bin_41 et 69_1_Bin_1. Ces deux génomes méta-assemblés se situent entre les espèces *B. adolescentis*, *B. catenulatum* et *B. pseudocatenulatum*.

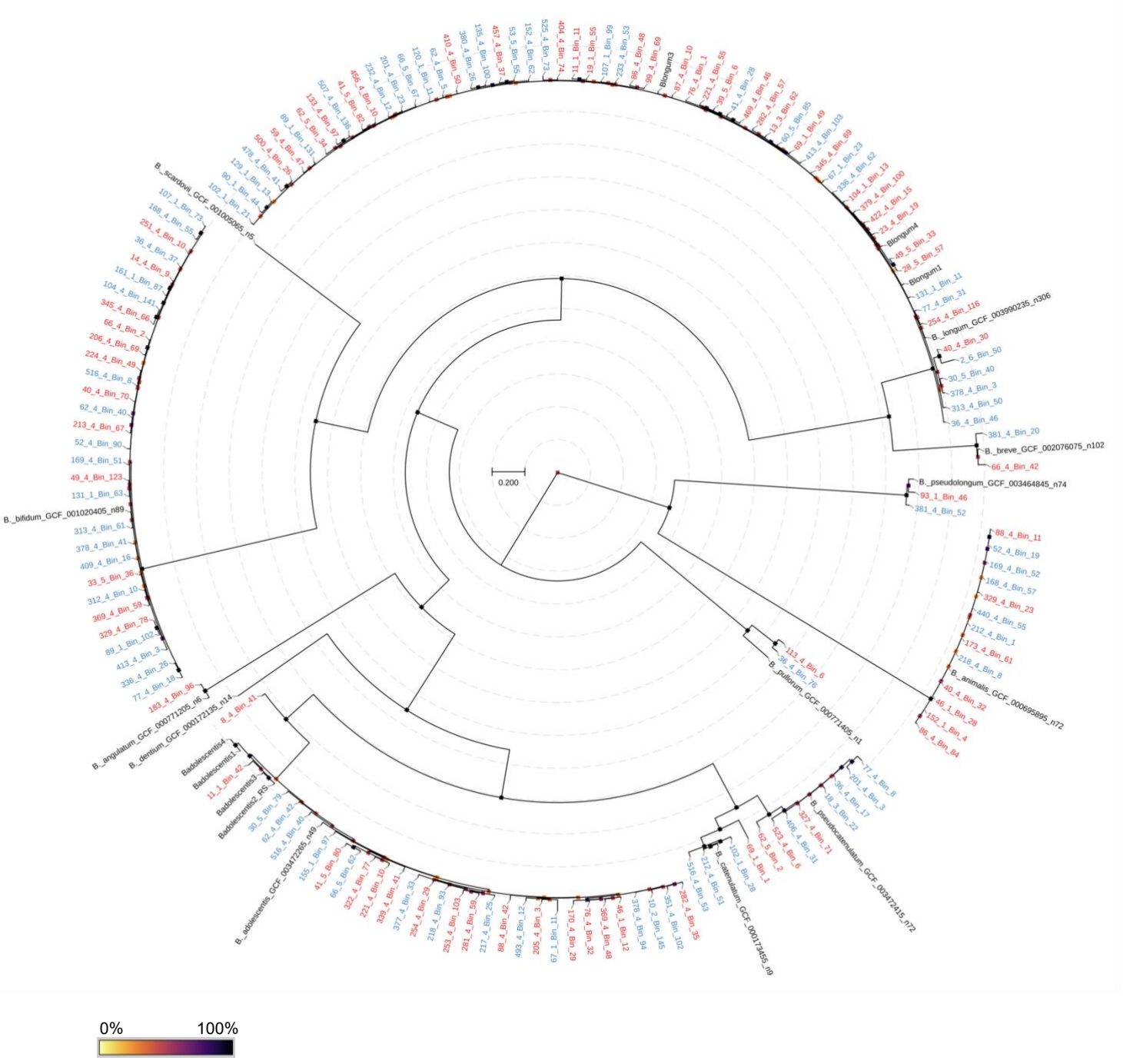


Figure 26 : Arbre phylogénétique des MAGs de *Bifidobacterium* issus des 150 voyageurs, des souches expérimentales de *B. adolescentis* et *B. longum* ainsi que les souches assemblées issues de RefSeq (2022). Les couleurs indiquent les souches expérimentales et la souche de référence RefSeq en noir, les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « éliminateurs » en bleu, et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « persistants » en rouge. Les scores de *bootstrapping* obtenus (en %) sont représentés dans l'arbre sous la forme de rectangles colorés sur les nœuds intérieurs, avec une échelle continue allant du jaune (0 %) au noir (100 %) en passant par l'orange, le rouge et le violet.

3. Fond génétique de *E. coli* associé à la persistance

A. Analyse bioinformatique : qualité du séquençage

L'ensemble des souches de *E. coli* acquises lors du voyage collectées au retour ainsi que celles persistantes à un mois et au-delà (2 mois, 3 mois, 6 mois et 12 mois) dans le groupe des persistants a été séquencé. Au total, 478 souches de *E. coli* ont été séquencées : 356 provenant de 74 voyageurs du groupe des persistants (159 au retour, 97 à M1, 56 à M2, 29 à M3, 12 à M6 et 3 à M12) et 122 issues de 67 voyageurs du groupe des éliminateurs (toutes isolées au retour) (Figure 27). Chez dix voyageurs, aucune souche n'a pu être séquencée : 8 souches étaient manquantes, 2 souches séquencées ont été identifiées comme *Klebsiella pneumoniae* et ont été exclues.

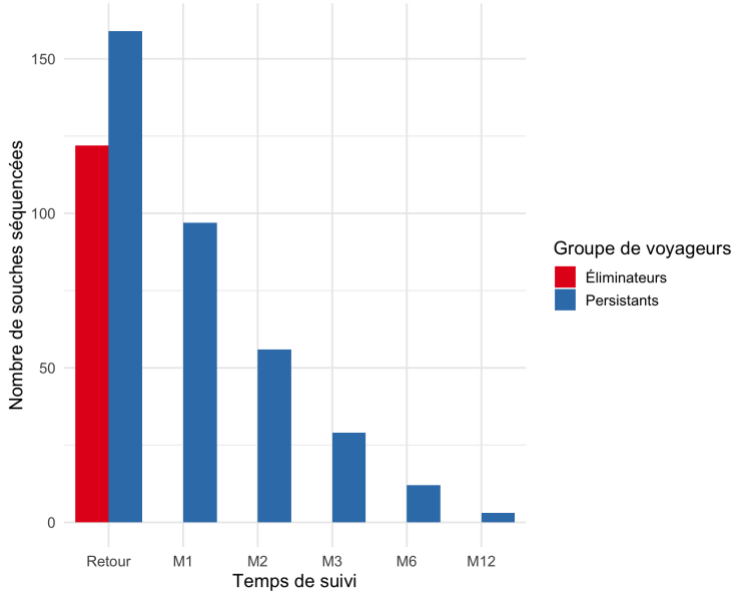


Figure 27 : Histogramme représentant le nombre de souches de *E. coli* séquencées en fonction du temps de suivi (Retour, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 6 mois et 12 mois) et du groupe de voyageurs. Les couleurs indiquent les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « éliminateurs » (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « persistants » (rouge).

La profondeur de séquençage des génomes de *E. coli* était en moyenne de 181X [min. 29X ; max. 650X]. Après assemblage, la taille moyenne du génome était de 5,03 Mb [min. 0,068Mb ; max. 6,4 Mb] (Tableau 5).

Tableau 5 : Tableau montrant les indices (nombre de contigs total, taille du contig le plus long en pb, taille totale alignée en pb, N50 en pb, L50 en pb) de qualité d'assemblage des souches de *E. coli* à l'aide du logiciel QUAST. La moyenne, la médiane, l'écart-type (EC) moyen, l'écart-type (EC) , la valeur minimale et la valeur maximale ont été reportées.

	Nombre total de contigs	Contig le plus long (pb)	Taille totale alignée (pb)	N50 (pb)	L50 (pb)
Moyenne	190	304961	5033825	105131	25
Médiane	138	303251	5029420	106302	15
EC moyen	100	82194	239830	30034	16
EC	343	104811	384483	37408	68
Min	54	3481	68134	590	8
Max	3746	575711	6369855	239150	948

Afin d'évaluer d'éventuelles différences entre les souches persistantes au-delà de 1 mois et celles qui ne persistaient pas, nous avons identifié les souches clonales au sein d'un même individu. Un clone unique a été défini comme une souche partageant le même ST (Warwick), le même sérotype O:H et le même allèle *fimH* chez un même individu. Cette approche a permis d'identifier 320 souches uniques. Parmi elles, 118 étaient présentes à M1 ou au-delà, tandis que 202 n'étaient détectées qu'au retour. Chez les 141 voyageurs, le nombre moyen de souches uniques (tous temps d'isolement confondus) était de 2,2 [min. 1 ; max. 9].

B. Phylogroupes

Parmi les 320 souches uniques, la distribution des phylogroupes était inégale entre les groupes éliminateurs et persistants (test du Chi², $p = 8 \times 10^{-6}$; Figure 28). En effet, les souches persistantes au-delà de 1 mois étaient le plus souvent des souches du phylogroupe B2 et D, alors que les souches éliminées rapidement appartenaient au phylogroupe A et B1.

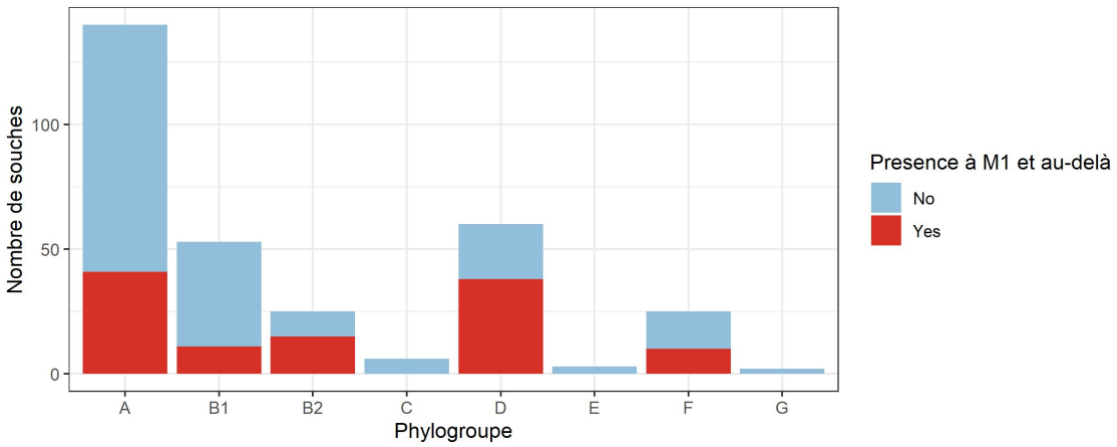


Figure 28 : Distribution des phylogroupes chez les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « éliminateurs » (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « persistants » (rouge) (Test Chi², p=8.10-6).

C. Gènes associés à la résistance

Le nombre moyen de gènes de résistance aux antibiotiques (*antibiotic resistance gene*, ARG) par souche était de 8,5 [min. 1 ; max. 17]. Ce nombre variait selon le phylogroupe, le phylogroupe F étant associé significativement au plus grand nombre d'ARGs (test de Kruskal-Wallis, p = 0,04 ; Figure 29). Toutes les souches présentaient au moins un ARG associé à la résistance aux C3G, avec la présence de *bla*$_{CTX-M}$ dans 290 souches. Les autres enzymes conférant une résistance aux C3G étaient les *bla*$_{SHV}$ (n = 23) et les céphalosporinases plasmidiques de type *bla*$_{CMY-2}$ (n = 6) et *bla*$_{TEM}$ (n = 1).

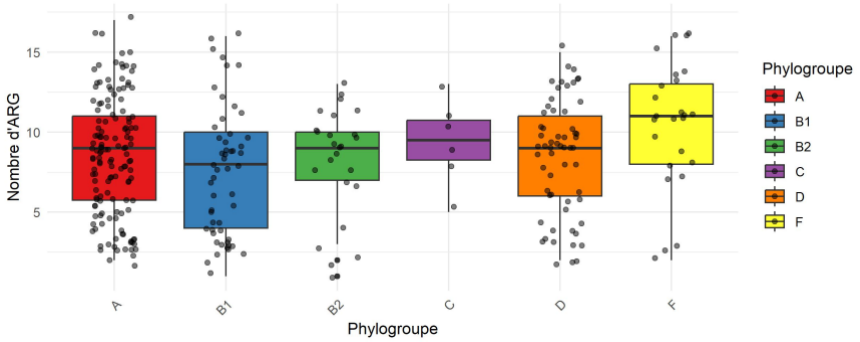


Figure 29 : Distribution des ARGs selon les phylogroupes des souches de *E. coli* (test de Kruskal-Wallis, p=0.04).

Aucune différence n'a été observée concernant le nombre d'ARGs par souche de *E. coli* entre les 2 groupes éliminateurs et persistants au retour (Test de Wilcoxon, p = 0,31). De plus, le nombre moyen d'ARGs au cours du temps chez les souches persistantes restait stable (test de Kruskal-Wallis, p = 0,78), suggérant que la persistance n'était pas liée au nombre d'ARGs par souche (Figure 30).

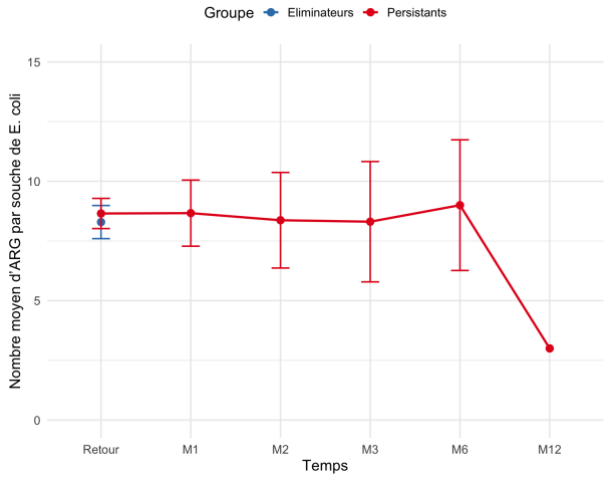


Figure 30 : Courbe d'évolution du nombre moyen d'ARGs porté par les souches de *E. coli* dans le temps (test de Kruskal-Wallis, p=0.78). Les couleurs indiquent les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour « éliminateurs » (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après « persistants » (rouge).

A partir des génomes de *E. coli*, nous avons cherché les co-portages de gènes de résistance plus ou moins fréquents qu'attendu si les gènes de résistance étaient distribués de manière aléatoire parmi les clones, en fonction de la famille d'antibiotiques concernée (Figure 31 et Tableau 6). Les associations de classes d'antibiotiques dont les résistances étaient significativement plus fréquemment co-portées que ne le prédirait le hasard concernaient les bêta-lactamines et les macrolides–lincosamides–streptogramines (MLS) (OR = 8,4 ; test de Bonferroni-Holm, p < 0,001), ainsi qu'un groupe associant les sulfamides, le triméthoprime, les aminosides et les tétracyclines. À l'inverse, certaines classes présentaient une co-occurrence de résistances significativement moins fréquente qu'attendu, notamment les fluoroquinolones avec les aminosides (OR = 0,5, p < 0,001), ainsi que les aminosides avec les MLS (OR = 0,6, p < 001).

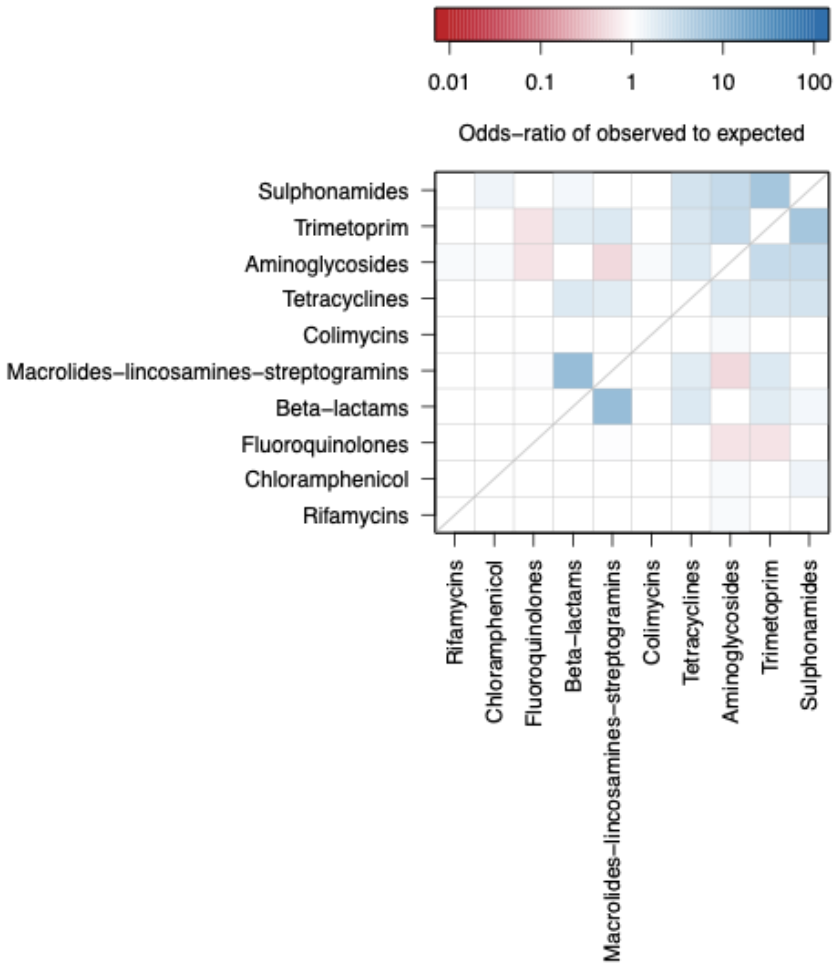


Figure 31 : Diagramme illustrant la probabilité de co-portage des gènes de résistance aux antibiotiques selon les familles d'antibiotiques. Seules les associations statistiquement significatives ont été représentées (p < 0,001) : les associations positives sont colorées en bleu et les associations négatives (exclusions) sont colorées en rouge.

Tableau 6 : Tableau décrivant la probabilité de co-portage des gènes de résistance aux antibiotiques selon les familles d'antibiotiques significative (p < 0,001) au sein des souches de *E. coli*. « Antibiotique 1 » et « Antibiotique 2 » sont les deux familles d'antibiotiques considérées, « OR » est *l'odds ratio* de l'indice de Jacquard de co-portage observé par rapport à l'indice de co-portage moyen attendu si les gènes étaient distribués aléatoirement, « *p* » est la *p*-value non corrigée et « *p* ajustée » est la *p*-value corrigée par Bonferroni-Holm.

Antibiotique 1	Antibiotique 2	OR	*p*	*p* ajustée
Bêta-lactamines	Macrolides-lincosamines-streptogramines	8,44	< 0,001	< 0,001
Trimétoprime	Sulfamides	6,27	< 0,001	< 0,001
Aminosides	Sulfamides	3,29	< 0,001	< 0,001
Aminosides	Trimétoprime	3,23	< 0,001	< 0,001
Sulfamides	Tétracyclines	2,51	< 0,001	< 0,001
Trimétoprime	Tétracyclines	2,22	< 0,001	< 0,001
Trimétoprime	Macrolides-lincosamines-streptogramines	2,22	< 0,001	< 0,001
Beta-lactames	Tétracyclines	2,06	< 0,001	< 0,001
Aminosides	Tétracyclines	2,04	< 0,001	< 0,001
Bêta-lactamines	Trimétoprime	1,93	< 0,001	< 0,001
Macrolides-lincosamines-streptogramines	Tétracyclines	1,91	< 0,001	< 0,001
Chloramphenicol	Sulfamides	1,51	< 0,001	< 0,001
Bêta-lactamines	Sulfamides	1,42	< 0,001	0,009
Aminosides	Chloramphénicol	1,30	< 0,001	0,001
Aminosides	Colimycine	1,28	< 0,001	< 0,001
Aminosides	Rifamycine	1,21	< 0,001	< 0,001
Macrolides-lincosamines-streptogramins	Fluoroquinolones	1,15	< 0,001	0,016
Trimétoprime	Fluoroquinolones	0,66	0,001	0,042
Aminosides	Fluoroquinolones	0,65	< 0,001	< 0,001
Aminosides	Macrolides-lincosamines-streptogramines	0,53	< 0,001	< 0,001

D. Gènes associés à la virulence

Le nombre moyen de gènes associés à la virulence (*virulence associated gene*, VAG) par souche était de 50,6 [min. 15 ; max. 99]. Aucune différence n'a été observée concernant le nombre de VAGs par souche de *E. coli* entre les deux groupes éliminateurs et persistants au retour avec un nombre légèrement plus important de VAGs au sein des souches persistantes par rapport aux souches éliminées un mois après le retour (48 versus 51 VAG en moyenne respectivement dans le groupe éliminateurs et persistants, Test de Wilcoxon, p = 0,28) (Figure 32). De plus, le nombre moyen de VAGs au cours du temps chez les souches persistantes semblait en augmentation, sans que celle-ci soit cependant significative (Test de Kruskal-Wallis, p = 0,08).

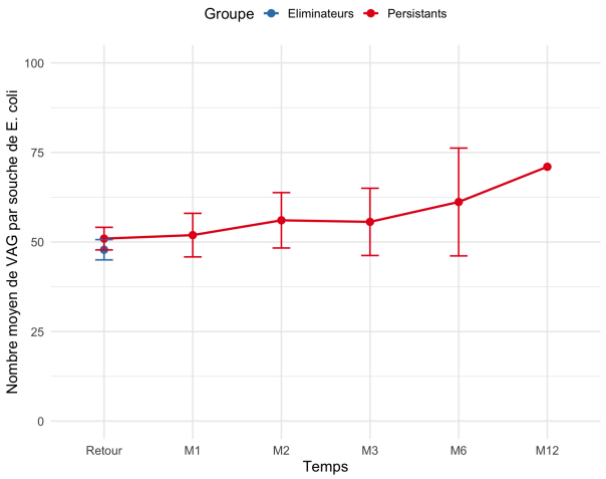


Figure 32 : Courbe d'évolution du nombre moyen de VAGs porté par les souches de *E. coli* dans le temps (test de Kruskal-Wallis, p=0.08). Les couleurs indiquent les voyageurs ayant acquis puis éliminé le portage de EMR dans le mois suivant le retour (bleu), et les voyageurs présentant encore un portage de EMR un mois après (rouge)

Nous avons étudié la distribution des VAGs dans les génomes de *E. coli* en fonction de leur phylogroupe. Comme attendu, les génomes de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2 et D étaient porteurs d'un plus grand nombre de VAGs (test de Kruskal-Wallis, p < 0.0001, Figure 33).

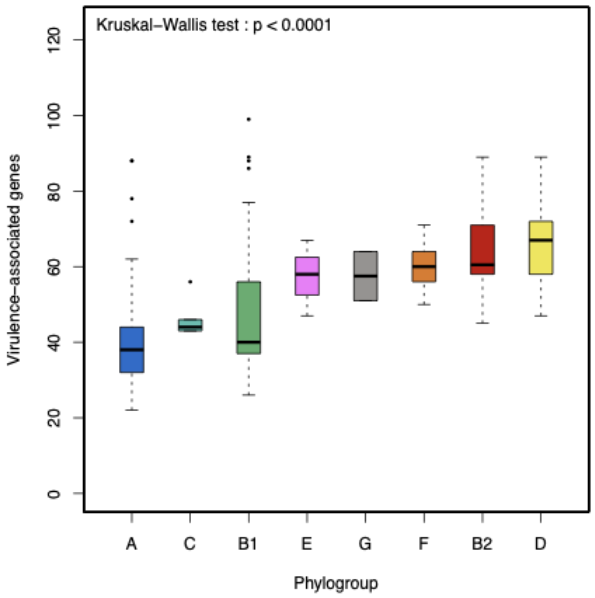


Figure 33 : Diagramme en boîtes à moustache (*box plot*) du nombre de VAGs en fonction des phylogroupes des souches de *E. coli* acquises par les voyageurs lors de leur séjour (Test de Kruskal-Wallis, p < 0.0001).

En précisant le type de VAG, les phylogroupes B2 et D étaient enrichis en adhésines et protectines. Les systèmes de capture du fer étaient présents en plus grand nombre au sein des phylogroupes B2, D, E, F et G (test de Kruskal-Wallis, p<0.0001, Figure 34).

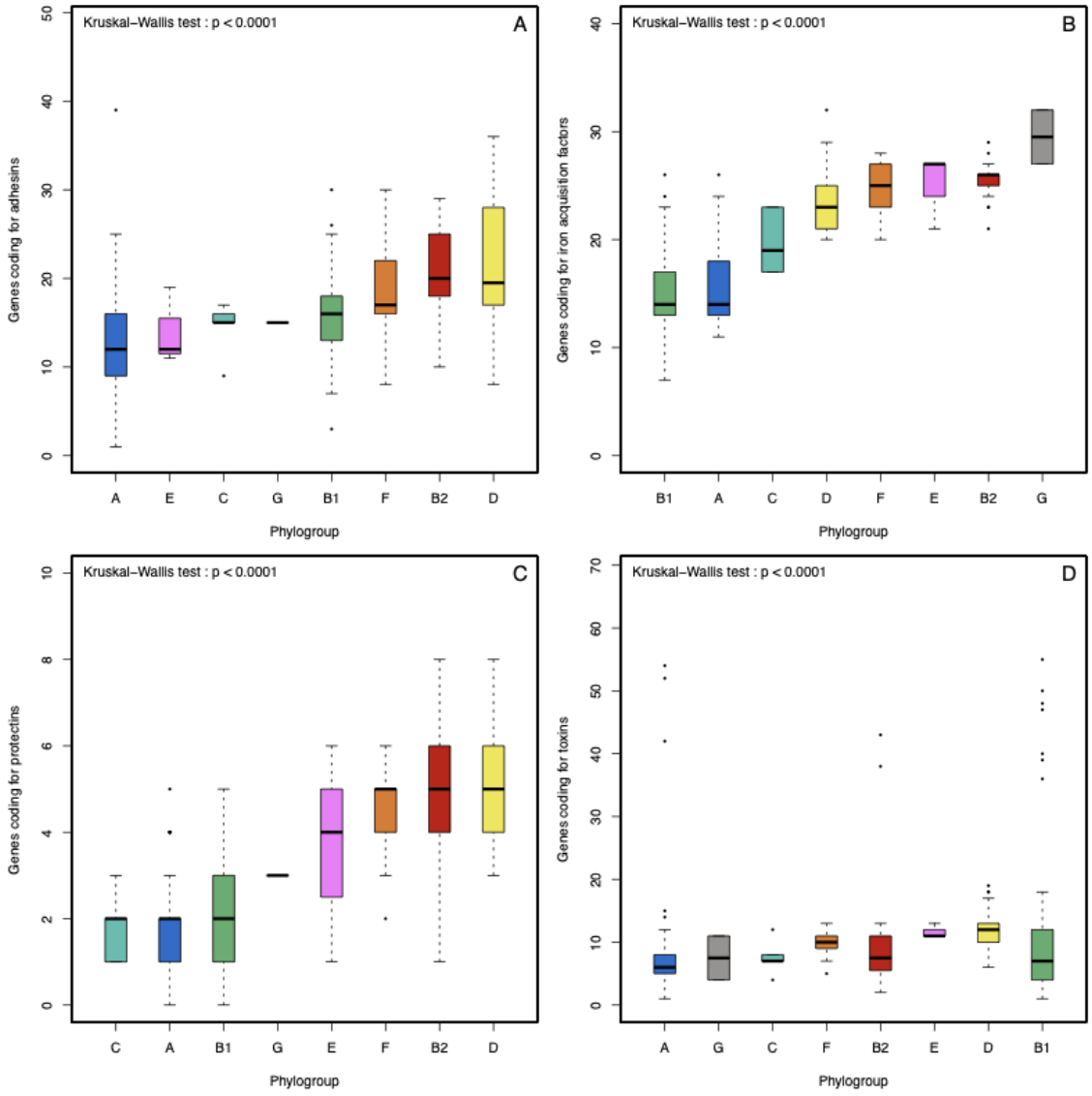


Figure 34 : Diagrammes en boîtes à moustache (*box plot*) du nombre de VAGs associés à (A) des adhésines, (B) des systèmes de capture du fer, (C) des protectines et (D) des toxines en fonction des phylogroupes des souches de *E. coli* acquises par les voyageurs lors de leur séjour (test de Kruskal-Wallis, p < 0.0001).

E. Analyse des MAGs de *E. coli*

Pour l'analyse des MAGs de *E. coli*, nous avons sélectionné uniquement les souches dont la complétude était supérieure à 60 % et avec un seuil de contamination inférieur à 5 %, après filtrage de qualité avec CheckM2 (Figure 35).

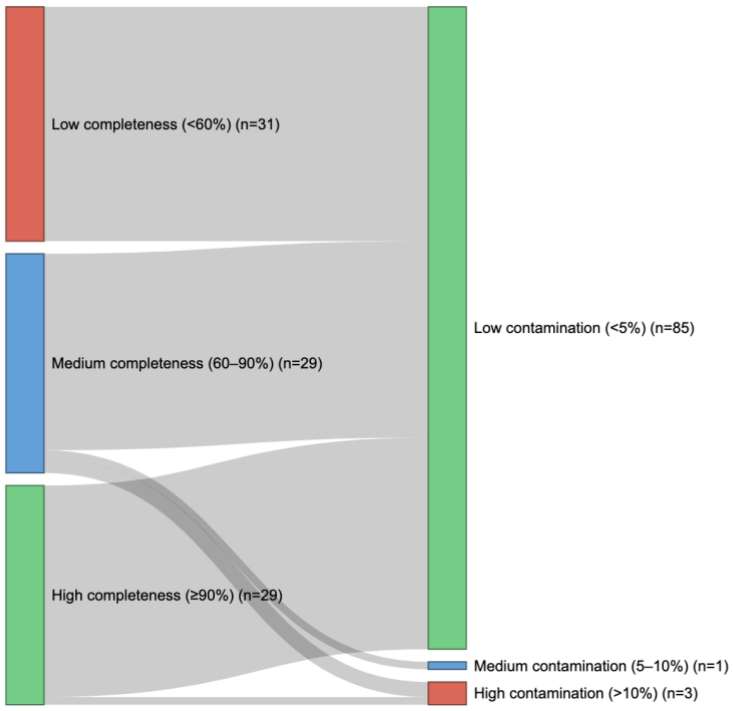


Figure 35 : Diagramme de Sankey illustrant la qualité des MAGs de *E. coli* (taux de complétude en % et taux de contamination en %) évalué à l'aide du logiciel CheckM2. Nous avons inclus uniquement les MAGs ayant une complétude de plus de 60 % et un taux de contamination < 5%.

La taille moyenne du génome était de 3,4 Mb [min. 0,6Mb ; max. 6,4Mb], et la couverture moyenne du génome était de 29,5 % [min. 0,7 % ; max. 89,5 %] (Tableau 7). Au total, 89 MAGs de *E. coli* ont été identifiés dont respectivement 38 identifiés chez des voyageurs « éliminateurs » et 51 identifiés chez les voyageurs « persistants ». Parmi eux, 58 présentaient une complétude de plus de 60 % et seulement 54 avec également un taux de contamination inférieur à 5 %. Contrairement aux souches multirésistantes décrites ci-dessus, seulement 12 ARGs ont été identifiés dans 7 MAGs de *E. coli*, soit une moyenne de 0,14 ARGs par MAG [min. 0 ; max. 5]. Concernant les VAGs, un total de 140 VAG uniques ont été identifiés parmi les 54 MAGs de *E. coli*, avec en moyenne 28 VAG par MAG [min. 1 ; max. 70].

Tableau 7 : Tableau montrant les indices (nombre de contigs total, taille du contig le plus long en pb, taille totale alignée en pb, N50 en pb, L50 en pb et la couverture du génome en %) de qualité d'assemblage des MAGs de *E. coli* à l'aide du logiciel QUAST. La moyenne, la médiane, l'écart-type (EC) moyen, l'écart-type (EC), la valeur minimale et la valeur maximale ont été reportées.

	Nombre total de contigs	Contig le plus long (pb)	Taille totale alignée (pb)	N50 (pb)	LA50 (pb)	Couverture du génome (%)
Moyenne	299	160209	1540235	60889	30	29,5
Médiane	231	108795	89785	33131	29	1,7
EC moyen	233	117504	1662227	52738	13	31,8
EC	272	147483	1815291	68084	16	35,0
Min	11	5959	41353	2476	10	0,7
Max	866	693286	4504571	357572	58	89,5

Le lien entre les phylogroupes des souches multirésistantes de *E. coli*, celui de la MAG de *E. coli* considérée comme la souche dominante et la durée de portage a été évalué. Tous les modèles d'AFT sélectionnés selon leur AIC utilisaient une loi log-normale pour modéliser la durée de persistance des *E. coli*.

Les durées de persistance des bactéries des phylogroupes B2, D et F étaient respectivement 2,87 ($p < 0,001$), 1,97 ($p = 0,002$) et 2,46 ($p < 0,001$) fois plus longues que celles du phylogroupe A, tandis que la persistance du phylogroupe B1 était comparable à celle du groupe A ($p = 0,837$, Figure 36 panel A).

De même, la persistance était 2,20 fois plus longue lorsque la souche dominante appartenait au phylogroupe B2, comparé au phylogroupe A ($p = 0,008$, (Figure 36 panel B). L'impact des souches dominantes issues d'autres phylogroupes n'était pas significatif.

Concernant l'impact global du nombre de VAG, la durée de persistance des EMR était multipliée par 1,16 par palier de 10 VAG supplémentaires ($p = 0,001$, Figure 36 panel C). Toutefois l'impact sur la persistance dépendait du type de gène (Figure 36 panel D) : la persistance était respectivement multipliée par 1,25 ($p = 0,047$) et 1,85 ($p < 0,001$) par palier de 10 VAG supplémentaires associés aux adhésines et à l'acquisition du fer alors que la durée de persistance était divisée par 1,20 par palier de 10 VAG supplémentaires associés aux toxines ($p = 0,049$). Le nombre de VAGs associés aux invasines n'avait pas d'impact significatif ($p = 0,103$).

Enfin, le modèle AFT évaluant l'impact des gènes de résistance n'a retenu aucune variable explicative, indiquant qu'ils n'avaient pas d'effet mesurable sur la durée de persistance bactérienne (Figure 36 panel E).

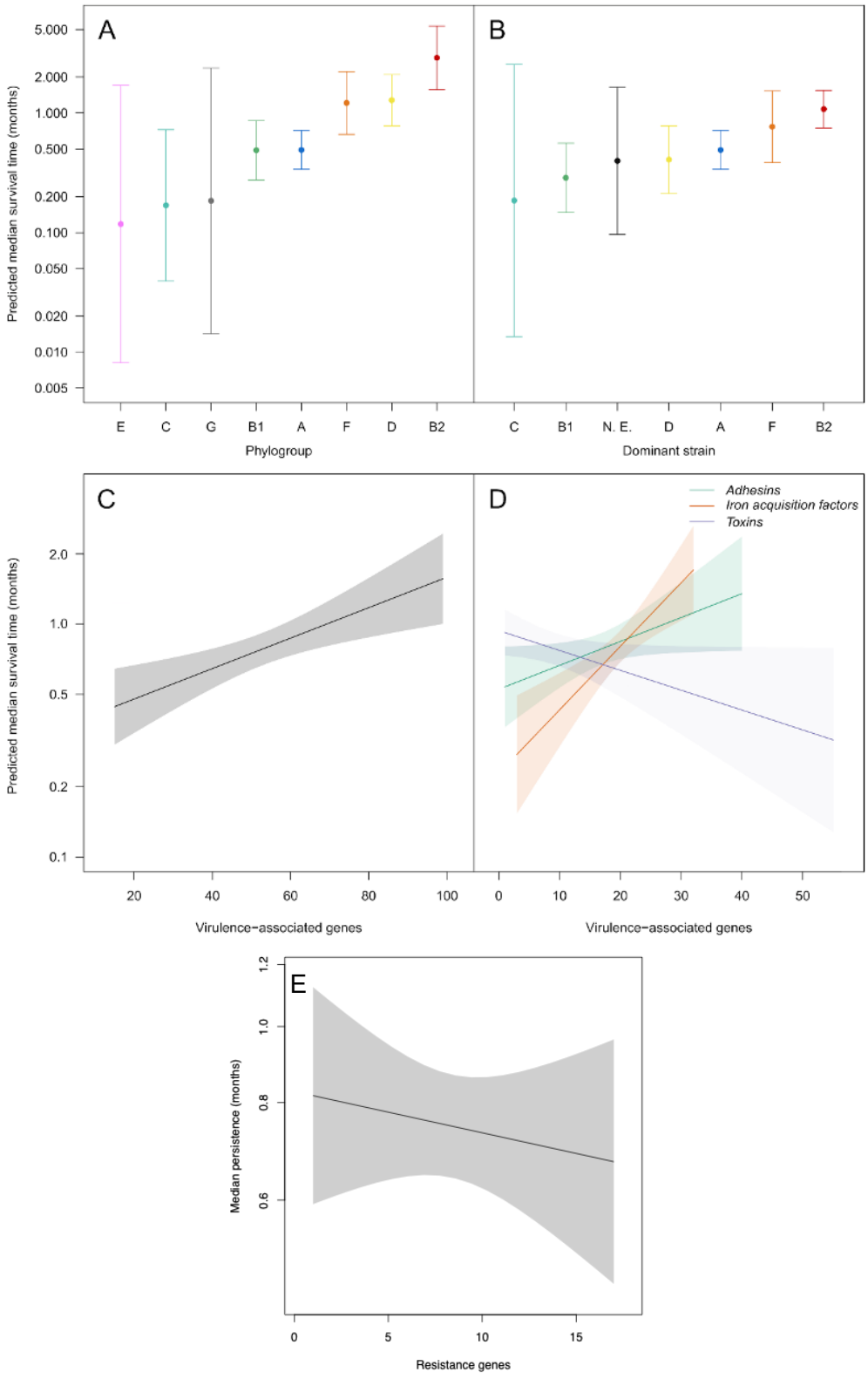


Figure 36 : Estimation de la durée moyenne de la persistance des souches de *E. coli* multirésistantes selon les modèles de temps de défaillance accélérée (AFT). L'impact du phylogroupe de la souche multirésistante (A), de la souche dominante (B), du nombre total de gènes de virulence (VAG) portés par les bactéries (C), ainsi que du nombre de VAGs associés à différents types de facteurs de virulence – adhésines, acquisition du fer et toxines (D) –, le nombre total de gènes de résistance (E), est représenté. Les estimations (points pour A et B, lignes pour C et D) sont présentées avec leur intervalle de confiance (barres d'erreur en A et B, enveloppes en C et D). Les souches dominantes n'appartenant pas au genre *Escherichia* sont notées « N.E. » en B.

4. *B. longum* et *B. adolescentis* associés *in vitro* à l'élimination des EMR

A. Résultats généraux

Les résultats précédents ont montré que certaines espèces bactériennes étaient associées à l'élimination rapide (inférieure à un mois) des EMR, et notamment des espèces du genre *Bifidobacterium* : *B. adolescentis* et *B. longum*. Ces bactéries étant facilement cultivables et étant déjà largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire ou comme probiotiques, nous avons cherché à caractériser les relations entre *B. adolescentis*, *B. longum* et *E. coli* par des méthodes de co-culture *in vitro* et dans les MAGs. Des tests de co-culture bactérienne *in vitro* ont été réalisés afin d'évaluer le rôle des souches de *B. longum* et *B. adolescentis* ainsi que leurs surnageants dans l'élimination des *E. coli* multirésistants. Les expérimentations ont été conduites selon le protocole décrit dans la section II.4.B-Protocole , en milieu liquide, à l'aide d'un lecteur de DO à 600 nm.

Afin d'en faciliter la lecture, les différentes souches de *B. adolescentis* et *B. longum* ont été désignées comme suit :

- *B. adolescentis* 1 : CIP 64.58
- *B. adolescentis* 2 : CIP 64.59T
- *B. adolescentis 3* : CIP 64.61
- *B. adolescentis 4* : CIP 64.71
- *B. longum 1* : Bichat 31135
- *B. longum 2* : Bichat 33579
- *B. longum 3* : Bichat 57632
- *B. longum 4* : Bichat 63864

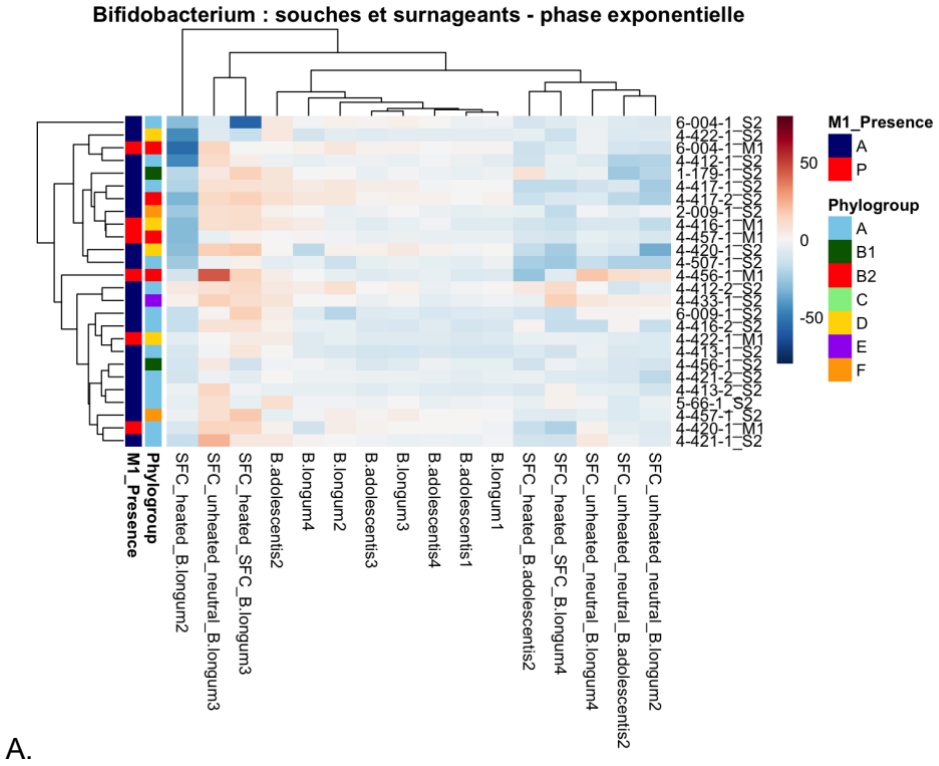
Les différentes conditions expérimentales appliquées aux surnageants ont été définies comme suit :

- "*SFC_heated*" : surnageants chauffés à 100 °C pendant 20 min ;
- "*SFC_unheated_neutral*" : surnageants non chauffés ajustés à un pH neutre à l'aide d'une solution de NaOH 2M.

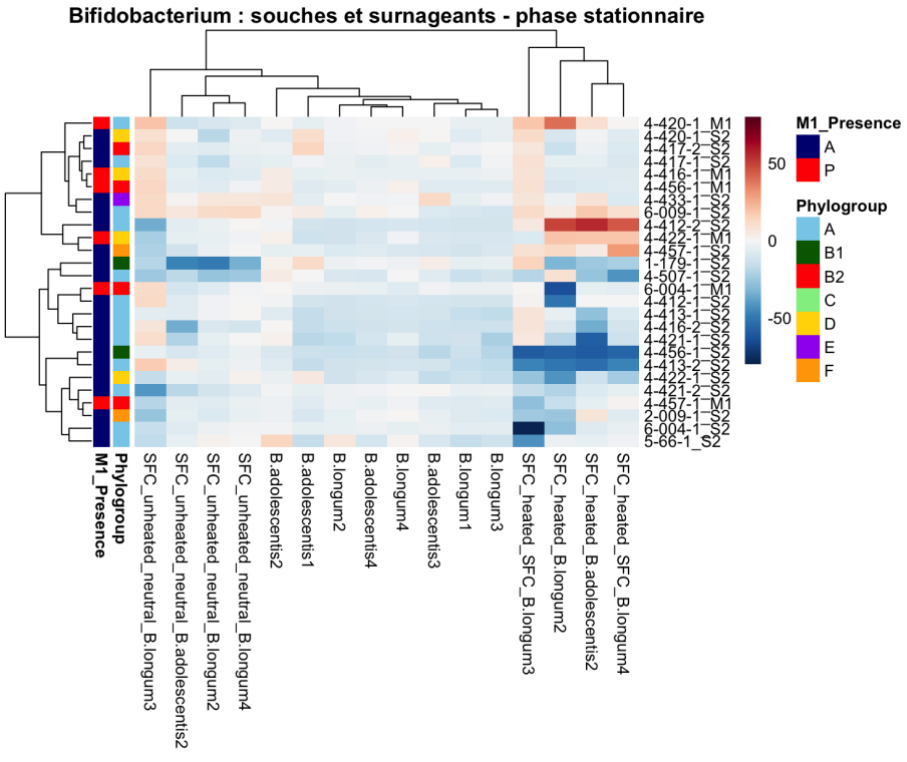
Les surnageants acellulaires ajustés à un pH acide à l'aide d'une solution de HCl 0,1M ont été exclus des analyses, l'acidité du milieu ayant inhibé la croissance de l'ensemble des souches de *E. coli*, y compris le témoin.

Deux types d'effets inhibiteurs ont été observés : (i) un retard de croissance en phase exponentielle, quantifié par la différence d'aire sous la courbe par rapport à la croissance de la souche de *E. coli* seule, traduisant un retard de croissance bactérienne en présence de *Bifidobacterium* ; et (ii) une réduction de la concentration bactérienne finale en phase stationnaire, mesurée par la différence des valeurs de DO 600 nm (Figure 14). Selon les combinaisons testées, ces deux effets pouvaient être observés simultanément, séparément ou absents.

La matrice des effets inhibiteurs est présentée sous forme de carte de densité ou *heatmaps* (Figure 37). Les souches de *E. coli* y sont annotées selon leur temps d'isolement (au retour ou un mois après le voyage) et leur phylogroupe. La taille de l'effet a été estimée à partir de comparaisons multiples réalisées à l'aide du test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg, et les valeurs correspondantes sont illustrées par des diagrammes en boîte à moustache (*box plots*) (Figure 38, Tableau 1 en Annexe). Le gradient de la *heatmap* et la taille de l'effet indiquent le pourcentage d'inhibition de la croissance de *E. coli* en présence de *Bifidobacterium* pour les valeurs positives, et le pourcentage d'augmentation de la croissance pour les valeurs négatives. Par exemple, une valeur de + 10 % correspond à une réduction de 10 % de la croissance de *E. coli* en présence de *Bifidobacterium* par rapport à la culture témoin de *E. coli* seule, tandis qu'une valeur de - 10 % indique une augmentation de 10 % de la croissance de *E. coli*.



A.



B.

Figure 37 : Cartes de densité (*heatmaps)* illustrant la différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées aux *Bifidobacterium* (souches et surnageants acellulaires) à la phase exponentielle (A) et en phase stationnaire (B). Les souches de *E. coli* y sont annotées selon leur temps d'isolement (au retour ou un mois après le voyage) et leur phylogroupe.

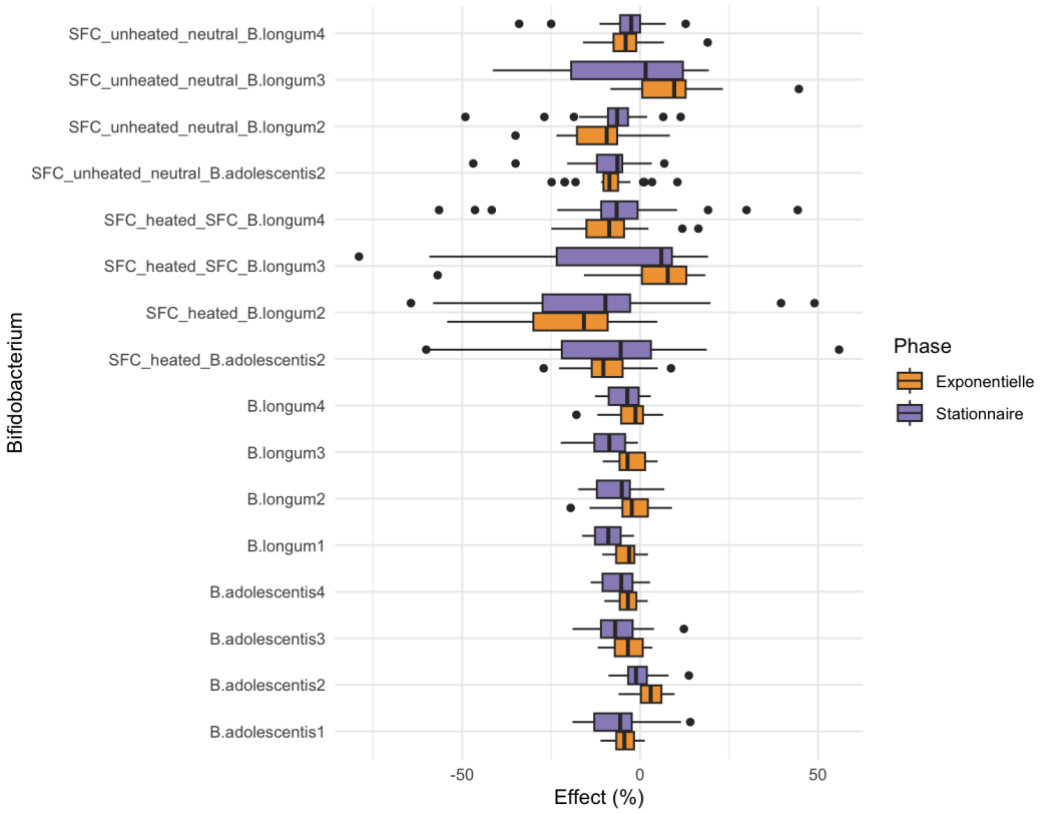
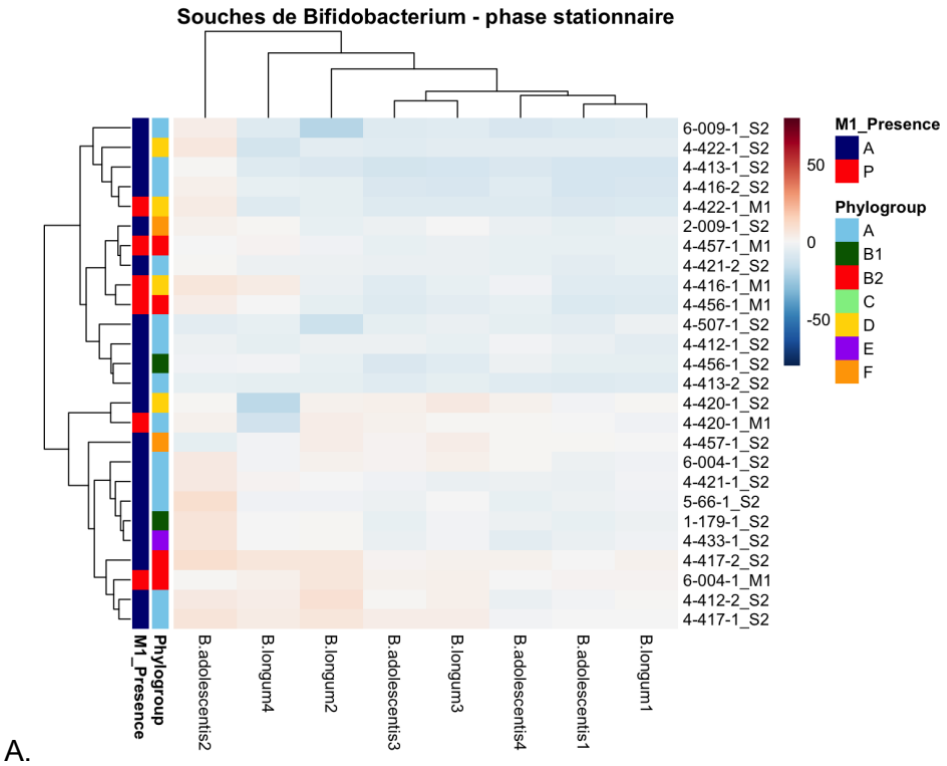


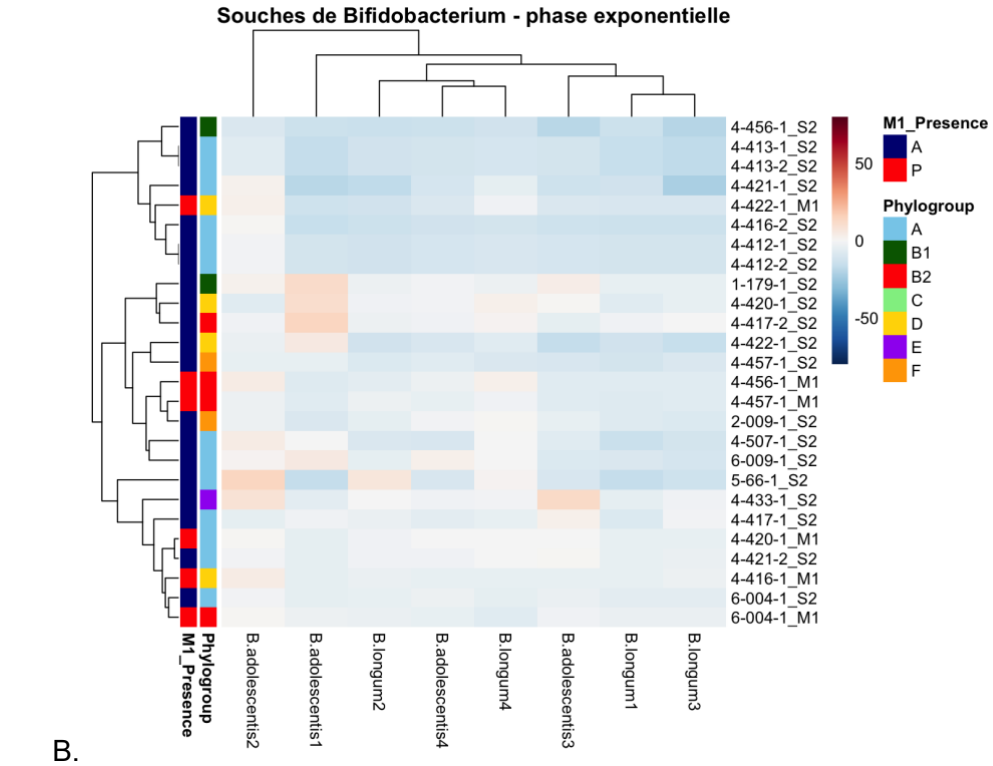
Figure 38 : Diagramme en boîte à moustache (*box plot*) illustrant la taille de l'effet inhibiteur de *Bifidobacterium* (souches et surnageants acellulaires) à la phase exponentielle (en orange) et à la phase stationnaire (en violet) sur la croissance de *E. coli*. La barre verticale au milieu du chaque boite à moustache correspond à la valeur médiane d'inhibition observée.

Co-cultures bactériennes

Concernant les co-cultures bactériennes des souches de *Bifidobacterium* et de *E. coli*, 208 combinaisons ont été testées au total (Figure 39). De manière notable, la souche *B. adolescentis* 2 a montré un effet inhibiteur significatif (test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg, $p < 0,05$) de façon constante sur la croissance des *E. coli* durant la phase exponentielle, suggérant un effet spécifique à cette souche (Figure 40, Tableau 1 en Annexe). Pour les autres souches de *E. coli*, nous avons plutôt observé une tendance à une augmentation moyenne de croissance d'environ 4,8 % en présence de *Bifidobacterium* à la phase exponentielle et à la phase stationnaire (Figure 39). Il semble qu'un effet inhibiteur modéré en phase exponentielle soit spécifiquement associé à certaines souches de *E. coli*, comme le suggère le *clustering* observé en deux groupes distincts sur le *heatmap* (Figure 38). Plus globalement, aucune association significative n'a été mise en évidence entre les phylogroupes de *E. coli* et les effets inhibiteurs, que ce soit en phase exponentielle ou en phase stationnaire (test de Kruskal-Wallis, $p = 0,7$ et $p = 0,5$ respectivement).



A.



B.

Figure 39 : Cartes de densité (*heatmaps)* illustrant la différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées aux souches *Bifidobacterium* à la phase exponentielle (A) et en phase stationnaire (B). Les souches de *E. coli* y sont annotées selon leur temps d'isolement (au retour ou un mois après le voyage) et leur phylogroupe.

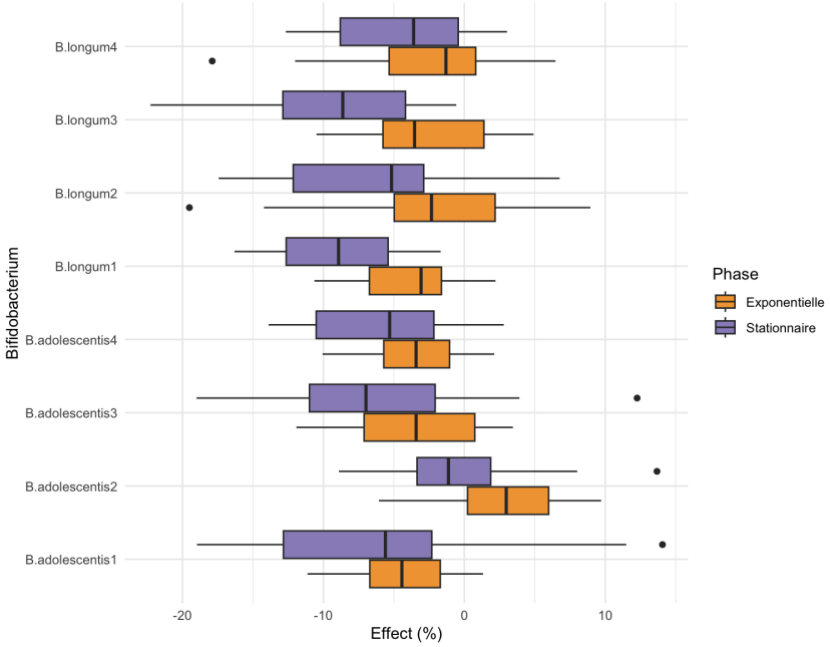


Figure 40 : Diagramme en boîte à moustache (*box plot*) illustrant la taille de l'effet inhibiteur des souches de *Bifidobacterium* à la phase exponentielle (en orange) et à la phase stationnaire (en violet) sur la croissance de *E. coli*. La barre verticale au milieu du chaque boite à moustache correspond à la valeur médiane d'inhibition observée.

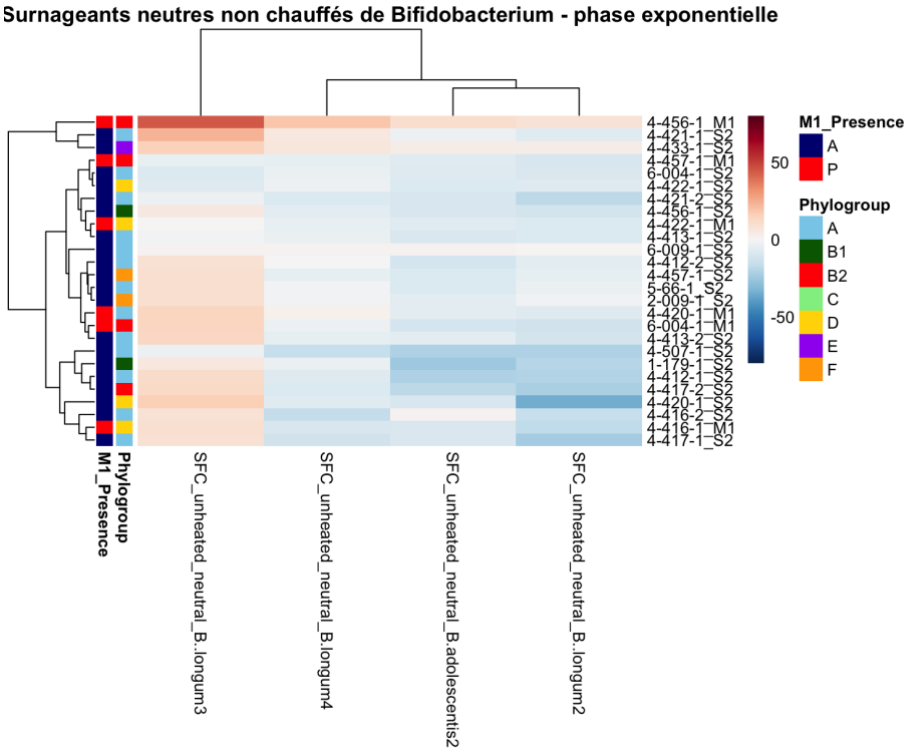
Co-culture avec les surnageants acellulaires

Afin d'examiner plus en détail les mécanismes sous-jacents à l'effet inhibiteur observé en co-culture bactérienne, des tests *in vitro* ont été réalisés en utilisant des surnageants acellulaires de cultures de *Bifidobacterium*. Ces expériences visaient à déterminer si l'inhibition de la croissance des *E. coli* pouvait être attribuée à la présence de métabolites (sensibles à la chaleur ou non) sécrétés par les souches de *Bifidobacterium*. Les tests ont été réalisés pour les surnageants des souches *B. adolescentis* 2, *B. longum* 2, *B. longum* 3 et *B. longum* 4 (Figure 41).

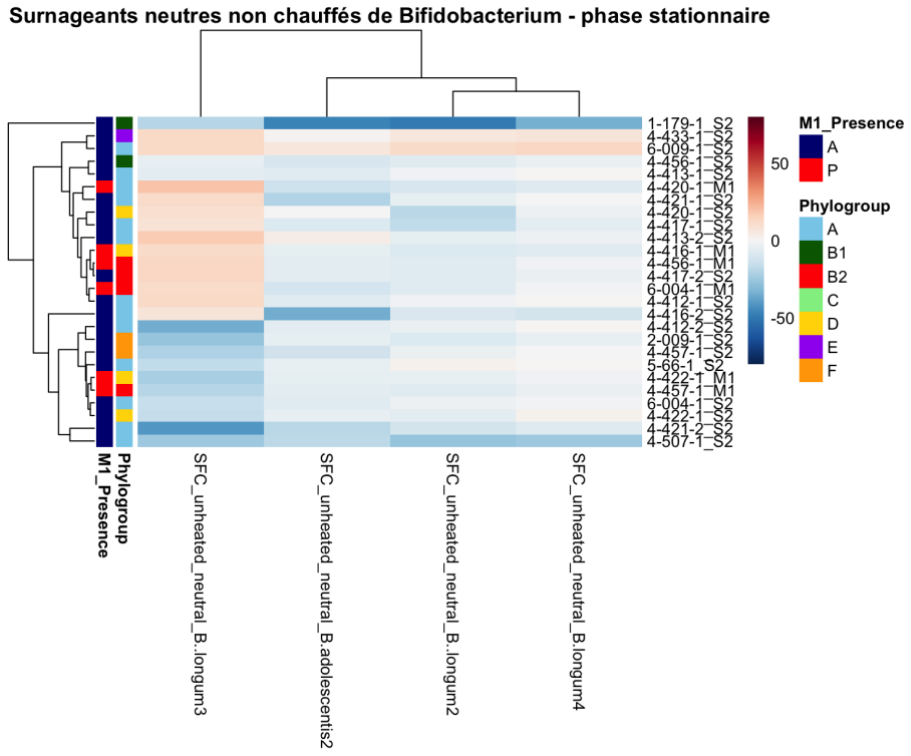
Dans l'ensemble, les effets observés avec les surnageants étaient similaires à ceux détectés lors des co-cultures bactériennes, suggérant une contribution partielle de composés sécrétés à l'effet inhibiteur global.

Concernant les surnageants neutres et chauffés, on observe plutôt une tendance à une augmentation de la croissance des souches de *E. coli* en présence des surnageants de *Bifidobacterium* à la phase exponentielle et à la phase stationnaire, avec en moyenne une croissance de respectivement 5,6 % et 8,9 % (Figure 41). Alors qu'un effet inhibiteur significatif a été observé pour les surnageants neutres et chauffés de la souche *B. longum* 3, en phase exponentielle et en phase stationnaire (Test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg, $p < 0,05$), suggérant un effet inhibiteur médié par des produits sécrétés par cette souche (Figure 42, Tableau 1 en Annexe).

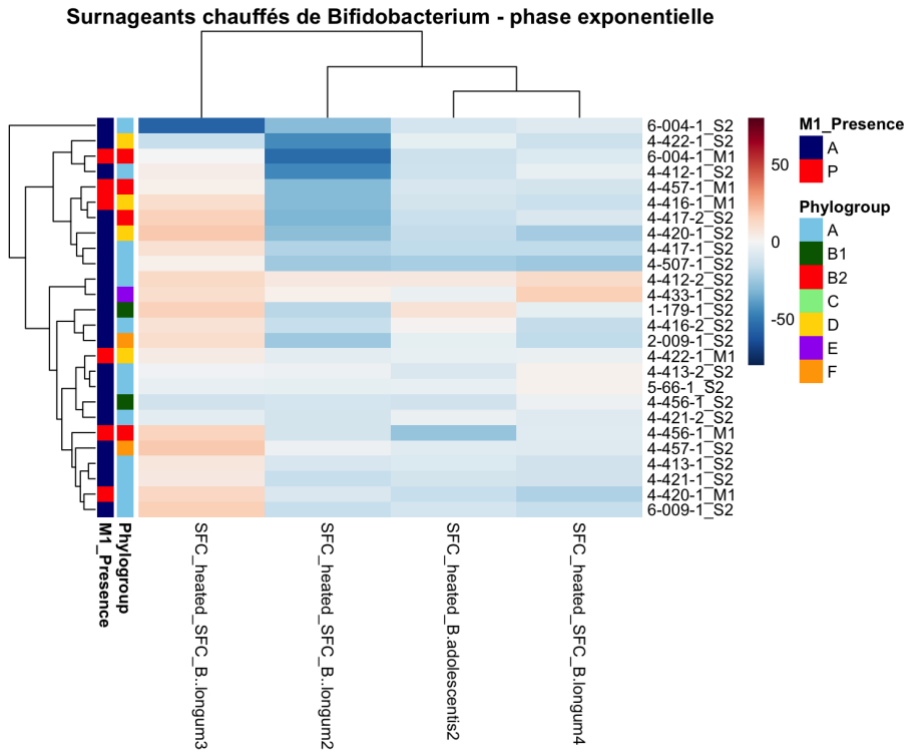
Il est à noter qu'un groupe de quinze souches de *E. coli* (*cluster* sur le *heatmap* des surnageants chauffés en phase exponentielle) présentait un effet inhibiteur commun aux surnageants neutres et chauffés, suggérant une susceptibilité spécifique à certaines souches de *E. coli*.



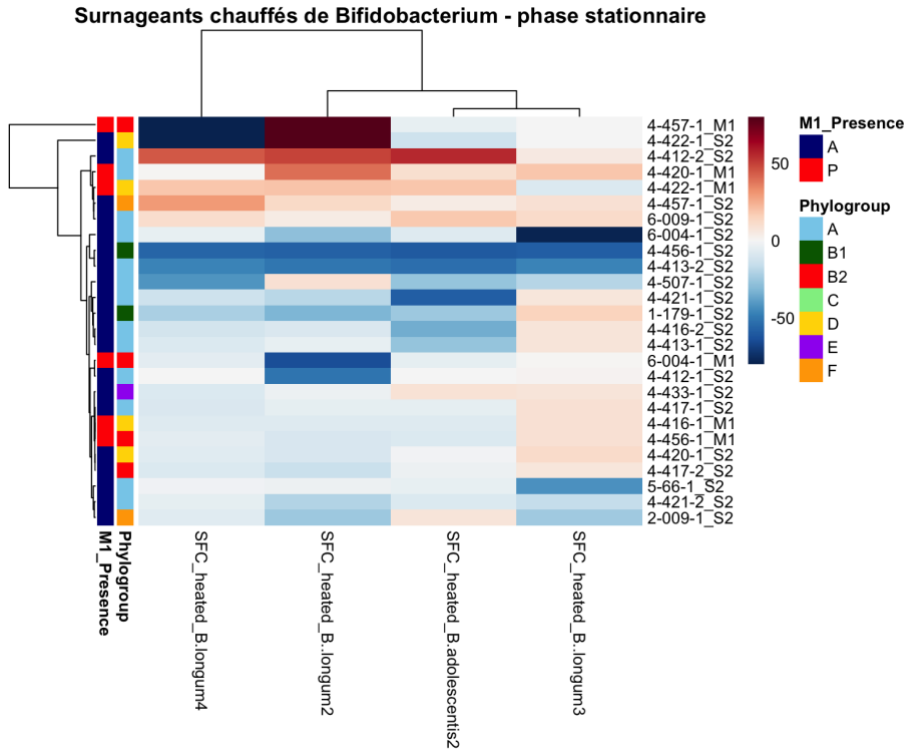
A.



B.



C.



D.

Figure 41 : Cartes de densité (*heatmaps)* illustrant la différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées aux surnageants acellulaires de *Bifidobacterium* à pH neutre (A et B) et surnageants acellulaires de *Bifidobacterium* chauffés (C et D) à la phase exponentielle (A et C) et en phase stationnaire (B et D). Les souches de *E. coli* y sont annotées selon leur temps d'isolement (au retour ou un mois après le voyage) et leur phylogroupe.

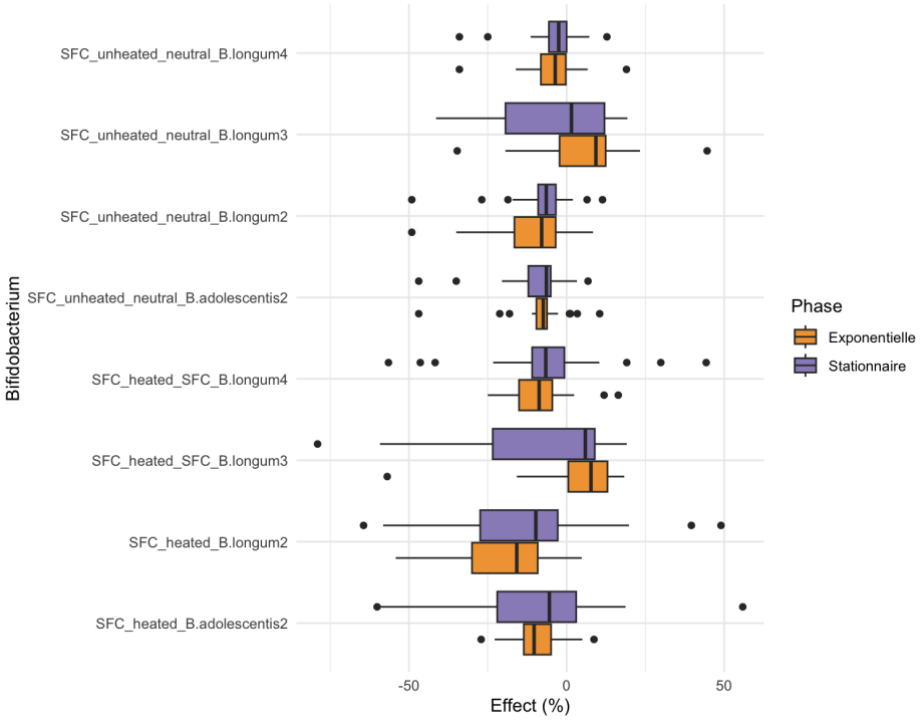
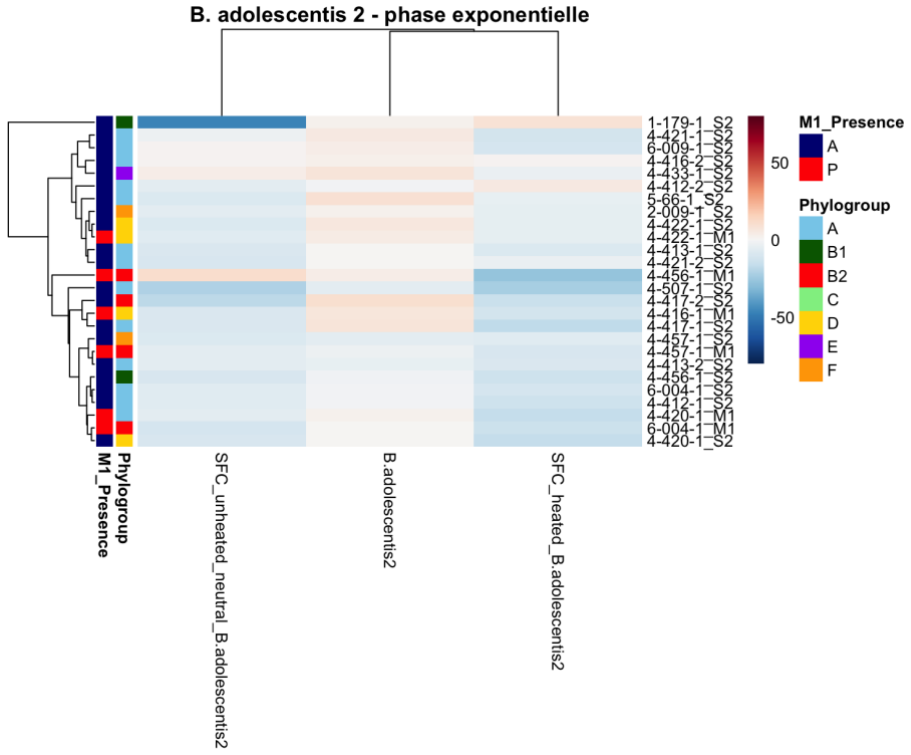


Figure 42 : Diagramme en boîte à moustache (*box plot*) illustrant la taille de l'effet inhibiteur des surnageants de *Bifidobacterium* à la phase exponentielle (en orange) et à la phase stationnaire (en violet) sur la croissance de *E. coli*. La barre verticale au milieu du chaque boite à moustache correspond à la valeur médiane d'inhibition observée.

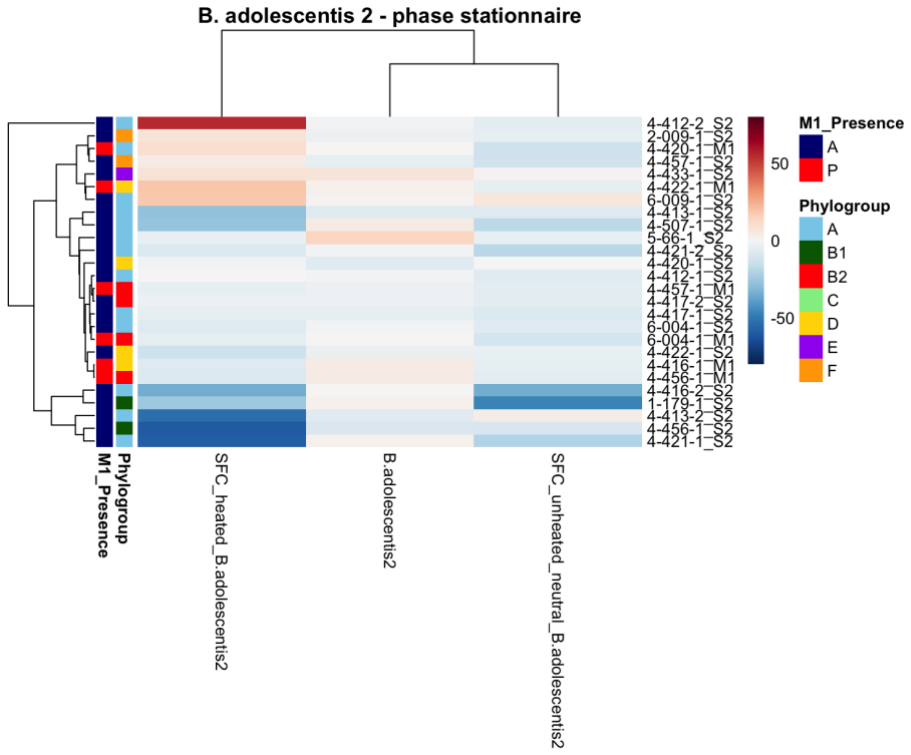
B. *B. adolescentis* 2

En phase exponentielle et en phase stationnaire, un effet inhibiteur significatif a été observé lors de co-culture de *B. adolescentis* 2 par rapport à ses surnageants (Test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg, respectivement $p < 0,001$ et $p < 0,05$) (Figure 43, Tableau 1 en Annexe). En phase stationnaire, nous avons observé une inhibition spécifique de la croissance d'un groupe de *E. coli* en présence du surnageant chauffé de *B. adolescentis* (*cluster* sur le *heatmap* en phase stationnaire pour le surnageant chauffé de *B. adolescentis*). Concernant les surnageants de *B. adolescentis* 2, on observe plutôt une tendance à une augmentation de croissance en phase exponentielle et en phase stationnaire, respectivement en moyenne de 8,9 % et 9,3 % (Figure 44).

B. adolescentis 2 a montré un effet inhibiteur significatif en co-culture en milieu liquide contrairement à ses surnageants, suggérant un effet indirect de *B. adolescentis* 2 plutôt qu'une inhibition directement médiée par un métabolite sécrété. De plus, il semble y avoir un effet plus marqué pour certaines souches de *E. coli*, ce qui est en faveur d'une part génomique liée aux souches elles-mêmes.



A.



B.

Figure 43 : Cartes de densité (*heatmaps)* illustrant la différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à *B. adolescentis* 2 (souche et surnageants acellulaires à pH neutre et chauffé à la phase exponentielle (A) et en phase stationnaire (B). Les souches de *E. coli* y sont annotées selon leur temps d'isolement (au retour ou un mois après le voyage) et leur phylogroupe.

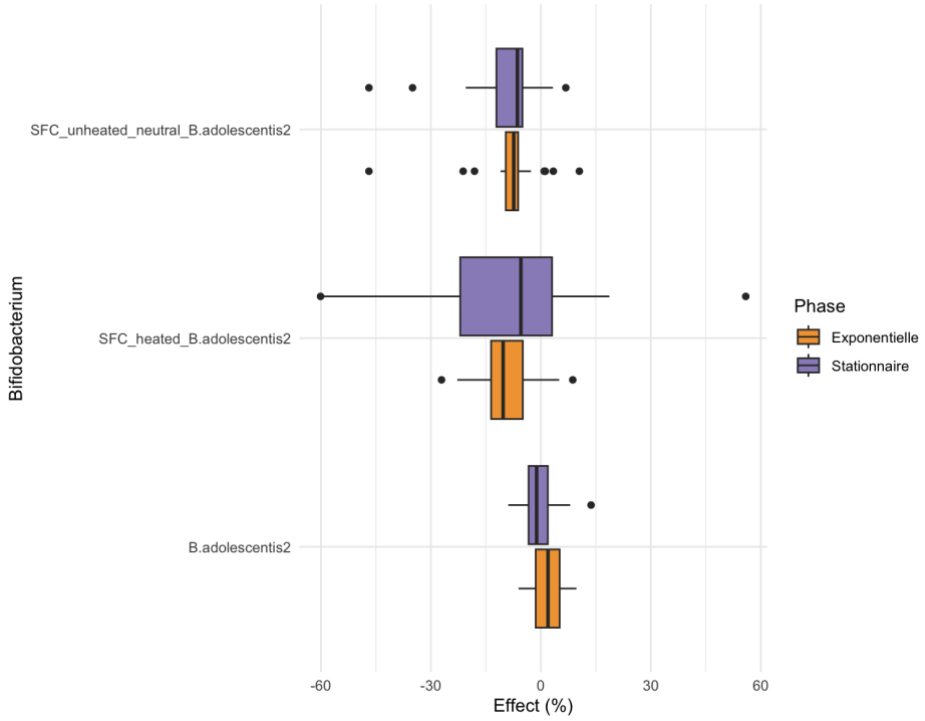


Figure 44 : Diagramme en boîte à moustache (*box plot*) illustrant la taille de l'effet inhibiteur de *B. adolescentis* 2 (souche, surnageant à pH neutre et surnageant chauffé) à la phase exponentielle (en orange) et à la phase stationnaire (en violet) sur la croissance de *E. coli*. La barre verticale au milieu du chaque boite à moustache correspond à la valeur médiane d'inhibition observée.

Afin d'approfondir l'analyse, nous avons examiné les gènes exclusivement présents dans la souche *B. adolescentis* 2 afin d'essayer comprendre les mécanismes d'action potentiels de *B. adolescentis* dans l'élimination des EMR (Tableau 8). Ces gènes étaient principalement associés à des systèmes de défense bactérienne, à la mobilité et à la recombinaison génétique, ainsi qu'à des fonctions liées à la compétition bactérienne et au métabolisme, notamment le métabolisme général, le métabolisme des glucides et la compétition pour les nutriments.

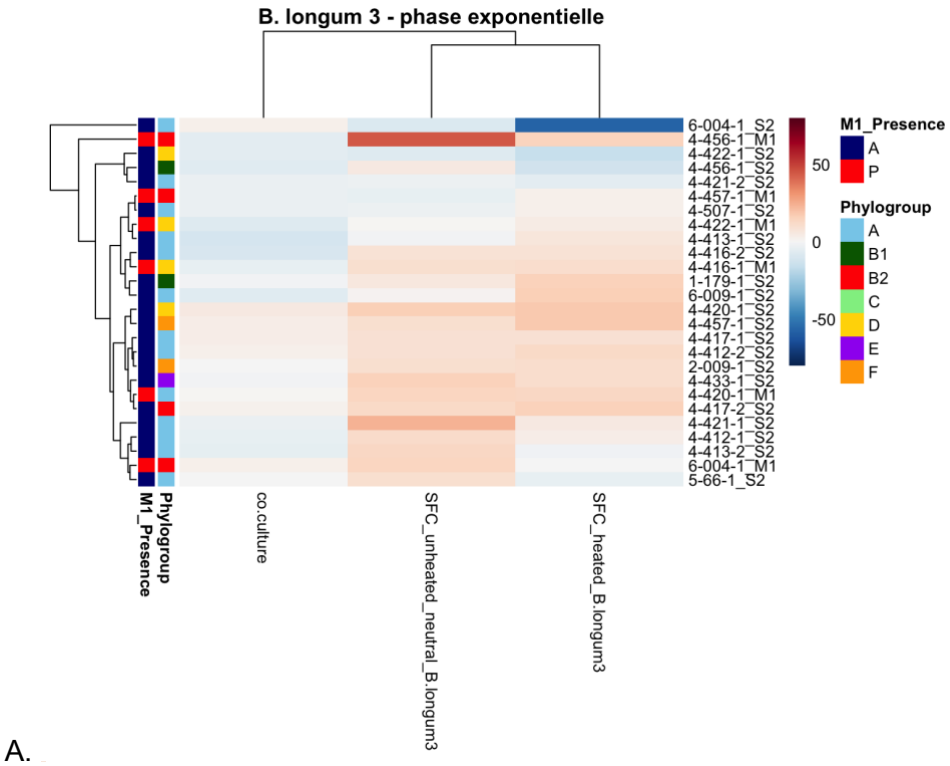
Tableau 8 : Gènes uniquement présents chez *B. adolescentis* CIP64.59T

Gène	Description	Categorie
hpaIIM	Modification methylase HpaII	Defense system
sau3AIR_2	Type-2 restriction enzyme Sau3AI	Defense system
ydiS	Type-2 restriction enzyme BsuMI component YdiS	Defense system
ydjA	Type-2 restriction enzyme BsuMI component YdjA	Defense system
group_181	IS3 family transposase ISBmu11	Gene mobility
group_381	IS3 family transposase ISBlo10	Gene mobility
group_818	IS3 family transposase ISBlo9	Gene mobility
group_880	IS256 family transposase ISBlo5	Gene mobility
group_967	IS21 family transposase ISBad1	Gene mobility
devR	DNA-binding transcriptional activator DevR/DosR	Gene regulation
exuR_1	putative HTH-type transcriptional repressor ExuR	Gene regulation
whiB	Transcriptional regulator WhiB	Gene regulation
hin	DNA-invertase hin	Genetic recombination
xerC_1	Tyrosine recombinase XerC	Genetic recombination
dtd_2	D-aminoacyl-tRNA deacylase	Other
soj	Chromosome-partitioning ATPase Soj	Other
yccF_1	Inner membrane protein YccF	Other
higB2	Putative toxin HigB2	Bacterial competition
yafQ	mRNA interferase toxin YafQ	Bacterial competition
abf2	Intracellular exo-alpha-L-arabinofuranosidase 2	Cell wall modification / Sugar metabolism
bglA	Beta-glucosidase A	Cell wall modification / Sugar metabolism
epsJ	putative glycosyltransferase EpsJ	Cell wall modification / Sugar metabolism
group_229	Bifunctional beta-D-glucosidase/beta-D-fucosidase	Cell wall modification / Sugar metabolism
malL_2	Oligo-16-glucosidase	Cell wall modification / Sugar metabolism
mltG_3	Endolytic murein transglycosylase	Cell wall modification / Sugar metabolism
dapH	2345-tetrahydropyridine-26-dicarboxylate N-acetyltransferase	Metabolism
group_141	Iron-sulfur cluster carrier protein	Metabolism
group_165	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	Metabolism
group_328	dTDP-glucose 46-dehydratase	Metabolism
group_368	Undecaprenyl-phosphate4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	Metabolism
group_399	Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase 2	Metabolism
group_624	Arsenate reductase	Metabolism
tll	dTDP-6-deoxy-L-talose 4-dehydrogenase (NAD(+))	Metabolism
araQ_2	L-arabinose transport system permease protein AraQ	Nutrient uptake
bcrA	Bacitracin transport ATP-binding protein BcrA	Nutrient uptake
btuD_13	Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD	Nutrient uptake
cycB	Cyclodextrin-binding protein	Nutrient uptake
lacF_2	Lactose transport system permease protein LacF	Nutrient uptake
msmE_2	Multiple sugar-binding protein	Nutrient uptake
tcyC	L-cystine import ATP-binding protein TcyC	Nutrient uptake
tcyL	L-cystine transport system permease protein TcyL	Nutrient uptake
tcyM	L-cystine transport system permease protein TcyM	Nutrient uptake
yxeM	putative amino-acid-binding protein YxeM	Nutrient uptake
cotSA	Spore coat protein SA	Sporulation
group_505	putative protein	Unknown / Putative
group_966	hypothetical protein	Unknown / Putative

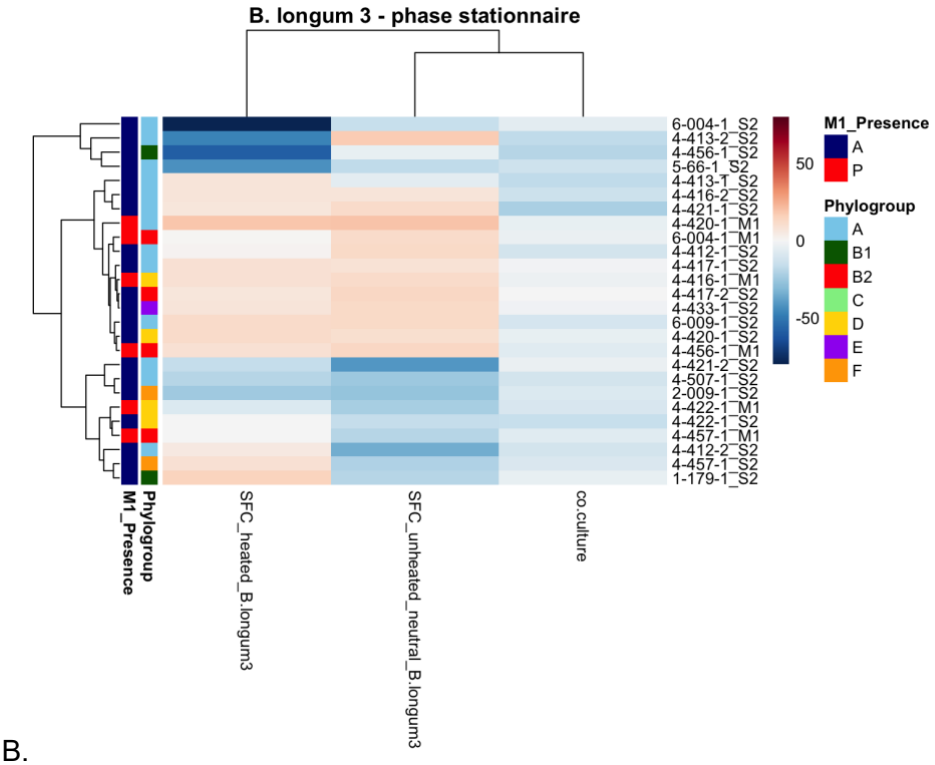
C. *B. longum* 3

En ce qui concerne *B. longum* 3, un effet inhibiteur significatif a été observé pour les surnageants neutres et chauffés en phase exponentielle par rapport à la co-culture avec la souche bactérienne (Test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg, $p < 0,001$), mais non significatif en phase stationnaire (Figure 45, Tableau 1 en Annexe). Parmi les différentes conditions testées, à la phase exponentielle et à la phase stationnaire, le surnageant chauffé de *B. longum* 3 a présenté un effet inhibiteur significatif sur l'ensemble des souches de *E. coli,* avec une valeur médiane d'inhibition respectivement de 7,8 % et 6,0 % (Figure 46). Tandis que le surnageant neutre de *B. longum* 3 a montré un effet ciblé, particulièrement prononcé sur un groupe de quinze souches de *E. coli* en phase stationnaire (*cluster* sur le *heatmap* en phase stationnaire pour le surnageant neutre de *B. longum 3)*.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition pourrait être médiée par un métabolite produit par *B. longum* 3, dont l'activité pourrait être conservée après chauffage, ce qui évoque la possible implication d'un composé thermostable, potentiellement non enzymatique. De plus, comme pour *B. adolescentis* 2, il semble y avoir également un effet *E. coli*-dépendant selon les conditions expérimentales.



A.



B.

Figure 45 : Cartes de densité (*heatmaps)* illustrant la différence de croissance entre les co-cultures de *E. coli* associées à *B. longum* 3 (souche et surnageants acellulaires à pH neutre et chauffé) à la phase exponentielle (A) et en phase stationnaire (B). Les souches de *E. coli* y sont annotées selon leur temps d'isolement (au retour ou un mois après le voyage) et leur phylogroupe.

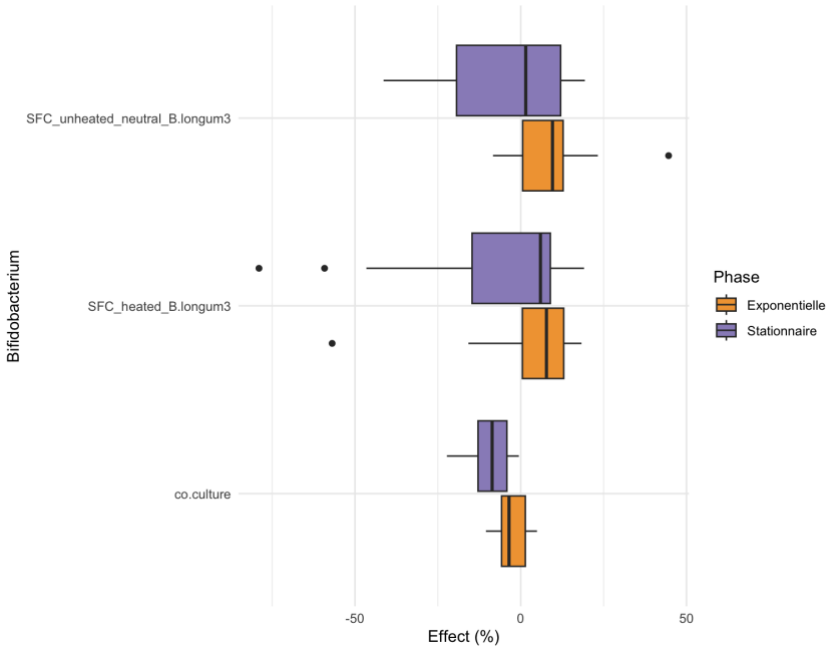


Figure 46 : Diagramme en boîte à moustache (*box plot*) illustrant la taille de l'effet inhibiteur de *B. longum* 3 (souche, surnageant à pH neutre et surnageant chauffé) à la phase exponentielle (en orange) et à la phase stationnaire (en violet) sur la croissance de *E. coli*. La barre verticale au milieu du chaque boite à moustache correspond à la valeur médiane d'inhibition observée.

IV. Discussion

Le principal résultat de cette étude est l'identification de facteurs associés à l'élimination du portage de *E. coli* multirésistants après un séjour en zone tropicale : (1) des facteurs liés à la composition du microbiote et notamment une abondance relative élevée en *Bifidobacterium* et (2) des caractéristiques propres aux souches de *E. coli*. Ces résultats consolident les résultats obtenus lors de précédentes études preuve de concept, grâce à l'inclusion d'une cohorte plus large, à l'intégration du séquençage par métagénomique *shotgun*, ainsi qu'à une validation des résultats *in vitro* (210,246).

1. Voyage et modification du microbiote intestinal

Une des forces de notre travail est d'avoir réalisé un séquençage combinant les méthodes Illumina et Nanopore permettant de réaliser des assemblages hybrides à partir de *reads* courts et de *reads* longs, apportant une amélioration au niveau de la qualité, de la complétude et de la contiguïté (Tableau 3) des MAGs et donc une résolution jusqu'au niveau taxonomique de l'espèce et l'identification de nouveaux taxons (309). Nous avons en effet obtenu près de trois fois plus de contigs en combinant les chimies qu'en utilisant uniquement la chimie Illumina (671332 contigs contre 277477), et une taille moyenne supérieure (6527 bases contre 3985). Sur les 150 échantillons de selles séquencées, nous avons identifié près de 1000 MAGs assignés à des taxons différents. Néanmoins et malgré ces efforts, nous avons pu reconstituer que partiellement les génomes des bactéries d'intérêt (*Bifidobacterium* et *E. coli*) avec en moyenne 30% du génome, ce qui a limité les explorations mécanistiques des *Bifidobacterium* et les analyses des traits génomiques des *E. coli*. Cela montre les limites de la métagénomique pour réaliser des études portant sur des bactéries pouvant être sous-dominantes vis-à-vis de la population dominante comme *E. coli.*

La comparaison de la composition du microbiote intestinal entre les 2 groupes éliminateurs et persistants n'a pas montré de différence significative en termes de diversité alpha et bêta, ce qui est semblable avec ce qui a été décrit dans la littérature. En effet, le microbiote intestinal est généralement reconnu pour sa stabilité sur le long terme pour ces deux paramètres. De nombreuses études suggèrent que la composition globale et la diversité microbienne, notamment la diversité alpha, ne sont pas significativement altérées par le voyage, même vers des destinations tropicales ou à faibles ressources, ni par la durée ou les modalités du voyage

(206–208,210). A côté des paramètres de diversité alpha, des modifications au niveau des taxons ont toutefois pu être observées. Dans l'étude ancillaire de cohorte de VOYAG-R, un enrichissement temporaire en entérobactéries avait été observé ainsi qu'une diminution de la richesse et de diversité bactérienne au départ (avant le voyage) avait été observée chez les individus qui sont restés porteurs d'EMR un mois après le voyage que chez ceux qui ne l'étaient pas (210). De même, une étude suivant 47 voyageurs suédois a observé une perturbation de la composition microbienne avec une augmentation également des entérobactéries et une diminution des *Christensenellaceae*, ainsi que l'acquisition de souches de BMR (209,228). Enfin, dans une cohorte de 267 voyageurs américains, il a été observé une perturbation du microbiote intestinal, caractérisée par une diminution significative de la diversité microbienne et un enrichissement de la famille des entérobactéries (209). Une analyse complémentaire de l'étude COMBAT a examiné le microbiote intestinal de 190 voyageurs se rendant en Afrique ou en Asie en utilisant le séquençage par métagénomique *shotgun* (235). Les résultats ont montré que la richesse, la diversité et la composition de la communauté microbienne avant le voyage ne permettaient pas de prédire l'acquisition d'EP-BLSE. Cependant, les individus qui n'ont pas été colonisés présentaient une prévalence et une abondance accrues de *Citrobacter freundii* et de certaines espèces de *Bacteroides*, suggérant un rôle protecteur potentiel.

Dans une précédente étude preuve de concept du groupe VOYAG-R, il avait été observé que *B. adolescentis* et certaines *Clostridiales*, identifiées par séquençage de l'ARNr 16S, étaient enrichies chez les individus qui avaient éliminé les EMR un mois après leur retour, ainsi qu'au retour et avant le départ. Ces résultats soutenaient l'hypothèse que l'élimination rapide (inférieur à un mois après le retour) des EMR était associée à une composition spécifique du microbiote intestinal spécifique. Ces résultats avaient été obtenus par séquençage de l'ADN complémentaire obtenu par rétrotranscription des ARNr16S et 23S. Par l'utilisation de la métagénomique *shotgun* et la reconstitution de MAGs, nous confirmons l'association entre l'abondance relative de *B. adolescentis* et de *B. longum* et l'élimination rapide des EMR après un voyage en zone tropicale. D'autres études renforcent le rôle des *Bifidobacterium* dans la stabilité du microbiote intestinal et dans la résistance à la colonisation. Une étude a révélé que les voyageurs présentant un microbiote intestinal stable avant le voyage présentaient un enrichissement en bactéries dites probiotiques spécifiques incluant *Bifidobacterium, Agathobaculum, Faecalibacterium, Roseburia et Lactobacillus* (203). De plus, l'utilisation d'antibiotiques a été associée à un appauvrissement significatif de plusieurs genres, dont *Bifidobacterium spp., Faecalibacterium spp. et Ruminococcus spp.*, un phénomène lié à la dysbiose et à la perte de résistance à la colonisation (209,235).

La première limite de notre étude est sa taille relativement restreinte de l'échantillon (75 sujets par bras) limite la puissance statistique des analyses et la capacité à généraliser nos conclusions. De plus, nous n'avons pas confirmé ces résultats sur une cohorte de validation externe.

2. Effet inhibiteur des *Bifidobacterium*

Nous avons observé par séquençage du microbiote intestinal des voyageurs une association entre une forte abondance de *B. adolescentis* et *B. longum* et l'élimination rapide des EMR. Plusieurs travaux concordent pour dire que les bactéries du genre *Bifidobacterium* jouent un rôle clé dans le microbiote intestinal et contribuent à la résistance à la colonisation (277).

Nos résultats *in vitro* confirment que *B. adolescentis* CIP64.59T a produit un effet inhibiteur significatif sur le jeu de *E. coli* testé alors que les souches CIP64.58, CIP64.61 ou CIP64.71 ont montré des effets beaucoup moins prononcés. Cela suggère que cet effet est indépendant du fond génétique de *E. coli*, tous les phylogroupes étant concernés. Du côté de *B. adolescentis*, les souches issues de la Collection de l'Institut Pasteur que nous avons utilisées sont phylogénétiquement très proches (Figure 24). De plus, nous n'observons pas de répartition particulière des MAGs de *B. adolescentis* des voyageurs au sein de l'arbre phylogénétique (Figure 25). Seul un MAG, le 11_1_ Bin_42 identifié chez un voyageur éliminateur se trouve sur la même branche que les *B. adolescentis* expérimentales, toutes les autres se situent sur des branches distinctes. Bien qu'une association forte ait été identifiée *in silico* entre les *B. adolescentis* et l'élimination rapide des EMR, une seule souche de *B. adolescentis* expérimentale sur les quatre qui sont très proches phylogénétiquement a eu un effet inhibiteur *in vitro*. Cela pourrait être en faveur de traits génomiques spécifiques d'une souche de *Bifidobacterium* particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *E. coli* multirésistants. Néanmoins, *B. adolescentis* 2 n'avait un effet inhibiteur significatif, bien que modéré, uniquement en co-culture et majoré en phase exponentielle et aucun effet de ses surnageants. Le mécanisme d'action semble plutôt lié à un effet indirect par exemple par acidification du pH intestinal ou par compétition pour les nutriments, et dans un contexte d'abondance relative élevée de *B. adolescentis* au sein du microbiote intestinal comme le suggèrent les analyses *in silico*. Nous n'avons toutefois pas mesuré le pH lors des compétitions afin de savoir si cette souche était capable d'acidifier le milieu de manière plus marquée que les autres souches testées.

En fermentant les glucides, *B. adolescentis* produit des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide acétique, ou l'acide propionique, qui créent un environnement acide défavorable à la croissance des entéro-pathogènes. L'activité antibactérienne de ces acides est largement attribuée à leur capacité à abaisser le pH intestinal, mais aussi à leur action intracellulaire : en traversant la membrane bactérienne, ils se dissocient dans le cytoplasme, libérant des protons susceptibles d'inhiber la machinerie métabolique de *E. coli (310)*.

Par ailleurs, certains de ces métabolites pourraient également renforcer la barrière intestinale, contribuant ainsi à la résistance à la colonisation. Ces effets ne sont pas visibles dans les expériences de compétitions *in vitro*, mais peuvent être captés par métagénomique en identifiant des abondances élevées en *B. adolescentis* chez les individus. La contribution de *B. adolescentis* à la résistance à la colonisation est liée à sa capacité à s'établir, à survivre dans des conditions défavorables et à concurrencer les bactéries pathogènes. Contrairement aux bactéries des phyla Bacteroidotaes et Bacillota qui sont sensibles à l'inhibition de croissance par le lactate et l'acétate, la croissance de *B. adolescentis* n'est pas affectée par le lactate ou l'acétate même à un pH acide (pH 5,5) (311). En effet, *B. adolescentis* est l'une des espèces de *Bifidobacterium* les plus abondantes dans le microbiote intestinal humain et l'une des plus fréquentes (elle est présente chez 60 à 80 % des adultes sains) (312,313). Son abondance est corrélée négativement avec celle de certaines espèces bactériennes pathogènes, notamment les genres *Citrobacter* et *Enterobacter* (appartenant aux entérobactéries) dans des cohortes métagénomiques, suggérant un rôle antagoniste dans la prévention de leur expansion (314). En comparant le contenu génétique de CIP64.59T avec celui des autres souches testées (très proches phylogénétiquement mais sans effet direct sur les *E. coli* dans les compétitions), nous avons identifié 46 gènes uniques associés à diverses fonctions, dont 24 reliés au métabolisme (notamment glucidique et associé à l'assimilation des nutriments), à la compétition bactérienne et à la modification de la paroi cellulaire. Ces gènes uniques étayent l'hypothèse d'un effet indirect via compétition pour les nutriments comme évoqué précédemment, en cohérence avec le principe de la niche nutritionnelle : les niches écologiques intestinales sont largement définies par la disponibilité des nutriments. D'une part, les *Bifidobacterium* sont particulièrement bien adaptées au microbiote intestinal et d'autres part ils sont capables d'utiliser une large gamme de glucides complexes que l'hôte ne digère pas (fibres alimentaires, glycanes d'origine végétale ou dérivés de l'hôte comme les mucines, ou encore oligosaccharides spécifiques) (315–317). Cette polyvalence métabolique pourrait offrir à certaines souches un avantage compétitif sur des *E. coli* face à des ressources limitées (318). Dans cette perspective, la présence des 24 gènes métaboliques uniques dans CIP64.59T renforce l'idée qu'une capacité métabolique accrue pour exploiter des niches marginales pourrait contribuer à l'élimination des EMR en limitant leur développement.

D’autre part, *B. adolescentis* agit indirectement et contribuant au maintien et à la réparation de la barrière intestinale participant ainsi à diminuer le risque d'invasion par des bactéries pathogènes. La couche muqueuse est considérée comme protégeant le système immunitaire intestinal contre une invasion bactérienne excessive et comme un élément clé de la barrière épithéliale intestinale (319). Des travaux ont montré que la supplémentation en *B. adolescentis* AF91-08b2A avait amélioré la fonction de barrière intestinale et la sécrétion de protéines mucines (ZO-1, occludine, claudine-2) contribuant au maintien des jonctions serrées dans le cadre des affections chroniques d'origine immunitaire affectant le tractus gastro-intestinal (en particulier la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) (314). Ces résultats ci-dessus suggèrent que *B. adolescentis* AF91-08b2A a favorisé la cicatrisation de l'épithélium intestinal et maintenu le fonctionnement normal de la barrière épithéliale intestinale (314).

Ces éléments illustrent le rôle clé d’une forte abondance de *B. adolescentis* dans le renforcement de l’effet barrière du microbiote intestinal. Cette espèce pourrait être capable de concurrencer efficacement les bactéries pathogènes pour les niches écologiques et les ressources disponibles, tout en limitant leur implantation grâce à son pouvoir acidifiant.

À l’inverse, un effet inhibiteur significatif a été observé exclusivement avec les surnageants de *B. longum* 3 sur l’ensemble des souches de *E. coli* testées, contrairement aux expériences de co-cultures bactériennes qui n’ont montré aucun effet notable. Les surnageants, qu’ils soient neutres ou chauffés, ont exercé une inhibition marquée en phase exponentielle et dans une moindre mesure en phase stationnaire de croissance bactérienne. Ces observations suggèrent que l’effet inhibiteur pourrait être, au moins en partie, indépendant d’un contact cellulaire direct, et médié par des composés sécrétés par la souche, et stables après chauffage. La thermo-stabilité apparente de cette activité antibactérienne plaide en faveur de la présence d’un métabolite résistant à la dénaturation thermique, possiblement non protéique ou non enzymatique, tel qu’un petit métabolite organique antimicrobien.

L’activité inhibitrice de *B. longum* 3 pourrait en effet être médié par des substances protéiques telles que des bactériocines ou peptides antimicrobiens (320). Inturri ***et al.*** ont identifié des métabolites sécrétés par *B. longum* ATCC 15707 qui avaient une activité antibactérienne *in vitro* contre les souches de référence de *E. coli* due à l'inactivation par des bactériocines ou des petits peptides produits et libérés dans le surnageant. De manière notable, l’activité inhibitrice avait été renforcée en combinaison avec plusieurs bactéries probiotiques : la combinaison des surnageants de *B. longum* BB536 et *Lactobacillus rhamnosus* HN001 avait présenté la plus forte capacité inhibitrice contre les souches de *E. coli*, probablement lié à un effet synergique des différents métabolites sécrétés (320). Dans ce travail les

expérimentations ont été réalisées en monoculture - un couple *Bifidobacterium–E. coli* - ce qui ne permet pas d'évaluer d'éventuelles interactions synergiques inter-souches, susceptibles de renforcer ou de moduler l'effet inhibiteur observé.

Afin d'étudier plus en détail l'effet du surnageant de *B. longum* 3, plusieurs tests *in vitro* pourraient être réalisés afin de compléter ce travail. Le surnageant pourrait être purifié par fractionnement, par ultrafiltration ou chromatographie/HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance), ce qui permettrait d'identifier la ou les molécules responsables de l'effet inhibiteur. Pour tester leur stabilité thermique, il serait intéressant d'étudier jusqu'à quelles températures ou durées l'activité est conservée (ex : 60 °C, 80 °C, 100 °C, et différentes durées) pour caractériser la robustesse du métabolite. De plus, le surnageant pourrait être prétraité par des protéases, nucléases ou lipases pour déterminer la nature du composé (peptidique ou acide organique modifié). Enfin, des tests avec différentes concentrations du surnageant pourraient être menés pour évaluer la cinétique d'inhibition (temps, seuil, effet seuil). Pour finir, une approche génomique et transcriptomique du surnageant de *B. longum 3* en condition de culture pourrait permettre d'identifier les gènes exprimés susceptibles de produire ou d'exporter le métabolite actif.

En outre, l'existence d'une diversité intra-espèce forte chez *B. longum* rend plausible que seul un sous-ensemble particulier soit capable de produire ce métabolite actif, ce qui concorde avec l'absence d'effet protecteur pour les autres souches testées. En effet, notre panel limité ne couvre pas entièrement la diversité des souches de *Bifidobacterium*, ce qui souligne l'importance de tester un panel élargi de souches pour comprendre l'étendue des effets inhibiteurs, en incluant plusieurs espèces et combinaisons, afin d'explorer les effets synergiques potentiels. De même, une analyse comparative des souches *B. longum* expérimentales des gènes du métabolisme secondaire pourrait permettre de dégager des candidats moléculaires responsables de cette inhibition spécifique.

D'autres mécanismes d'action, plutôt des effets indirects, ont largement été décrit chez *B. longum*. En effet, les souches de *Bifidobacterium* sont capables de produire des acides organiques comme l'acide acétique ou l'acide lactique. En particulier, l'acétate produit la souche *B. longum* subsp. *longum* T1 (BLLT1) entraine une acidification significative du milieu (pH 6,8 à 5,2) et une inhibition directe de la croissance des EP-BLSE (321). L'analyse du génome de BLLT1 a montré la présence de gènes de transporteurs de glucides de type ABC, qui sont responsables de la synthèse d'acide acétique qui est l'un des principaux produits terminaux du métabolisme glucidique des *Bifidobacterium*. L'acide lactique produit par la souche *B. longum* subsp. *longum* KCTC 3128 induit induisant une réduction du pH du

surnageant de culture et accentue l'effet inhibiteur sur *C. difficile* (322). De plus, les surnageants acellulaires de incluant *B. longum*, *L. acidophilus* et *B. bifidum*, ont montré une activité antibactérienne contre certains *E. coli* multirésistants (323). Le rôle des *Bifidobacterium* a largement été étudié dans le cadre de l'inhibition de la croissance des *C. difficile*. Le butyrate, qui n'est pas produit directement par *Bifidobacterium* mais dont il peut influencer sa concentration, peut inhiber la croissance de diverses souches de *C. difficile* en réduisant la concentration (321,324). En complément, les approches multi-omiques ont permis de mettre en évidence des mécanismes métaboliques précis entraînant un déficit énergétique et un stress protéique marqué, impliqués dans l'inhibition de la croissance de *C. difficile* (322). La déplétion intracellulaire en adénosine triphosphate (ATP) induite par l'acide acétique (perturbation du complexe Rnf) contribue directement à l'inhibition de la croissance de *C. difficile*. De plus, une réduction en nucléoside triphosphates (NTP) et de désoxyribo-nucléoside triphosphates (dNTP) inhibe la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction, entravant ainsi la prolifération de *C. difficile*. Enfin, *B. longum* induit un stress protéique à l'origine d'une régulation différentielle des protéines ribosomales et des régulateurs de la traduction, suggérant une inhibition de la synthèse protéique chez *C. difficile*.

D'autre part, la compétition pour les nutriments, notamment les fructo-oligosaccharides et les HMOs, constitue un autre levier d'action permettant à *B. longum* de limiter la croissance des pathogènes par privation nutritive ou métabolisme préférentiel. Des expériences de co-culture de *B. longum* et *B. breve* avec des fructo-oligosaccharides à chaîne courte ont montré une réduction significative de la croissance de *C. difficile*, avec une inhibition est souche- et substrat-spécifique (325). Enfin, *B. longum* contribue activement au maintien de l'intégrité et de la fonction de résistance à la colonisation. BLLT1 réduit l'expression de TLR4 induite par les EP-BLSE dans les entérocytes traduisant une diminution de la perméabilité paracellulaire et une atténuation de la réponse inflammatoire (321). Cela participe à la fonction de barrière intestinale contre la destruction cellulaire induite par les pathogènes. Pour finir, *B. longum* K5 joue également un rôle immuno-modulateur en atténuant l'élévation des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β) et prévient la réduction des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) (326).

Cependant, aucun effet inhibiteur n'a été mis en évidence lors des expériences de co-cultures entre les souches de *B. longum* et les *E. coli*, ce qui ne serait pas en faveur d'une compétition pour les nutriments ni par acidification par *B. longum* 3. Concernant la différence relative entre l'effet en co-culture et celui des surnageants, il est possible que l'effet observé en co-culture par contact direct ou compétition soit plus complexe : dans certaines phases, les interactions directes ou la compétition métabolique peuvent moduler l'effet du métabolite (par dilution,

inhibition croisée, induction, catabolisme ou neutralisation par *E. coli*). Ainsi, l'effet net dans la co-culture bactérienne peut être masqué ou atténué par ces interactions, ce qui expliquerait pourquoi seul l'effet des surnageants est visible. L'activité inhibitrice observée était de faible amplitude bien que significative statistiquement, en particulier en phase stationnaire, il est possible que le métabolite actif n'atteigne pas une concentration suffisante dans l'environnement de culture *in vitro* pour induire une inhibition forte, mais agit ici comme un effet modulatoire ou affaiblissant sur la croissance. Ce type d'effet subtil *in vitro* mais répétable pourrait néanmoins jouer un rôle *in vivo* au sein du microbiote intestinal sur le long terme, en contribuant à une pression cumulative contre des populations de *E. coli*.

Par ailleurs, malgré la forte diversité phylogénétique observée parmi les MAGs de *B. longum*, aucune répartition spécifique n'a été mise en évidence entre les souches isolées chez les deux groupes de voyageurs. Cette absence de structuration phylogénétique ne plaide pas en faveur des traits génomiques spécifiques conférant une capacité inhibitrice accrue. Toutefois, une autre limite de notre étude concerne la qualité des MAGs de *Bifidobacterium*, malgré l'utilisation conjointe des technologies de séquençage *short reads* et *long reads*. La couverture moyenne relativement faible, d'environ 30 % du génome reconstruit, a restreint la portée des analyses comparatives et fonctionnelles, notamment pour la caractérisation des voies métaboliques susceptibles d'être impliquées dans les interactions compétitives avec *E. coli*. Bien que la souche *B. longum* 3 soit phylogénétiquement située au sein d'un groupe de MAGs de *B. longum* identifiés chez les voyageurs éliminateurs, aucune association claire n'a pu être mise en évidence entre cette position phylogénétique et le statut d'élimination. L'effet inhibiteur observé semble plutôt corrélé à une abondance relative plus élevée de *B. longum* au sein du microbiote des voyageurs éliminateurs comme pour *B. adolescentis*. Cet effet paraît aussi dépendre de la souche, comme le suggère l'absence d'activité inhibitrice observée pour *B. longum* 2, aussi bien en co-culture qu'avec les surnageants, en phase exponentielle ou stationnaire. Il convient cependant de souligner que cette souche n'a pas encore été séquencée et n'a donc pas été positionnée dans l'arbre phylogénétique des *Bifidobacterium*, limitant l'interprétation de ces observations à ce stade. Par ailleurs, la grande hétérogénéité intraspécifique observée au sein du genre *Bifidobacterium*, et notamment chez *B. longum*, contraste avec le nombre limité de souches testées *in vitro*, ce qui suggère que nos observations ne reflètent probablement qu'une fraction de la variabilité biologique réelle. Des travaux antérieurs ont également montré que les effets bénéfiques des *Bifidobacterium* sur la croissance d'entéro-pathogènes résultent souvent d'un effet spécifique à une souche particulière (325).

A noter, l'absence de modèle *in vivo* constitue une limite importante. Si les observations *in vitro* permettent d'identifier des tendances et des mécanismes potentiels, elles ne reproduisent pas la complexité des interactions hôte–microbiote dans un environnement intestinal dynamique. Le modèle murin de colonisation intestinale permettrait de valider la pertinence physiologique des mécanismes identifiés, notamment la compétition entre *Bifidobacterium* et les souches de *E. coli* multirésistantes. Cela permettrait d'assurer une confirmation *in vivo* des effets observés ouvrirait des perspectives importantes. Elle pourrait notamment conduire au développement de probiotiques ciblés ou de métabolites dérivés de *Bifidobacterium* susceptibles de favoriser l'élimination des EMR et de contribuer à la restauration d'un microbiote intestinal sain chez les voyageurs.

3. Fond génétique des souches de *E. coli*

Nous avons observé que les phylogroupes B2, D et F étaient associés à un portage prolongé, ce qui est cohérent avec une étude précédente preuve de concept sur cette cohorte, ainsi qu'avec d'autres études sur les commensaux montrant que ces phylogroupes affichent une plus grande capacité de résidence, souvent liées à des gènes de virulence, notamment ceux impliqués dans les adhésines ou les systèmes d'acquisition de fer (234,327). La présence d'une souche dominante provenant de ces phylogroupes semble également corrélée à une durée plus longue de portage des EMR. En effet, ces souches appartenant aux phylogroupes B2 et D sont également associées à une plus grande capacité de colonisation intestinale, tandis que les phylogroupes A et B1 sont généralement plus transitoires (236,328,329). Dans une étude longitudinale du microbiote intestinal chez des voyageurs britanniques revenant de pays à haut risque pour l'acquisition d'EMR, les souches acquises lors du voyage appartenait le plus souvent aux phylogroupes A et B1, suggérant que la colonisation par *E. coli* dans l'intestin est souvent transitoire et que les souches ne sont plus détectées au-delà de 6 mois (330). Dans une étude ayant suivi 48 voyageurs britanniques avant et après leur voyage, une augmentation de l'abondance de *E. coli* a été observée au retour, positivement associée à l'acquisition initiale d'ARG. Les voyageurs étaient le plus souvent colonisés par des souches pathogènes de *E. coli*, incluant les entéro-pathogènes, entéro-agrégatifs, entéro-invasifs et entéro-toxinogènes. Les souches identifiées immédiatement après le voyage différaient phylogénétiquement de celles détectées six mois plus tard, ce qui suggère que les souches initialement acquises ont été éliminées au cours de cette période. En revanche, ni la virulence ni le phylogroupe spécifique des souches acquises ne semblaient contribuer directement à la persistance de certains gènes de résistance à six mois (330).

De nos expériences *in vitro*, nous n'avons pas observé d'interaction spécifique entre *B. adolescentis* 2 et *B. longum* 3 et des phylogroupes précis de *E. coli*, ce qui suggère que la durée de portage des EMR pourrait être gouvernée par deux types de mécanismes distincts : (i) la composition du microbiote (avec le rôle de *Bifidobacterium*) et (ii) des facteurs intrinsèques aux souches de *E. coli*, sans que les facteurs soient interdépendants (327).

Les souches isolées chez les voyageurs présentaient un nombre élevé de VAGs et appartenaient majoritairement aux phylogroupes B2 et D, comme cela a déjà été décrit dans la littérature. Bien que nous n'ayons pas observé de différence significative entre les deux groupes au moment du retour en ce qui concerne le nombre de VAGs identifié par souche de *E. coli*, il est important de souligner que la majorité des études publiées portent la comparaison de la virulence des souches avant et après le voyage (330). Cette approche diffère de la nôtre, puisque tous les voyageurs inclus avaient acquis une ou plusieurs EMR durant leur séjour. Notre objectif n'était donc pas d'évaluer l'acquisition de souches plus virulentes, mais plutôt d'identifier les facteurs associés à une élimination plus rapide de ces souches après le voyage. Le rôle des *Bifidobacterium* dans la modulation de la virulence des entérobactéries a déjà été décrit dans différents travaux. Une étude a montré qu'une souche spécifique, *B. longum* HY8001, présentait une activité neutralisante *in vitro* contre la véro-cytotoxine en s'y liant et pouvait moduler son expression en inhibant les gènes *stx1A* et *stx2A* des *E. coli* entérohémorragiques O157:H7 (331). Ce mécanisme a été bien décrit également avec *C. difficile* où *B. longum* est capable de réprimer la production de toxine A (*tcdA*) chez *C. difficile* en agissant sur le métabolisme de la proline et du rapport NAD^+/NADH.

Nos analyses ont mis en évidence le rôle des VAGs dans la persistance des souches de *E. coli*, en particulier deux familles de facteurs de virulence positivement corrélées à la persistance : les adhésines et les systèmes de captation du fer, qui conféraient à ces souches un avantage pour la colonisation durable dans l'intestin. En effet, le portage à long terme des *E. coli* BLSE est généralement attribué à l'acquisition de souches de *E. coli* appartenant à des clones épidémiques (par exemple, STc 131, 648) qui possèdent des facteurs génétiques de virulence (tels que des adhésines, des systèmes de capture du fer comme *fyuA*/*irp* et des toxines) leur conférant une meilleure adaptation et une compétitivité accrue au sein du microbiote intestinal de l'hôte (234,247,327). À l'inverse, la présence de gènes codant pour des toxines était associée à une élimination plus rapide des souches multirésistantes, comme évoqué ci-dessus.

De plus, un autre facteur de virulence que nous n'avons pas analysé est la capacité à former du biofilm. En effet, *B. longum* intervient activement dans l'inhibition significative de la

formation de biofilm par les *E. coli* multirésistantes (323,332). Cette activité anti-biofilm est cliniquement pertinente car elle pourrait rendre les pathogènes moins virulents.

Les voyages participent activement à la propagation mondiale de la résistance (206,209). Dans notre étude, le nombre d'ARGs moyen retrouvé au retour dans les souches des éliminateurs et des persistants était en moyenne de 8,5, sans différence significative retrouvée entre les deux groupes. De plus, aucune diminution significative du nombre d'ARGs n'a été observée jusqu'à 1 mois après le retour. Le maintien des ARGs en l'absence de pression antibiotique pourrait entraîner une sélection négative des clones hautement résistants et donc induire un coût biologique important. Des observations allant dans ce sens ont été rapportées chez *E. coli* dans des contextes de portage intestinal prolongé, *E. coli* pourrait réduire son nombre d'ARGs pour une meilleure adaptation métabolique au microbiote hôte (333).

Certaines données suggèrent que la prise de probiotiques pourrait limiter la propagation des gènes de résistance entre bactéries. En effet, nous avons observé des souches de *E. coli* à des temps supérieurs à un mois sans qu'elles soient identifiées au retour, suggérant un potentiel transfert d'ARGs de souches acquises durant le séjour à des bactéries de l'hôte. Une étude menée par Moubarek *et al.* sur des souris gnotobiotiques a révélé que l'administration de certaines souches de *Bifidobacterium* (*B. bifidum* et *B. pseudocatenulatum*) diminuait de manière significative le transfert de gènes de résistance aux β-lactamines (bla_{SHV-5} et $bla_{CTX-M-15}$) entre des souches d'entérobactéries (334). Ces observations ont été corroborées par d'autres travaux de démontrant que les surnageants de culture de *C. butyricum* inhibaient la conjugaison, le principal mécanisme de transfert des plasmides porteurs de gènes de résistance (307). Nous n'avons pas mis en évidence le rôle des ARGs en termes de nombre ou de type dans la persistance des souches de *E. coli* multirésistantes. Par ailleurs, dans l'étude de Moubarek *et al.*, l'inhibition était liée à *B. bifidum* et *B. pseudocatenulatum*. Nous avons identifié également *B. pseudocatenulatum* comme statistiquement associé à l'élimination. Il serait possible de tester spécifiquement *B. bifidum* et *B. pseudocatenulatum* contre l'apparition de souches de *E. coli* multirésistantes non retrouvées au retour, mais le faible nombre d'évènements dans notre cohorte limiterait les conclusions.

Pour aller plus loin dans le rôle des *Bifidobacterium* dans l'élimination des EMR, des études ont montré que les probiotiques pourraient être actifs *in vitro* ou dans des modèles expérimentaux, sans toutefois démontrer leur efficacité chez l'humain. L'étude de Dall *et al.* a montré l'inefficacité des probiotiques pour prévenir la colonisation par les bactéries multirésistantes dans un contexte de forte exposition (233). Cet essai contrôlé randomisé a testé la capacité de *L. rhamnosus* GG (LGG) à empêcher l'acquisition d'EP-BLSE chez des

voyageurs danois se rendant en Inde. Parmi les voyageurs non colonisés avant le départ, plus de 93 % l'étaient à leur retour et aucune différence statistiquement significative dans le taux de colonisation entre le groupe recevant le LGG et le groupe témoin. Plusieurs essais cliniques visant à tester la capacité des probiotiques à éradiquer une colonisation déjà établie par des BMR ont échoué à démontrer un bénéfice clinique clair (132,200,335). Dans une étude visant à évaluer la capacité d'un consortium bactérien (Vivomixx®, composé de souches de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* [dont *B. longum*]) à éradiquer le portage intestinal d'EP-BLSE a montré que seulement 12,5 % des participants ont obtenu une décolonisation après deux mois l'administration de probiotiques, contre 5 % dans le groupe placebo, sans atteindre la significativité statistique (336). L'étude de Wieërs *et al.* illustre la complexité des interactions probiotique-microbiote intestinal et la possibilité d'effets hautement spécifiques (337). Cette étude clinique randomisée et contrôlée par placebo a examiné si l'administration de probiotiques (mélange de *Saccharomyces*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*) pendant un traitement antibiotique (amoxicilline-acide clavulanique) en milieu hospitalier pouvait prévenir la colonisation du microbiote intestinal par des BMR. Les résultats ont démontré que le mélange probiotique entraînait une diminution significative de la colonisation par *Pseudomonas* et une augmentation des entérobactéries productrices de céphalosporinase AmpC après le traitement antibiotique. Ces résultats contradictoires au sein d'une même étude soulignent que les effets des probiotiques sont très spécifiques à la souche et dépendent fortement du contexte clinique (notamment de l'antibiotique co-administré). Un probiotique efficace contre une BMR peut être inefficace, voire délétère contre un autre. Une méta-analyse regroupant les données de quatorze essais cliniques a confirmé que les probiotiques ne sont pas significativement plus efficaces qu'un placebo pour l'éradication de la colonisation par des micro-organismes résistants aux antimicrobiens (338).

V. Conclusion

Nous avons, à travers une approche *in silico*, mis en évidence le rôle potentiel de *B. adolescentis* et *B. longum* dans l'élimination rapide des EMR, grâce à une analyse approfondie de la composition du microbiote intestinal chez 150 voyageurs appariés. Ces observations ont été confirmées par des expériences *in vitro* de compétition bactérienne en milieu liquide, révélant plusieurs mécanismes d'action possibles : un effet indirect, lié à l'acidification du milieu intestinal et à la compétition pour les nutriments, ainsi qu'un effet direct, probablement dû à la sécrétion d'un métabolite non enzymatique présentant une activité antimicrobienne. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour approfondir ces résultats. En particulier, le surnageant acellulaire devrait être étudié afin de caractériser plus précisément le (ou les) métabolite(s), tandis que des expériences *in vivo*, menées dans un modèle expérimental murin de colonisation intestinale, permettraient de confirmer le rôle de ces souches dans la résistance à la colonisation. Par ailleurs, des analyses métabolomiques et protéomiques, réalisées en parallèle des tests de compétition bactérienne, contribueraient à identifier des voies métaboliques et des gènes impliqués dans l'élimination rapide des EMR. En complément, l'analyse génomique des souches de *E. coli* multirésistantes a confirmé que la présence de certains facteurs de virulence, notamment les adhésines et les systèmes de capture du fer, est associée à leur persistance au sein du microbiote intestinal.

Ainsi, nos travaux mettent en évidence plusieurs déterminants associés à la persistance des souches multirésistantes, combinant à la fois un effet protecteur du microbiote, en particulier le rôle bénéfique des *Bifidobacterium* et des caractéristiques intrinsèques des souches de *E. coli*, telles que certains facteurs de virulence, susceptibles de favoriser leur adaptation et leur maintien au sein du microbiote intestinal.

Bibliographie

1. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. The Lancet Infectious Diseases. janv 2019;19(1):56-66.
2. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. févr 2022;399(10325):629-55.
3. Naghavi M, Vollset SE, Ikuta KS, Swetschinski LR, Gray AP, Wool EE, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. The Lancet. 28 sept 2024;404(10459):1199-226.
4. Adebisi YA, Ogunkola IO. The global antimicrobial resistance response effort must not exclude marginalised populations. Trop Med Health. 7 juin 2023;51:33.
5. Bennett C, Russel W, Upton R, Frey F, Taye B. Social and ecological determinants of antimicrobial resistance in Africa: a systematic review of epidemiological evidence. Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology. janv 2024;4(1):e119.
6. Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S, Laxminarayan R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. The Lancet Planetary Health. 1 sept 2018;2(9):e398-405.
7. Okeke IN, Kraker MEA de, Boeckel TPV, Kumar CK, Schmitt H, Gales AC, et al. The scope of the antimicrobial resistance challenge. The Lancet. 1 juin 2024;403(10442):2426-38.
8. Mishra A, Dwivedi R, Faure K, Morgan DJ, Cohn J. Estimated undertreatment of carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections in eight low-income and middle-income countries: a modelling study. Lancet Infect Dis. sept 2025;25(9):1011-9.
9. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev. oct 2013;26(4):744-58.
10. Bezabih YM, Sabiiti W, Alamneh E, Bezabih A, Peterson GM, Bezabhe WM, et al. The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. J Antimicrob Chemother. 1 janv 2021;76(1):22-9.
11. Lai CC, Lee K, Xiao Y, Ahmad N, Veeraraghavan B, Thamlikitkul V, et al. High burden of antimicrobial drug resistance in Asia. J Glob Antimicrob Resist. sept 2014;2(3):141-7.
12. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. oct 2006;9(5):466-75.
13. Carlet J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance [Internet]. 2012 [cité 11 oct 2025]. Disponible sur: https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2047-2994-1-39
14. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. Clin Infect Dis. 15 juill 2004;39(2):219-26.
15. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. The Lancet Infectious Diseases. 1 mars 2008;8(3):159-66.
16. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* - Volume 17, Number 10—October 2011 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. oct 2011 [cité 11 oct 2025]; Disponible sur: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/10/11-0655_article
17. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, ECDC, 2022 [Internet]. [cité 11 oct 2025]. Disponible sur: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Nov2023-ECDC-WHO-Executive-Summary.pdf

18. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. The Lancet Infectious Diseases. 1 févr 2017;17(2):153-63.

19. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019 nov [cité 11 oct 2025]. Disponible sur: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532

20. Mitchell R, Mataseje L, Cayen J, McGill E, Cannon K, Davis I, et al. The evolving epidemiology of Carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Canadian acute care facilities, 2010–2023. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 12 juill 2025;14(1):88.

21. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet Infectious Diseases. 1 sept 2010;10(9):597-602.

22. Zowawi HM, Harris PNA, Roberts MJ, Tambyah PA, Schembri MA, Pezzani MD, et al. The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. Nat Rev Urol. oct 2015;12(10):570-84.

23. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases. 1 juin 2010;10(6):417-32.

24. Woerther PL, Andremont A, Kantele A. Travel-acquired ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: impact of colonization at individual and community level. J Travel Med. 1 avr 2017;24(suppl_1):S29-34.

25. Habib A, Lo S, Villageois-Tran K, Petitjean M, Malik SA, Armand-Lefèvre L, et al. Dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacterale*s in the community of Rawalpindi, Pakistan. PLOS ONE. 8 juill 2022;17(7):e0270707.

26. Proia L, Anzil A, Borrego C, Farrè M, Llorca M, Sanchis J, et al. Occurrence and persistence of carbapenemases genes in hospital and wastewater treatment plants and propagation in the receiving river. Journal of Hazardous Materials. 15 sept 2018;358:33-43.

27. Zhang L, Ma X, Luo L, Hu N, Duan J, Tang Z, et al. The Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum β-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Bacteria from Hospital Sewage, Treated Effluents and Receiving Rivers. International Journal of Environmental Research and Public Health. janv 2020;17(4):1183.

28. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, et al. Comparing the Outcomes of Patients With Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Bacteremia. Clin Infect Dis. 1 févr 2017;64(3):257-64.

29. Ahn JY, Ahn SM, Kim JH, Jeong SJ, Ku NS, Choi JY, et al. Clinical Characteristics and Associated Factors for Mortality in Patients with Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Bloodstream Infection. Microorganisms. mai 2023;11(5):1121.

30. van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1 févr 2013;75(2):115-20.

31. Yahav D, Giske CG, Grāmatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β-Lactam-β-Lactamase Inhibitor Combinations. Clin Microbiol Rev. 16 déc 2020;34(1):e00115-20.

32. Patricia Lepage. Analyses et composition du microbiote intestinal [Internet]. 2017 [cité 11 oct 2025].

33. Lagier JC, Million M, Hugon P, Armougom F, Raoult D. Human Gut Microbiota: Repertoire and Variations. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2 nov 2012 [cité 11 oct 2025];2. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2012.00136/full

34. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. Clin Microbiol Rev. janv 2015;28(1):237-64.

35. Lagier JC, Dubourg G, Million M, Cadoret F, Bilen M, Fenollar F, et al. Culturing the human microbiota and culturomics. Nat Rev Microbiol. 1 mai 2018;16:540-50.
36. Diakite A, Dubourg G, Dione N, Afouda P, Bellali S, Ngom II, et al. Optimization and standardization of the culturomics technique for human microbiome exploration. Sci Rep. 15 juin 2020;10(1):9674.
37. Pribyl AL, Hugenholtz P, Cooper MA. A decade of advances in human gut microbiome-derived biotherapeutics. Nat Microbiol. févr 2025;10(2):301-12.
38. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl Environ Microbiol. nov 1999;65(11):4799-807.
39. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 13 juin 2012;486(7402):207-14.
40. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. Nucleic Acids Res. déc 2010;38(22):e200.
41. Szychowiak P, Villageois-Tran K, Patrier J, Timsit JF, Ruppé É. The role of the microbiota in the management of intensive care patients. Ann Intensive Care. 5 janv 2022;12(1):3.
42. Segerman B. The Most Frequently Used Sequencing Technologies and Assembly Methods in Different Time Segments of the Bacterial Surveillance and RefSeq Genome Databases. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 19 oct 2020 [cité 11 oct 2025];10. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.527102/full
43. Krakau S, Straub D, Gourlé H, Gabernet G, Nahnsen S. nf-core/mag: a best-practice pipeline for metagenome hybrid assembly and binning. NAR Genom Bioinform. mars 2022;4(1):lqac007.
44. Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, Stahl SE, Rubins KH, McIntyre ABR, et al. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. Sci Rep. 21 déc 2017;7(1):18022.
45. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. Microb Genom. oct 2017;3(10):e000132.
46. Jin H, You L, Zhao F, Li S, Ma T, Kwok LY, et al. Hybrid, ultra-deep metagenomic sequencing enables genomic and functional characterization of low-abundance species in the human gut microbiome. Gut Microbes. 2022;14(1):2021790.
47. Zhang Z, Liu T, Li X, Ye Q, Bangash HI, Zheng J, et al. Metagenome-assembled genomes reveal carbohydrate degradation and element metabolism of microorganisms inhabiting Tengchong hot springs, China. Environ Res. 1 déc 2023;238(Pt 1):117144.
48. Panda A, Islam ST, Sharma G. Harmonizing Prokaryotic Nomenclature: Fixing the Fuss over Phylum Name Flipping. mBio. 28 juin 2022;13(3):e0097022.
49. Mondot S, Lepage P. The human gut microbiome and its dysfunctions through the meta-omics prism. Ann N Y Acad Sci. mai 2016;1372(1):9-19.
50. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nat Biotechnol. sept 2017;35(9):833-44.
51. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 4 mars 2010;464(7285):59-65.
52. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. juill 2006;7(7):688-93.
53. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 10 juin 2005;308(5728):1635-8.
54. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLOS Biology. 19 août 2016;14(8):e1002533.

55. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. Gut. nov 2008;57(11):1605-15.
56. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. Nature. 12 mai 2011;473(7346):174-80.
57. Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower C. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. Nat Methods. 10 juin 2012;9(8):811-4.
58. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottière HM, Raes J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. Gut. janv 2013;62(1):146-58.
59. McCallum G, Tropini C. The gut microbiota and its biogeography. Nat Rev Microbiol. févr 2024;22(2):105-18.
60. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. oct 2012;9(10):577-89.
61. Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. Appl Environ Microbiol. oct 2001;67(10):4939-42.
62. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. J Clin Microbiol. juill 2005;43(7):3380-9.
63. Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. Gastroenterology. nov 2014;147(5):1055-1063.e8.
64. Lepage P, Seksik P, Sutren M, de la Cochetière MF, Jian R, Marteau P, et al. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. Inflamm Bowel Dis. mai 2005;11(5):473-80.
65. Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol Ecol. 1 oct 2005;54(2):219-31.
66. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 4 mars 2010;464(7285):59-65.
67. Landman C, Quévrain E. [Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]. Rev Med Interne. juin 2016;37(6):418-23.
68. Acharya VV, Pedersen LH, Philippon T, Richardson M. Measuring Systemic Risk. Rev Financ Stud. 1 janv 2017;30(1):2-47.
69. Almeida A, Nayfach S, Boland M, Strozzi F, Beracochea M, Shi ZJ, et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. Nat Biotechnol. janv 2021;39(1):105-14.
70. Vanhoutte T, Huys G, Brandt E, Swings J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. FEMS Microbiol Ecol. 1 juin 2004;48(3):437-46.
71. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. Cell Host Microbe. 15 nov 2012;12(5):611-22.
72. Bonnin A, Dalle F. Importance des micromycètes dans le microbiote intestinal : le modèle *Candida albicans.* Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. sept 2018;202(7):1401-12.
73. Rubel MA, Abbas A, Taylor LJ, Connell A, Tanes C, Bittinger K, et al. Lifestyle and the presence of helminths is associated with gut microbiome composition in Cameroonians. Genome Biol. 25 mai 2020;21(1):122.
74. Coelho LP, Alves R, Del Río ÁR, Myers PN, Cantalapiedra CP, Giner-Lamia J, et al. Towards the biogeography of prokaryotic genes. Nature. janv 2022;601(7892):252-6.

75. Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. Nat Microbiol. janv 2018;3(1):8-16.
76. Tap J, Lejzerowicz F, Cotillard A, Pichaud M, McDonald D, Song SJ, et al. Global branches and local states of the human gut microbiome define associations with environmental and intrinsic factors. Nat Commun. 20 juin 2023;14(1):3310.
77. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. BMJ. 13 juin 2018;361:k2179.
78. Liu H, Wang J, He T, Becker S, Zhang G, Li D, et al. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? Adv Nutr. 1 janv 2018;9(1):21-9.
79. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. Front Microbiol. 2016;7:185.
80. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. Eur J Nutr. févr 2018;57(1):1-24.
81. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. Front Microbiol. 2016;7:185.
82. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. Nat Commun. 29 avr 2014;5:3611.
83. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2 nov 2004;101(44):15718-23.
84. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes. Front Genet. 2015;6:148.
85. Portune KJ, Beaumont M, Davila AM, Tomé D, Blachier F, Sanz Y. Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. Trends in Food Science & Technology. 1 nov 2016;57:213-32.
86. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. Cell Host Microbe. 13 juin 2018;23(6):716-24.
87. Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. Nature. juin 2019;570(7762):462-7.
88. Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. Rev Endocr Metab Disord. déc 2019;20(4):461-72.
89. Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, Okafor CD, Patterson AD. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. Nat Rev Microbiol. avr 2023;21(4):236-47.
90. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. Cell Res. juin 2020;30(6):492-506.
91. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol. juin 2004;4(6):478-85.
92. Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. FEMS Microbiol Lett. 17 déc 2002;217(2):133-9.
93. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. Immunity. 16 oct 2009;31(4):677-89.
94. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. Science. 21 janv 2011;331(6015):337-41.
95. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science. 2 août 2013;341(6145):569-73.

96. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. Med Mal Infect. janv 2014;44(1):1-8.
97. Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? Gut. déc 2020;69(12):2232-43.
98. Maciel-Fiuza MF, Muller GC, Campos DMS, do Socorro Silva Costa P, Peruzzo J, Bonamigo RR, et al. Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases. Front Microbiol. 2023;14:1098386.
99. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. Nat Rev Immunol. nov 2013;13(11):790-801.
100. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. Immunol Rev. sept 2017;279(1):90-105.
101. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. Nature. janv 2015;517(7533):205-8.
102. Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Sušac B, Miller L, et al. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium.* Cell Host Microbe. 10 mai 2017;21(5):592-602.e4.
103. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. Physiol Rev. 1 oct 2019;99(4):1877-2013.
104. Aburto MR, Cryan JF. Gastrointestinal and brain barriers: unlocking gates of communication across the microbiota-gut-brain axis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. avr 2024;21(4):222-47.
105. Shabani M, Ghoshehy A, Mottaghi AM, Chegini Z, Kerami A, Shariati A, et al. The relationship between gut microbiome and human diseases: mechanisms, predisposing factors and potential intervention. Front Cell Infect Microbiol. 2025;15:1516010.
106. Spencer NJ, Hu H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. juin 2020;17(6):338-51.
107. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. Brain Res. 15 août 2018;1693(Pt B):128-33.
108. Barandouzi ZA, Lee J, Del Carmen Rosas M, Chen J, Henderson WA, Starkweather AR, et al. Associations of neurotransmitters and the gut microbiome with emotional distress in mixed type of irritable bowel syndrome. Sci Rep. 31 janv 2022;12(1):1648.
109. Kaelberer MM, Buchanan KL, Klein ME, Barth BB, Montoya MM, Shen X, et al. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. Science. 21 sept 2018;361(6408):eaat5236.
110. Valles-Colomer M, Falony G, Darzi Y, Tigchelaar EF, Wang J, Tito RY, et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. Nat Microbiol. avr 2019;4(4):623-32.
111. Xu R, Wu B, Liang J, He F, Gu W, Li K, et al. Altered gut microbiota and mucosal immunity in patients with schizophrenia. Brain Behav Immun. mars 2020;85:120-7.
112. Morton JT, Jin DM, Mills RH, Shao Y, Rahman G, McDonald D, et al. Multi-level analysis of the gut-brain axis shows autism spectrum disorder-associated molecular and microbial profiles. Nat Neurosci. juill 2023;26(7):1208-17.
113. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. Gut. févr 2006;55(2):205-11.
114. Doré J, Corthier G. [The human intestinal microbiota]. Gastroenterol Clin Biol. sept 2010;34 Suppl 1:S7-15.
115. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut. janv 2004;53(1):1-4.
116. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis. mai 2012;18(5):968-84.

117. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell. 16 mars 2012;148(6):1258-70.
118. Sartor RB. The intestinal microbiota in inflammatory bowel diseases. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2014;79:29-39.
119. Belizário JE, Faintuch J. Microbiome and Gut Dysbiosis. Exp Suppl. 2018;109:459-76.
120. Pascal V, Pozuelo M, Borruel N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. Gut. mai 2017;66(5):813-22.
121. Caruso R, Lo BC, Núñez G. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. juill 2020;20(7):411-26.
122. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. Gut. févr 2006;55(2):205-11.
123. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. Inflamm Bowel Dis. août 2009;15(8):1183-9.
124. Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, Zhang F, Liu Q, Li AY, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. Gut. avr 2021;70(4):698-706.
125. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. Int J Obes (Lond). nov 2008;32(11):1720-4.
126. Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. Am J Clin Nutr. juill 2011;94(1):58-65.
127. Schwiertz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. Obesity (Silver Spring). janv 2010;18(1):190-5.
128. de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. Gut. mai 2022;71(5):1020-32.
129. Van Hul M, Cani PD. The gut microbiota in obesity and weight management: microbes as friends or foe? Nat Rev Endocrinol. mai 2023;19(5):258-71.
130. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. Nature. 4 oct 2012;490(7418):55-60.
131. Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol. oct 2001;108(4):516-20.
132. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 7 avr 2001;357(9262):1076-9.
133. Sjögren YM, Jenmalm MC, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. Clin Exp Allergy. avr 2009;39(4):518-26.
134. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, Stelma F, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. Gut. mai 2007;56(5):661-7.
135. van Nimwegen M, Speelman AD, Hofman-van Rossum EJM, Overeem S, Deeg DJH, Borm GF, et al. Physical inactivity in Parkinson's disease. J Neurol. déc 2011;258(12):2214-21.
136. Valles-Colomer M, Falony G, Darzi Y, Tigchelaar EF, Wang J, Tito RY, et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. Nat Microbiol. avr 2019;4(4):623-32.
137. Mulak A, Bonaz B. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease. World J Gastroenterol. 7 oct 2015;21(37):10609-20.

138. Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, Wissemann WT, Lewis MR, Wallen ZD, et al. Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. Mov Disord. mai 2017;32(5):739-49.
139. Wallen ZD, Demirkan A, Twa G, Cohen G, Dean MN, Standaert DG, et al. Metagenomics of Parkinson's disease implicates the gut microbiome in multiple disease mechanisms. Nat Commun. 15 nov 2022;13(1):6958.
140. Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. Parkinsonism Relat Disord. nov 2016;32:66-72.
141. Zhao Y, Lukiw WJ. Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD). J Nat Sci. juill 2015;1(7):e138.
142. Minter MR, Zhang C, Leone V, Ringus DL, Zhang X, Oyler-Castrillo P, et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. Sci Rep. 21 juill 2016;6:30028.
143. Cowan CSM, Dinan TG, Cryan JF. Annual Research Review: Critical windows - the microbiota-gut-brain axis in neurocognitive development. J Child Psychol Psychiatry. mars 2020;61(3):353-71.
144. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WHM, Roelofs R, Boleij A, et al. Towards the Human Colorectal Cancer Microbiome. PLOS ONE. 24 mai 2011;6(5):e20447.
145. Hamada T, Zhang X, Mima K, Bullman S, Sukawa Y, Nowak JA, et al. *Fusobacterium nucleatum* in Colorectal Cancer Relates to Immune Response Differentially by Tumor Microsatellite Instability Status. Cancer Immunol Res. nov 2018;6(11):1327-36.
146. Zeller G, Tap J, Voigt AY, Sunagawa S, Kultima JR, Costea PI, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. Mol Syst Biol. 28 nov 2014;10(11):766.
147. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. Science. 27 nov 2015;350(6264):1079-84.
148. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. Science. 5 janv 2018;359(6371):91-7.
149. Wang X, Fang Y, Liang W, Wong CC, Qin H, Gao Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* facilitates anti-PD-1 therapy in microsatellite stable colorectal cancer. Cancer Cell. 14 oct 2024;42(10):1729-1746.e8.
150. Wang J, Chen Q, Shan Q, Liang T, Forde P, Zheng L. Clinical development of immuno-oncology therapeutics. Cancer Lett. 1 mai 2025;617:217616.
151. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE, et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. Pediatr Res. juill 2003;54(1):8-14.
152. Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? Pediatr Res. janv 2006;59(1):96-101.
153. Lindberg E, Adlerberth I, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, Aberg N, et al. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. J Clin Microbiol. févr 2004;42(2):530-4.
154. Sprockett D, Fukami T, Relman DA. Role of priority effects in the early-life assembly of the gut microbiota. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. avr 2018;15(4):197-205.
155. Gschwind R, Fournier T, Butel MJ, Wydau-Dematteis S. Établissement du microbiote - Une colonisation in utero déterminante pour la santé future ? Med Sci (Paris). 1 avr 2018;34(4):331-7.
156. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr. juill 2010;51(1):77-84.

157. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. Trends Mol Med. févr 2015;21(2):109-17.
158. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. Nature. oct 2018;562(7728):583-8.
159. Roswall J, Olsson LM, Kovatcheva-Datchary P, Nilsson S, Tremaroli V, Simon MC, et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. Cell Host Microbe. 12 mai 2021;29(5):765-776.e3.
160. Martin Rosique R, Langella P, Chatel JM. Microbiote et vieillissement. Innovations Agronomiques. 2018;65:55-66.
161. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci U S A. 29 juin 2010;107(26):11971-5.
162. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. CMAJ. 19 mars 2013;185(5):385-94.
163. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. Trends Mol Med. févr 2015;21(2):109-17.
164. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. Nat Med. mars 2016;22(3):250-3.
165. Cunnington AJ, Sim K, Deierl A, Kroll JS, Brannigan E, Darby J. « Vaginal seeding » of infants born by caesarean section. BMJ. 23 févr 2016;352:i227.
166. Knol J, Scholtens P, Kafka C, Steenbakkers J, Gro S, Helm K, et al. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr. janv 2005;40(1):36-42.
167. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. PLoS Biol. juill 2007;5(7):e177.
168. Gale C, Logan KM, Santhakumaran S, Parkinson JRC, Hyde MJ, Modi N. Effect of breastfeeding compared with formula feeding on infant body composition: a systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr. mars 2012;95(3):656-69.
169. Innis SM. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. Proc Nutr Soc. août 2007;66(3):397-404.
170. Masi AC, Stewart CJ. Untangling human milk oligosaccharides and infant gut microbiome. iScience. 21 janv 2022;25(1):103542.
171. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. Nature. 8 mars 2018;555(7695):210-5.
172. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature. 22 janv 2009;457(7228):480-4.
173. Delzenne NM, Cani PD. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. Annu Rev Nutr. 21 août 2011;31:15-31.
174. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature. 9 mai 2012;486(7402):222-7.
175. Rytter H, Naimi S, Wu G, Lewis J, Duquesnoy M, Vigué L, et al. In vitro microbiota model recapitulates and predicts individualised sensitivity to dietary emulsifier. Gut. 7 avr 2025;74(5):761-74.
176. Karl JP, Margolis LM, Madslien EH, Murphy NE, Castellani JW, Gundersen Y, et al. Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 1 juin 2017;312(6):G559-71.

177. Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE, et al. *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. Pediatr Res. juill 2003;54(1):8-14.

178. Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegård IL, et al. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? Pediatr Res. janv 2006;59(1):96-101.

179. Koren O, Knights D, Gonzalez A, Waldron L, Segata N, Knight R, et al. A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. PLoS Comput Biol. 2013;9(1):e1002863.

180. Capuco A, Urits I, Hasoon J, Chun R, Gerald B, Wang JK, et al. Current Perspectives on Gut Microbiome Dysbiosis and Depression. Adv Ther. avr 2020;37(4):1328-46.

181. Woerther PL, Lepeule R, Burdet C, Decousser JW, Ruppé É, Barbier F. Carbapenems and alternative β-lactams for the treatment of infections due to extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae:* What impact on intestinal colonisation resistance? Int J Antimicrob Agents. déc 2018;52(6):762-70.

182. de Gunzburg J, Ghozlane A, Ducher A, Le Chatelier E, Duval X, Ruppé E, et al. Protection of the Human Gut Microbiome From Antibiotics. J Infect Dis. 30 janv 2018;217(4):628-36.

183. d'Humières C, Delavy M, Alla L, Ichou F, Gauliard E, Ghozlane A, et al. Perturbation and resilience of the gut microbiome up to 3 months after β-lactams exposure in healthy volunteers suggest an important role of microbial β-lactamases. Microbiome. 12 mars 2024;12(1):50.

184. Vollaard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. Antimicrob Agents Chemother. mars 1994;38(3):409-14.

185. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. N Engl J Med. 28 déc 2000;343(26):1925-32.

186. Ruppé E, Lixandru B, Cojocaru R, Büke C, Paramythiotou E, Angebault C, et al. Relative fecal abundance of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* strains and their occurrence in urinary tract infections in women. Antimicrob Agents Chemother. sept 2013;57(9):4512-7.

187. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae:* the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. Clin Microbiol Infect. mai 2015;21(5):470.e1-7.

188. de Lastours V, Chopin D, Jacquier H, d'Humières C, Burdet C, Chau F, et al. Prospective Cohort Study of the Relative Abundance of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the Gut of Patients Admitted to Hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 21 oct 2016;60(11):6941-4.

189. Stoma I, Littmann ER, Peled JU, Giralt S, van den Brink MRM, Pamer EG, et al. Compositional Flux Within the Intestinal Microbiota and Risk for Bloodstream Infection With Gram-negative Bacteria. Clin Infect Dis. 6 déc 2021;73(11):e4627-35.

190. Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. Med Mal Infect. janv 2014;44(1):1-8.

191. FAO/WHO Expert Consultation. Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria [Internet]. 2001 [cité 12 oct 2025]. Disponible sur: https://openknowledge.fao.org/items/db384295-64d9-47e2-b65b-3c918efc5140

192. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. Gut Microbes. 4 mars 2017;8(2):172-84.

193. Al Nabhani Z, Dulauroy S, Marques R, Cousu C, Al Bounny S, Déjardin F, et al. A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. Immunity. 21 mai 2019;50(5):1276-1288.e5.

194. Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. Cell. 20 oct 2006;127(2):423-33.
195. Dinh A, Bouchand F, Le Monnier A. [Current treatment and epidemiology of Clostridium difficile infections]. Rev Med Interne. sept 2015;36(9):596-602.
196. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. N Engl J Med. 31 janv 2013;368(5):407-15.
197. Feuerstadt P, Louie TJ, Lashner B, Wang EEL, Diao L, Bryant JA, et al. SER-109, an Oral Microbiome Therapy for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. N Engl J Med. 20 janv 2022;386(3):220-9.
198. Khanna S, Yoho D, Van Handel D, Clark BJ, Awad T, Guthmueller B, et al. Safety and effectiveness of fecal microbiota, live-jslm (REBYOTA®) administered by colonoscopy for prevention of recurrent *Clostridioides difficile* infection: 8-week results from CDI-SCOPE, a single-arm, phase IIIb trial. Therap Adv Gastroenterol. 2025;18:17562848251339697.
199. Mullard A. FDA approves second microbiome-based C. difficile therapy. Nat Rev Drug Discov. juin 2023;22(6):436.
200. Louie T, Golan Y, Khanna S, Bobilev D, Erpelding N, Fratazzi C, et al. VE303, a Defined Bacterial Consortium, for Prevention of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 25 avr 2023;329(16):1356-66.
201. Malard F, Thepot S, Cluzeau T, Carré M, Lebon D, Bories P, et al. Gut microbiota restoration with oral pooled fecal microbiotherapy after intensive chemotherapy: the phase 1b CIMON trial. Blood Adv. 10 avr 2025;9(15):3739-49.
202. Riddle MS, Connor BA. The Traveling Microbiome. Curr Infect Dis Rep. sept 2016;18(9):29.
203. Zhao Y, Li C, Wu K, Chen H, Wang Q, Xiao Y, et al. Exploring the Impact of Short Term Travel on Gut Microbiota and Probiotic Bacteria Mediated Stability. Biomedicines. 21 juin 2024;12(7):1378.
204. Youmans BP, Ajami NJ, Jiang ZD, Campbell F, Wadsworth WD, Petrosino JF, et al. Characterization of the human gut microbiome during travelers' diarrhea. Gut Microbes. 2015;6(2):110-9.
205. Rasko DA. Changes in microbiome during and after travellers' diarrhea: what we know and what we do not. J Travel Med. 1 avr 2017;24(suppl_1):S52-6.
206. Langelier C, Graves M, Kalantar K, Caldera S, Durrant R, Fisher M, et al. Microbiome and Antimicrobial Resistance Gene Dynamics in International Travelers. Emerg Infect Dis. juill 2019;25(7):1380-3.
207. Pires J, Kraemer JG, Kuenzli E, Kasraian S, Tinguely R, Hatz C, et al. Gut microbiota dynamics in travelers returning from India colonized with extended-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*: A longitudinal study. Travel Med Infect Dis. 2019;27:72-80.
208. Kampmann C, Dicksved J, Engstrand L, Rautelin H. Changes to human faecal microbiota after international travel. Travel Med Infect Dis. 2021;44:102199.
209. Worby CJ, Sridhar S, Turbett SE, Becker MV, Kogut L, Sanchez V, et al. Gut microbiome perturbation, antibiotic resistance, and *Escherichia coli* strain dynamics associated with international travel: a metagenomic analysis. Lancet Microbe. oct 2023;4(10):e790-9.
210. Leo S, Lazarevic V, Gaïa N, Estellat C, Girard M, Matheron S, et al. The intestinal microbiota predisposes to traveler's diarrhea and to the carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* after traveling to tropical regions. Gut Microbes. 2019;10(5):631-41.
211. Tamanai-Shacoori Z, Smida I, Bousarghin L, Loreal O, Meuric V, Fong SB, et al. *Roseburia spp.*: a marker of health? Future Microbiol. févr 2017;12:157-70.
212. Ma C, Wasti S, Huang S, Zhang Z, Mishra R, Jiang S, et al. The gut microbiome stability is altered by probiotic ingestion and improved by the continuous supplementation of galactooligosaccharide. Gut Microbes. 9 nov 2020;12(1):1785252.

213. Leylabadlo HE, Ghotaslou R, Feizabadi MM, Farajnia S, Moaddab SY, Ganbarov K, et al. The critical role of Faecalibacterium prausnitzii in human health: An overview. Microb Pathog. déc 2020;149:104344.
214. Song L, Sun Q, Zheng H, Zhang Y, Wang Y, Liu S, et al. Roseburia hominis Alleviates Neuroinflammation via Short-Chain Fatty Acids through Histone Deacetylase Inhibition. Mol Nutr Food Res. sept 2022;66(18):e2200164.
215. Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJM, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of Fusobacterium prausnitzii, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii gen. nov., comb. nov.* Int J Syst Evol Microbiol. nov 2002;52(Pt 6):2141-6.
216. Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. Dig Dis Sci. déc 1996;41(12):2477-81.
217. Kuenzli E. Antibiotic resistance and international travel: Causes and consequences. Travel Med Infect Dis. 2016;14(6):595-8.
218. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, et al. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* After Travel to the Tropics. Clin Infect Dis. 15 août 2015;61(4):593-600.
219. Tängdén T, Cars O, Melhus A, Löwdin E. Foreign travel is a major risk factor for colonization with *Escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases: a prospective study with Swedish volunteers. Antimicrob Agents Chemother. sept 2010;54(9):3564-8.
220. Lübbert C, Straube L, Stein C, Makarewicz O, Schubert S, Mössner J, et al. Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in international travelers returning to Germany. Int J Med Microbiol. janv 2015;305(1):148-56.
221. Peirano G, Gregson DB, Kuhn S, Vanderkooi OG, Nobrega DB, Pitout JDD. Rates of colonization with extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Canadian travellers returning from South Asia: a cross-sectional assessment. CMAJ Open. 13 déc 2017;5(4):E850-5.
222. Kantele A, Kuenzli E, Dunn SJ, Dance DAB, Newton PN, Davong V, et al. Dynamics of intestinal multidrug-resistant bacteria colonisation contracted by visitors to a high-endemic setting: a prospective, daily, real-time sampling study. Lancet Microbe. avr 2021;2(4):e151-8.
223. Madara JL, Nash S, Moore R, Atisook K. Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. Monogr Pathol. 1990;(31):306-24.
224. Natividad JMM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. Pharmacol Res. mars 2013;69(1):42-51.
225. Bäumler AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. Nature. 7 juill 2016;535(7610):85-93.
226. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Exp Mol Med. 16 août 2018;50(8):1-9.
227. Le Guern R, Stabler S, Gosset P, Pichavant M, Grandjean T, Faure E, et al. Colonization resistance against multi-drug-resistant bacteria: a narrative review. J Hosp Infect. déc 2021;118:48-58.
228. Kampmann C, Dicksved J, Engstrand L, Rautelin H. Composition of human faecal microbiota in resistance to *Campylobacter i*nfection. Clin Microbiol Infect. janv 2016;22(1):61.e1-61.e8.
229. Thiemann S, Smit N, Strowig T. Antibiotics and the Intestinal Microbiome : Individual Responses, Resilience of the Ecosystem, and the Susceptibility to Infections. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:123-46.
230. Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. Nat Microbiol. nov 2018;3(11):1255-65.

231. Chung The H, Le SNH. Dynamic of the human gut microbiome under infectious diarrhea. Curr Opin Microbiol. avr 2022;66:79-85.
232. Kantele A, Lääveri T, Mero S, Vilkman K, Pakkanen SH, Ollgren J, et al. Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Infect Dis. 15 mars 2015;60(6):837-46.
233. Dall LB, Lausch KR, Gedebjerg A, Fuursted K, Storgaard M, Larsen CS. Do probiotics prevent colonization with multi-resistant Enterobacteriaceae during travel? A randomized controlled trial. Travel Med Infect Dis. 2019;27:81-6.
234. Armand-Lefèvre L, Rondinaud E, Desvillechabrol D, Mullaert J, Clermont O, Petitjean M, et al. Dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacterales* colonization in long-term carriers following travel abroad. Microb Genom. juill 2021;7(7):000576.
235. Arcilla MS, van Hattem JM, Haverkate MR, Bootsma MCJ, van Genderen PJJ, Goorhuis A, et al. Import and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. The Lancet Infectious Diseases. janv 2017;17(1):78-85.
236. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. mars 2010;8(3):207-17.
237. Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells. Microbes Infect. mars 2006;8(3):834-40.
238. Nowrouzian FL, Ostblom AE, Wold AE, Adlerberth I. Phylogenetic group B2 *Escherichia coli* strains from the bowel microbiota of Pakistani infants carry few virulence genes and lack the capacity for long-term persistence. Clin Microbiol Infect. mai 2009;15(5):466-72.
239. Nowrouzian FL, Wold AE, Adlerberth I. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. J Infect Dis. 1 avr 2005;191(7):1078-83.
240. Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Spanjaard L. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. J Infect Dis. 15 mars 2002;185(6):774-84.
241. Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, et al. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. J Infect Dis. mars 1998;177(3):642-50.
242. Escobar-Páramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ Microbiol. nov 2006;8(11):1975-84.
243. Dissanayake DRA, Octavia S, Lan R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. Vet Microbiol. 31 janv 2014;168(2-4):403-12.
244. Bourrel AS, Poirel L, Royer G, Darty M, Vuillemin X, Kieffer N, et al. Colistin resistance in Parisian inpatient faecal *Escherichia coli* as the result of two distinct evolutionary pathways. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1 juin 2019;74(6):1521-30.
245. Schaumburg F, Sertic SM, Correa-Martinez C, Mellmann A, Köck R, Becker K. Acquisition and colonization dynamics of antimicrobial-resistant bacteria during international travel: a prospective cohort study. Clin Microbiol Infect. oct 2019;25(10):1287.e1-1287.e7.
246. Armand-Lefèvre L, Andremont A, Ruppé E. Travel and acquisition of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Med Mal Infect. oct 2018;48(7):431-41.

247. Östblom A, Adlerberth I, Wold AE, Nowrouzian FL. Pathogenicity Island Markers, Virulence Determinants malX and usp, and the Capacity of *Escherichia coli* To Persist in Infants' Commensal Microbiotas. Appl Environ Microbiol. avr 2011;77(7):2303-8.

248. Rogers BA, Kennedy KJ, Sidjabat HE, Jones M, Collignon P, Paterson DL. Prolonged carriage of resistant *E. coli* by returned travellers: clonality, risk factors and bacterial characteristics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. sept 2012;31(9):2413-20.

249. van Duijkeren E, Wielders CCH, Dierikx CM, van Hoek AHAM, Hengeveld P, Veenman C, et al. Long-term Carriage of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the General Population in The Netherlands. Clin Infect Dis. 17 avr 2018;66(9):1368-76.

250. Servin AL. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. Clin Microbiol Rev. oct 2014;27(4):823-69.

251. Smajs D, Weinstock GM. The iron- and temperature-regulated cjrBC genes of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* strains code for colicin Js uptake. J Bacteriol. juill 2001;183(13):3958-66.

252. Blackburn D, Husband A, Saldaña Z, Nada RA, Klena J, Qadri F, et al. Distribution of the *Escherichia coli* Common Pilus among Diverse Strains of Human Enterotoxigenic *E. coli*. J Clin Microbiol. juin 2009;47(6):1781-4.

253. Navarro-Garcia F, Ruiz-Perez F, Cataldi Á, Larzábal M. Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. Front Microbiol. 2019;10:1965.

254. Dautin N. Serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): biogenesis and function. Toxins (Basel). juin 2010;2(6):1179-206.

255. Dautzenberg MJD, Haverkate MR, Bonten MJM, Bootsma MCJ. Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 17 mars 2016;6(3):e009971.

256. Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, Chen WL, et al. Molecular Typing of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from Environmental Water, Swine Feces, Specimens from Healthy Humans, and Human Patients. Appl Environ Microbiol. oct 2013;79(19):5988-96.

257. Schaufler K, Semmler T, Wieler LH, Trott DJ, Pitout J, Peirano G, et al. Genomic and Functional Analysis of Emerging Virulent and Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Lineage Sequence Type 648. Antimicrob Agents Chemother. juin 2019;63(6):e00243-19.

258. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. janv 2021;19(1):37-54.

259. Andrews S. s-andrews/FastQC [Internet]. 2025 [cité 12 oct 2025]. Disponible sur: https://github.com/s-andrews/FastQC

260. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics. 1 oct 2016;32(19):3047-8.

261. Babraham Bioinformatics - Trim Galore! [Internet]. [cité 23 juill 2025]. Disponible sur: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/

262. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal. 2 mai 2011;17(1):10-2.

263. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology. mai 2012;19(5):455-77.

264. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. Genome Res. mai 2017;27(5):824-34.

265. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 15 avr 2013;29(8):1072-5.

266. Mikheenko A, Saveliev V, Gurevich A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. Bioinformatics. 1 avr 2016;32(7):1088-90.
267. Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, et al. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. PeerJ. 26 juill 2019;7:e7359.
268. Uritskiy GV, DiRuggiero J, Taylor J. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. Microbiome. 15 sept 2018;6(1):158.
269. Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Hancock J, éditeur. Bioinformatics. 15 nov 2019;btz848.
270. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. juill 2015;25(7):1043-55.
271. Chklovski A, Parks DH, Woodcroft BJ, Tyson GW. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning. Nat Methods. août 2023;20(8):1203-12.
272. Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, et al. vegan: Community Ecology Package [Internet]. 2025 [cité 23 juill 2025]. Disponible sur: https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html
273. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 2011;12(6):R60.
274. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. Microbial Genomics. 2018;4(7):e000192.
275. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. BMC Genomics. 26 nov 2008;9(1):560.
276. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for *Escherichia coli* Subtyping Based on fimH Alleles. Journal of Clinical Microbiology. 25 juill 2017;55(8):2538-43.
277. Ingle DJ, Valcanis M, Kuzevski A, Tauschek M, Inouye M, Stinear T, et al. In silico serotyping of *E. coli* from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. Microbial Genomics. 2016;2(7):e000064.
278. Seemann T. tseemann/abricate [Internet]. 2025 [cité 12 oct 2025]. Disponible sur: https://github.com/tseemann/abricate
279. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 1 déc 2020;75(12):3491-500.
280. Royer G, Decousser JW, Branger C, Dubois M, Médigue C, Denamur E, et al. PlaScope: a targeted approach to assess the plasmidome from genome assemblies at the species level. Microbial Genomics [Internet]. 1 sept 2018 [cité 20 févr 2023];4(9)
281. Therneau T. A package for survival analysis in R.
282. Wei LJ. The accelerated failure time model: a useful alternative to the Cox regression model in survival analysis. Stat Med. 1992;11(14-15):1871-9.
283. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. In: Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G, éditeurs. Selected Papers of Hirotugu Akaike [Internet]. New York, NY: Springer; 1998 [cité 11 sept 2025]. p. 215-22. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_16
284. Yamashita T, Yamashita K, Kamimura R. A Stepwise AIC Method for Variable Selection in Linear Regression. Communications in Statistics - Theory and Methods. 3 oct 2007;36(13):2395-403.
285. Orakov A, Fullam A, Coelho LP, Khedkar S, Szklarczyk D, Mende DR, et al. GUNC: detection of chimerism and contamination in prokaryotic genomes. Genome Biol. 13 juin 2021;22(1):178.
286. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 15 juill 2014;30(14):2068-9.

287. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, Lees JA, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. Genome Biol. 22 juill 2020;21(1):180.
288. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 1 mai 2020;37(5):1530-4.
289. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat Methods. juin 2017;14(6):587-9.
290. Bianchini G, Sánchez-Baracaldo P. TreeViewer: Flexible, modular software to visualise and manipulate phylogenetic trees. Ecol Evol. 1 févr 2024;14(2):e10873.
291. Tavaré S. Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. Mathematics in the Life Sciences. 1986;17.
292. Fijan S. Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. In: Rao V, Rao LG, éditeurs. Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health [Internet]. InTech; 2016 [cité 20 févr 2023]. Disponible sur: http://www.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health/antimicrobial-effect-of-probiotics-against-common-pathogens
293. Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. Journal of Microbiological Methods. avr 1995;22(1):95-108.
294. Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 1 juin 2006;17(6):454-61.
295. Trejo FM, Minnaard J, Perez PF, De Antoni GL. Inhibition of Clostridium difficile growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. Anaerobe. août 2006;12(4):186-93.
296. Pilasombut K, Rumjuankiat K, Ngamyeesoon N, Duy LND. In vitro Characterization of Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Nem Chua, a Traditional Vietnamese Fermented Pork. Korean J Food Sci Anim Resour. 2015;35(4):473-8.
297. Yadav MK, Tiwari SK. Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology. 1 déc 2023;92(6):745-65.
298. Soomro AH, Masud T, Sammi S, Rathore HA. Comparison of Different Methods for Detection of Antimicrobial Activity of *Lactobacillus spp.*
299. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev. juin 1995;59(2):171-200.
300. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol Rev. sept 1976;40(3):722-56.
301. Klein JM, Stockwell VO, Minsavage GV, Vallad GE, Goss EM, Jones JB. Improved deferred antagonism technique for detecting antibiosis. Lett Appl Microbiol. oct 2020;71(4):330-6.
302. Millette M, Luquet FM, Lacroix M. In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus*- and *Lactobacillus casei*-fermented milk. Lett Appl Microbiol. mars 2007;44(3):314-9.
303. Ratsep M. Effect of Lactobacillus plantarum Strains on Clinical Isolates of *Clostridium difficile* in vitro. J Prob Health [Internet]. 2014 [cité 20 févr 2023];02(01). Disponible sur: https://www.omicsonline.org/open-access/effect-of-lactobacillus-plantarum-strains-on-clinical-isolates-of-clostridium-difficile-in-vitro-2329-8901.1000119.php?aid=32518
304. Tharmaraj N, Shah NP. Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeasts and moulds in cheese-based dips. International Journal of Food Science and Technology. oct 2009;44(10):1916-26.
305. Drago L, Gismondo MR, Lombardi A, Haën C, Gozzini L. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. FEMS Microbiology Letters. 17 janv 2006;153(2):455-63.

306. Meredith HR, Andreani V, Ma HR, Lopatkin AJ, Lee AJ, Anderson DJ, et al. Applying ecological resistance and resilience to dissect bacterial antibiotic responses. Science Advances. 5 déc 2018;4(12):eaau1873.
307. Kunishima H, Ishibashi N, Wada K, Oka K, Takahashi M, Yamasaki Y, et al. The effect of gut microbiota and probiotic organisms on the properties of extended spectrum beta-lactamase producing and carbapenem resistant Enterobacteriaceae including growth, beta-lactamase activity and gene transmissibility. J Infect Chemother. nov 2019;25(11):894-900.
308. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun. 30 nov 2018;9(1):5114.
309. Mirete S, Sánchez-Costa M, Díaz-Rullo J, González de Figueras C, Martínez-Rodríguez P, González-Pastor JE. Metagenome-Assembled Genomes (MAGs): Advances, Challenges, and Ecological Insights. Microorganisms. 25 avr 2025;13(5):985.
310. Ibrahim SA, Bezkorovainy A. Inhibition of *Escherichia coli* by Bifidobacteria. J Food Prot. août 1993;56(8):713-5.
311. Wang SP, Rubio LA, Duncan SH, Donachie GE, Holtrop G, Lo G, et al. Pivotal Roles for pH, Lactate, and Lactate-Utilizing Bacteria in the Stability of a Human Colonic Microbial Ecosystem. mSystems. 8 sept 2020;5(5):e00645-20.
312. Gavzy SJ, Kensiski A, Lee ZL, Mongodin EF, Ma B, Bromberg JS. *Bifidobacterium* mechanisms of immune modulation and tolerance. Gut Microbes. déc 2023;15(2):2291164.
313. He Q, Gao Y, Jie Z, Yu X, Laursen JM, Xiao L, et al. Two distinct metacommunities characterize the gut microbiota in Crohn's disease patients. Gigascience. 1 juill 2017;6(7):1-11.
314. Li B, Wang H, Wang M, Liang H, Hu T, Yang J, et al. Genome analysis of *Bifidobacterium adolescentis* and investigation of its effects on inflammation and intestinal barrier function. Front Microbiol. 2024;15:1496280.
315. Grimm V, Westermann C, Riedel CU. Bifidobacteria-Host Interactions—An Update on Colonisation Factors. Biomed Res Int. 2014;2014:960826.
316. Bottacini F, Ventura M, van Sinderen D, O'Connell Motherway M. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. Microbial Cell Factories. 29 août 2014;13(1):S4.
317. Zhuang Y, Gao D, Jiang W, Xu Y, Liu G, Hou G, et al. Core microbe *Bifidobacterium* in the hindgut of calves improves the growth phenotype of young hosts by regulating microbial functions and host metabolism. Microbiome. 16 janv 2025;13(1):13.
318. Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, et al. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. Proceedings of the National Academy of Sciences. 11 mai 2004;101(19):7427-32.
319. Kudelka MR, Stowell SR, Cummings RD, Neish AS. Intestinal epithelial glycosylation in homeostasis and gut microbiota interactions in IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. oct 2020;17(10):597-617.
320. Inturri R, Trovato L, Volti GL, Oliveri S, Blandino G. In vitro inhibitory activity of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 alone or in combination against bacterial and Candida reference strains and clinical isolates. Heliyon. nov 2019;5(11):e02891.
321. Machulin AV, Abramov VM, Kosarev IV, Deryusheva EI, Priputnevich TV, Panin AN, et al. A Novel *Bifidobacterium longum Subsp. longum* T1 Strain from Cow's Milk: Homeostatic and Antibacterial Activity against ESBL-Producing *Escherichia coli*. Antibiotics (Basel). 27 sept 2024;13(10):924.
322. Jo SH, Jeon HJ, Song WS, Lee JS, Kwon JE, Park JH, et al. Unveiling the inhibition mechanism of *Clostridioides difficile* by *Bifidobacterium longum* via multiomics approach. Front Microbiol. 2023;14:1293149.
323. Abdelhamid AG, Esaam A, Hazaa MM. Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. Saudi Pharm J. juill 2018;26(5):603-7.

324. Pensinger DA, Fisher AT, Dobrila HA, Van Treuren W, Gardner JO, Higginbottom SK, et al. Butyrate Differentiates Permissiveness to Clostridioides difficile Infection and Influences Growth of Diverse *C. difficile* Isolates. Infect Immun. 16 févr 2023;91(2):e0057022.

325. Valdés-Varela L, Hernández-Barranco AM, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M. Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. Front Microbiol. 2016;7:738.

326. Liu D, Li C, Cao T, Lv X, Yue Y, Li S, et al. *Bifidobacterium longum* K5 Prevents Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Mice through the Modulation of the Gut Microbiota. Nutrients. 13 avr 2024;16(8):1164.

327. Morel-Journel T, Lehtinen S, Cotto O, Amia R, Dion S, Figueroa C, et al. Residence-colonization trade-off and niche differentiation enable coexistence of *Escherichia coli* phylogroups in healthy humans. ISME J. 1 janv 2025;19(1):wraf089.

328. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. Environmental Microbiology Reports. févr 2013;5(1):58-65.

329. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. Clin Microbiol Rev. 19 juin 2019;32(3):e00135-18.

330. Dallman TJ, Neuert S, Fernandez Turienzo C, Berin M, Richardson E, Fuentes-Utrilla P, et al. Prevalence and Persistence of Antibiotic Resistance Determinants in the Gut of Travelers Returning to the United Kingdom is Associated with Colonization by Pathogenic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 17 août 2023;11(4):e0518522.

331. Kim SH, Yang SJ, Koo HC, Bae WK, Kim JY, Park JH, et al. Inhibitory activity of *Bifidobacterium longum* HY8001 against Vero cytotoxin of *Escherichia coli* O157:H7. J Food Prot. nov 2001;64(11):1667-73.

332. Vertillo Aluisio G, Mezzatesta ML, Cafiso V, Scuderi R, Stefani S, Santagati M. Cell-free supernatant of *Lactobacillus gasseri* 1A-TV shows a promising activity to eradicate carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae colonization. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1471107.

333. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. Nat Rev Microbiol. oct 2017;15(10):630-8.

334. Moubareck C, Lecso M, Pinloche E, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Inhibitory Impact of Bifidobacteria on the Transfer of β-Lactam Resistance among *Enterobacteriaceae* in the Gnotobiotic Mouse Digestive Tract. Appl Environ Microbiol. févr 2007;73(3):855-60.

335. Salomão MCC, Heluany-Filho MA, Menegueti MG, Kraker MEAD, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F. A randomized clinical trial on the effectiveness of a symbiotic product to decolonize patients harboring multidrug-resistant Gram-negative bacilli. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(5):559-66.

336. Ljungquist O, Kampmann C, Resman F, Riesbeck K, Tham J. Probiotics for intestinal decolonization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: a randomized, placebo-controlled clinical trial. Clin Microbiol Infect. avr 2020;26(4):456-62.

337. Wieërs G, Verbelen V, Van Den Driessche M, Melnik E, Vanheule G, Marot JC, et al. Do Probiotics During In-Hospital Antibiotic Treatment Prevent Colonization of Gut Microbiota With Multi-Drug-Resistant Bacteria? A Randomized Placebo-Controlled Trial Comparing Saccharomyces to a Mixture of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces*. Front Public Health. 2020;8:578089.

338. Karbalaei M, Keikha M. Probiotics and intestinal decolonization of antibiotic-resistant microorganisms; A reality or fantasy? Ann Med Surg (Lond). août 2022;80:104269.

Travaux soumis et publiés

Microbiological determinants associated with intestinal clearance of multidrug-resistant *Escherichia coli* in travelers (article soumis)

Microbiological determinants associated with intestinal clearance of multidrug-resistant Escherichia coli in travelers

Khanh Villageois-Tran[1,2], Skerdi Haviari[1,3], Emavieve Coles[1], Saad En Naimani[1], Julie Marin[1], Nicolas Godron[1], Thibaut Morel-Journel[1], Jimmy Mullaert[1], Marie Petitjean[1,4], Etienne Ruppé*[1,4], and the VOYAG-R Study group

[1]Université Paris Cité and Université Sorbonne Paris Nord, Inserm, IAME, F-75018 Paris, France

[2]AP-HP, Hôpital Avicenne, Laboratoire de Bactériologie, F-93000 Bobigny, France

[3]AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Département Epidémiologie Biostatistiques et Recherche Clinique, F- 75018 Paris, France

[4]AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Bactériologie, F- 75018 Paris, France

Corresponding author

Etienne Ruppé, PharmD, PhD

UMR1137 IAME, UFR Médecine Université Paris Cité, site Bichat

16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

Tel. +33 (0) 01 57 27 76 52

etienne.ruppe@inserm.fr

The VOYAG-R study group: Antoine Andremont, Laurence Armand-Lefèvre, Olivier Bouchaud, Yacine Boussadia, Pauline Campa, Bruno Coignard, Paul-Henri Consigny, Assiya El Mniai, Marina Esposito-Farèse, Candice Estellat, Pierre-Marie Girard, Catherine Goujon, Isabelle Hoffmann, Guillaume Le Loup, JeanChristophe Lucet, Sophie Matheron, Nabila Moussa, Marion Perrier, Gilles Pialoux, Pascal Ralaimazava, Etienne Ruppé, Daniel Vittecoq, Ingrid Wieder, and Benjamin Wyplosz.

Abstract

Introduction: The gut microbiota resists long-term colonization by exogenous bacteria, known as colonization resistance. Clearance of multidrug-resistant *Enterobacterales* (MRE) has been associated with gut microbiota composition.

Objective: To identify bacterial species linked to MRE clearance and genomic traits of MRE strains associated with persistence.

Method: We analyzed 150 stool samples from the VOYAG-R cohort: 75 travelers who cleared MRE within one month (eliminators) were matched 1:1 to 75 persistent carriers (persisters). Microbiota was characterized using short- and long-read sequencing, enabling species-level analysis and reconstruction of Metagenome-Assembled Genomes (MAGs). *In vitro* assays tested eight *Bifidobacterium* strains and 26 multidrug resistant (MDR) *E. coli* strains. Additionally, 478 MDR *E. coli* isolated from the 150 travelers were sequenced and analyzed.

Results: *B. adolescentis* and *B. longum* were enriched in travelers who cleared MRE, with one *B. adolescentis* strain inhibiting *in vitro* MDR *E. coli*. Phylogroups B2 and D were more often associated with persistence.

Conclusion: Specific *Bifidobacterium* strains contribute to MRE clearance, while *E. coli* genomic background influences persistence.

Keywords: Intestinal microbiota, *Bifidobacterium* sp., resistance, barrier effect

Introduction

Antibiotic resistance (ABR) represents an escalating threat to global public health. Over the past 70 years, ABR has steadily increased due to the widespread use of antibiotics. In contrast, the development of new antibiotics has significantly slowed since the late 1980s, raising concerns about a potential "post-antibiotic" era in which bacterial infections may no longer be treatable with existing antibiotics. Therefore, a deeper understanding of ABR dynamics is essential to identify new strategies for controlling its spread. According to the World Health Organization (WHO), the most critical antibiotic resistance threat to public health is resistance to beta-lactams in Gram-negative bacilli (GNB), particularly among *Enterobacterales* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and carbapenemases—collectively referred to as multidrug-resistant *Enterobacterales* (MRE) (1). Indeed, the mortality burden associated with MRE is the highest among all bacterial pathogens (2).

A major turning point in the ABR crisis occurred in the late 1990s, with the widespread dissemination of MRE within the community, including among healthy individuals. Over the past two decades, the global prevalence of fecal carriage of MRE in the community has increased nearly eightfold, reaching up to 27% in low- and middle-income countries (LMICs) (3). In contrast, the lowest prevalence rates have been observed in Western Europe, where fecal carriage of MRE remains relatively low, at approximately 6% (4). ABR has spread globally through the forces of globalization, with international travelers contributing to the dissemination of antibiotic-resistant bacteria between endemic and non-endemic regions (4). Indeed, studies have shown that between 20% and 70% of European travelers to LMICs return home colonized by MRE. Several factors have been associated with MRE acquisition during travel, including the destination, the occurrence of traveler's diarrhea, antibiotic use, and individual characteristics such as age, type of travel, and dietary habits. However, most European travelers experience transient colonization, with a median time to MRE clearance of less than one month after returning home (5–8). Nonetheless, some individuals carry MRE for prolonged periods, up to 12 months. Prolonged carriage has been associated with specific factors, including travel to certain destinations (notably South-East Asia), a high intestinal relative abundance of MRE, colonization by *Escherichia coli* phylogroups B2 and D, as well as the overall composition of the intestinal microbiota suggesting that multiple determinants would be at play (5,8–10). MRE typically reside as commensals within the intestinal microbiota before potentially causing infections. The gut microbiota constitutes a complex ecosystem composed of over 10^{13} microorganisms - including bacteria, archaea, viruses, protozoa, and fungi - that colonize the digestive tract and maintain a mutualistic relationship with the host (11). Of note, the intestinal microbiota plays a crucial role in preventing the long-term colonization of exogenous bacteria, including antibiotic-resistant opportunistic pathogens. This

protective function, known as the barrier effect or colonization resistance, is mediated through various direct and indirect mechanisms (12). Indeed, certain bacterial commensals have been shown to antagonize intestinal colonization by *Clostridioides difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (13,14). Yet, human bacterial commensals exerting colonization resistance against MRE remain to be fully characterized.

In a previous study, we showed that MRE persistence in returning travelers was associated with a specific composition of the intestinal microbiota, marked by reduced diversity and the presence of certain bacterial taxa, including an increase in Pseudomonadota (ex-Proteobacteria) and a decrease in Bacillota (ex-Firmicutes). More specifically, *Bifidobacterium spp.* were enriched in individuals who had cleared MRE within one month after return, compared to those who remained colonized. However, this study was limited by a small sample size and the low resolution of the microbiota characterization method (16S and 23S cDNA sequencing) (9). In this study, we aimed to better characterize the determinants associated with MRE clearance in travelers, at both the metagenomic and genomic levels. Specifically, we sought to identify bacterial species linked to MRE clearance by analyzing a larger cohort of subjects, with controls matched for known factors associated with ESBL-producing *Enterobacterales* (ESBL-E) persistence, and by employing metagenomic sequencing. In addition, since the vast majority of MRE identified in the VOYAG-R cohort were *E. coli* (93.3%), we analyzed all *E. coli* genomes acquired by the travelers in this cohort to identify genomic traits associated with persistence.

Material and methods

Population

The VOYAG-R study (ClinicalTrials.gov identifier NCT01526187) monitored the carriage of MRE defined as above but also including plasmid-borne cephalosporinase-producing *Enterobacterales* in the intestinal microbiota of healthy volunteers traveling to tropical regions from February 2012 to April 2013 (5). Eight hundred and twenty-four participants were recruited from six international vaccination centers in the Paris (France) area. Fecal samples were collected before and after travel from volunteers who initially tested negative for MRE. Travelers who tested positive post-travel provided additional stool samples at 1, 2, 3, 6, and 12 months until MRE was no longer detected. Samples were stored at -80°C in 10% glycerinated brain-heart infusion broth. Out of 574 volunteers, 292 (50.9%) returned carrying an average of 1.8 MRE. One month after return, the number of MRE carriers had dropped to 83. For this study, 75 travelers from the VOYAG-R cohort who acquired and subsequently eliminated MRE within one-month post-travel (i.e., controls) were matched 1:1 to 75 persistent carriers at one month (i.e., cases) based on intestinal concentrations of MRE at return with

the method of nearest neighbor. After matching, the mean log-concentration was -2.26 (sd 1.86) and -2.61 (sd 1.63) among cases and controls respectively. The mean difference was 0.35 and the p-value of the Wilcoxon test was 0.14.

Total DNA extraction and sequencing

Total DNA was extracted from stool samples using the QIAcube automated system (QIAgen, Courtaboeuf, France) with the Power Fecal Pro kit (Qiagen). Genomic DNA was extracted from the *E. coli* and *Bifidobacterium* strains using the EZ1 automated system (QIAgen,) with the DNA Tissue Kit (QIAgen). Shotgun libraries from feces and strains were prepared using the Illumina DNA library prep kit and sequenced on the Illumina NextSeq500 (Illumina, San Diego, California) platform with high-throughput flow-cell (paired-end sequencing at 2x150pb). Additionally, Nanopore (Oxford Nanopore Technologies, United Kingdom) sequencing was performed using the Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109) from total DNA extracted from stools. DNA concentration was quantified using the Qubit DNA HS Assay Kit (Life Technologies, Reinach, Switzerland).

Bioinformatic and statistical analysis

The Illumina reads were filtered using Trim Galore! (15). A hybrid assembly of short (Illumina) and long (Nanopore) reads was performed using SPAdes (16). Assembly quality was assessed using QUAST (17). MetaBAT2 and GTDB-Tk were used for reconstructing metagenome-assembled genomes (MAGs) and taxonomic assignments (17,18). MAGs quality was assessed using CheckM2 (19).

To identify microbial taxa associated with MRE clearance, we employed LEfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) analysis (20). The R software was used to assess Alpha diversity, based on the number of observed species, the Shannon index, and the inverse Simpson index, and was tested using the Wilcoxon signed-rank test (21). Beta-diversity was calculated using Bray-Curtis dissimilarity as implemented in the R package vegan (22). Principal coordinate analysis (PCoA) was computed using the ordinate function from the phyloseq package (without rarefying) based on this distance (23). A PCA (principal component analysis) was also computed, based on the prcomp function from the R base package, using the Euclidean distance on relative abundance of a tightly selected group of species.

To analyze *Bifidobacterium* and *E. coli* MAGs, taxonomic identification was first assessed and quality-controlled using CheckM2. Gene annotation was performed using PROKKA, followed by core genome alignment with Panaroo (24,25). Phylogenetic trees were then constructed using FastTree, and the resulting trees were visualized with the Interactive Tree of Life (iTOL) platform (https://itol.embl.de/) (26).

To assemble *E. coli* genomes, the in-house pipeline PETA'n'C was performed (27). It integrates multiple existing bacterial genomic tools such as SPAdes. The phylogroups were defined *in silico* using the ClermonTyping method (28). Multilocus sequence typing (MLST) was performed and STs were defined using the Warwick MLST scheme (29). The O:H types (called serotypes in this article) and the *fimH* alleles were also determined (30,31). The resistome, the virulome and the plasmid type were defined with Abricate (32) using the ResFinder 4.0 database (33), a custom database, and PlasmidFinder (34), respectively.

Survival models

The persistence of multidrug-resistant *E. coli* over time was analyzed using accelerated failure time models (AFT), the R package *survival* . These parametric survival models describe the relationship between the bacteria persistence time and a set of explanatory factors (36). The AFT models assume a distribution of persistence time, for which exponential, Weibull, log-normal and log-logistic distributions were considered. Besides, the following sets of explanatory factors were considered: (i) the phylogroup of the strains and of the dominant strain if it was *E. coli* (noted "Non *Escherichia"* otherwise), (ii) the total virulence-associated genes (VAGs) carried by the bacteria, (iii) the number of VAGs carried associated with five types of virulence factors: adhesins, protectins, iron acquisition, invasins and toxins, and (iv) the total number of antibiotic resistance genes (ARGs) carried. The dominant strains were assumed to be those identified in the MAGs, with at least 60% completeness and less than 5% contamination according to CheckM2. For each set, the distribution of persistence time considered was selected based on the Akaike information criterion (AIC), and the explanatory factors included were selected using a stepwise AIC method (37,38).

Liquid culture assays

Four strains of *Bifidobacterium adolescentis* were selected from the Institut Pasteur collection (*B. adolescentis* CIP64.58, CIP 64.59T, 64.61 and 64.71 referred as strain 1, 2, 3 and 4 respectively) and 4 strains of *Bifidobacterium longum* were isolated from 4 patients hospitalized in the Bichat hospital (APHP, Paris, France) (39). Twenty-six MRE strains were selected from sixteen travelers in the VOYAG-R study: twenty isolated at return and six at one month after return. Among them, six travelers provided paired strains (return and one month), while ten travelers provided fourteen strains at return. Cultures of *Bifidobacterium sp.* and *E. coli* were grown overnight separately, before being mixed in equal inoculums and incubated in the Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan, Life Sciences, Männedorf, Switzerland). Optical density at 600 nm was measured every 3 minutes over a 24-hour period. MRE strains served as the reference curve, while the non-inoculated nutrient medium was used as the

negative control. The influence of cell-free supernatants (CFS) on MRE growth was also tested. CFS were obtained from overnight cultures of *Bifidobacterium sp*. centrifugated at 12,000g for 10 minutes at +4°C. Three conditions were tested: unheated neutral CFS (pH=7 by addition of 2M NaOH solution), heated CFS (heated at 100°C for 20 minutes) and acid CFS (pH=5.5 by addition of 0,1M HCl solution). However, no bacterial growth was observed with acid CFS and results were not interpreted. Inhibitory activity was determined by calculating the percentage reduction in growth of the resistant *E. coli* strain when exposed to either a strain of *Bifidobacterium* or its CFS. This calculation was based on a comparison of optical density (OD) measurements between test groups and a control. All measurements were taken in triplicate and performed within one experiment to ensure reliability and reproducibility.

Results

Intestinal Bifidobacterium species are associated with elimination of MRE

Data from 75 healthy individuals in the VOYAG-R cohort who acquired MRE during travel and cleared it within one month (hereafter referred to as the "eliminators group") were matched with 75 persistent carriers who remained colonized with MRE one month after returning (hereafter referred to as the "persisters group"). Participant characteristics are described in the Supplementary Table 1. Most participants were women (67.3%), with an average age of 33 (min 18; max 72) years old and traveled to Southeast Asia (60.7%). In total, 150 stool samples collected one month after return were analyzed. No significant differences in microbiota alpha diversity were found between the eliminators and persisters groups, with mean species counts of 55 and 60 respectively (Wilcoxon test, p=0.25; Figure 1-A). Similarly, the Shannon and Inverse Simpson diversity indices did not differ between the persisters and eliminators groups: a mean Shannon index of 3.5 and 3.6 respectively (Wilcoxon test, p=0.21; Figure 1-A) and an Inverse Simpson index of 1.1 and 1.0 respectively (Wilcoxon test, p=0.28; Figure 1-A).

Regarding β-diversity (Bray-Curtis dissimilarity), the eliminators and persisters groups could be separated on the axis 1 (Mann-Whitney test, p<0.001) but not on axis 2 (Mann-Whitney test, p=0.14) (Figure 1-B). In the LEfSe analysis, five genera were associated with MRE clearance: *Bifidobacterium*, *Brachyspira*, KLE1615, *Thermophilibacter and Hafnia* while and four genera were associated with persistence: *Flavonifractor*, *Ventrimonas*, *Parabacteroides* and *Bacteroides*. Twenty species were associated with elimination (Figure 1-C). Among them, *B. adolescentis* and *B. longum* were associated with the MRE clearance one month after return (Wilcoxon rank sum test, p-values, 0.04 and 0.008, respectively). On a principal

component analysis made only on the 32 species associated with persistence/elimination, *B. adolescentis* and *B. longum* were colinear (Supplementary Figure 1).

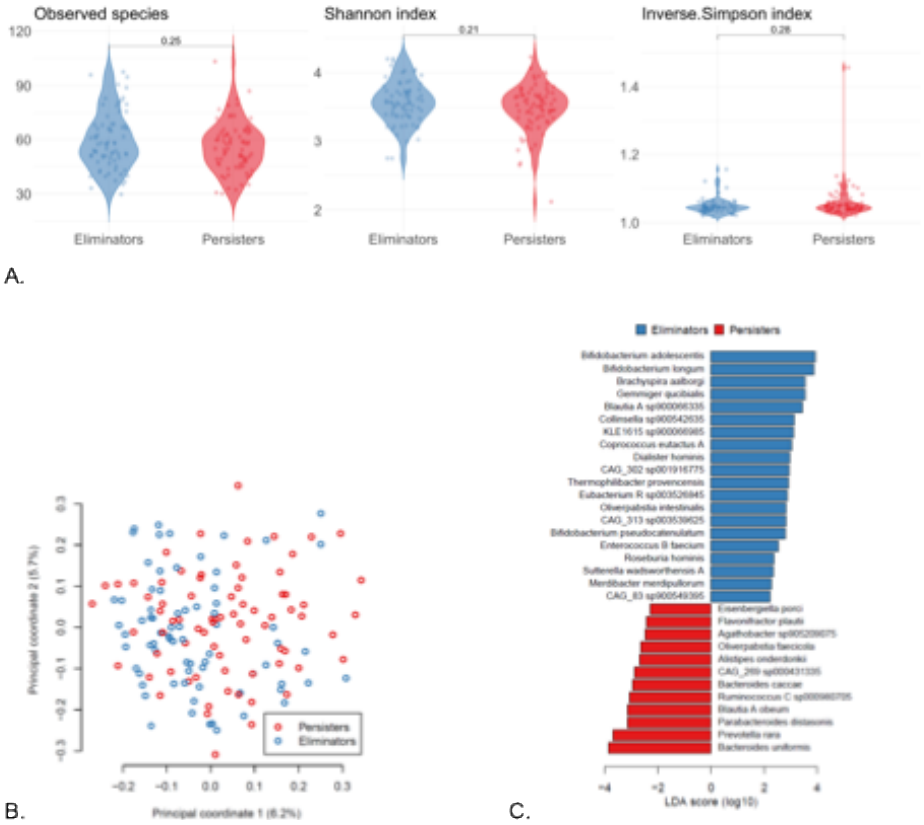


Figure 1, Panel A: Box plots of alpha-diversity indicators (number of species, Shannon index, inverse Simpson index) for the two types of subjects. Panel B : Principal coordinate analysis (PCoA) using Bray-Curtis distance on the 943 taxonomic units for the two types of subjects. Panel C : Bar plot displaying log10-transformed Linear Discriminant Analysis (LDA) scores of microbial assemblies of genomes (MAGs) identified by LEfSe analyses (p-value <0.05). Color labels indicate travelers who acquired and subsequently cleared MRE carriage within one month post-travel (blue-green) and travelers who still carried MRE at one month (red).

Since *Bifidobacterium* have been associated with the rapid clearance of MRE, and given their high diversity within the gut microbiota, we investigated whether specific lineages could be linked to this effect. We therefore analyzed all *Bifidobacterium's* MAGs detected in the microbiota to assess potential associations with resistant *E. coli* and to explore their mechanisms of action through phylogenetic reconstruction. In total, 553 MAGs of the genus *Bifidobacterium* were identified in the travelers, including 72 *B. adolescentis* and 105 *B. longum*. After quality filtering with CheckM2 (completeness > 60% and contamination < 5%), only 27 *B. adolescentis* and 66 *B. longum* MAGs were retained for analysis. In addition, one *B. adolescentis* strain and four *B. longum* strains were also included. Core genome alignments

were performed on 158 genes for *B. adolescentis* and 127 genes for *B. longum*. We observed a different structure of the trees, with a linear structure for *B. adolescentis* and two main branches for *B. longum*. This distribution was also observed with a higher number of complete genomes (from the RefSeq database), with a single mode for *B. adolescentis* and two for *B. longum* (Supplementary Figure 2).

Since *Bifidobacterium* have been associated with the rapid clearance of MRE, and given their high diversity within the gut microbiota, we investigated whether specific lineages could be linked to this effect. We therefore analyzed all *Bifidobacterium's* MAGs detected in the microbiota to assess potential associations with resistant *E. coli* and to explore their mechanisms of action through phylogenetic reconstruction. In total, 553 MAGs of the genus *Bifidobacterium* were identified in the travelers, including 72 *B. adolescentis* and 105 *B. longum*. After quality filtering with CheckM2 (completeness > 60% and contamination < 5%), only 27 *B. adolescentis* and 66 *B. longum* MAGs were retained for analysis. In addition, one *B. adolescentis* strain and four *B. longum* strains were also included. Core genome alignments were performed on 158 genes for *B. adolescentis* and 127 genes for *B. longum*. We observed a different structure of the trees, with a linear structure for *B. adolescentis* and two main branches for *B. longum* (Supplementary Figure 2). This distribution was also observed with a higher number of complete genomes (from the RefSeq database), with a single mode for *B. adolescentis* and two for *B. longum*.

Some phylogroups of E. coli are associated with persistence

We sequenced the genome of *E. coli* strains acquired during travel (collected after return) and the *E. coli* strains persisting at M1 (for the persisters group). A total of 478 *E. coli* strains were sequenced: 356 from 74 persisters (159 at return, 97 at M1, 56 at M2, 29 at M3, 12 at M6 and 3 at M12) and 122 from 67 eliminators (all at return). In ten subjects, no strain was available for sequencing, either because the strain was missing (n=8) or because it corresponded to *Klebsiella pneumoniae* (n=2). To assess potential differences between strains which were present beyond M1 and those which were not, we considered strains sharing the same ST (Warwick), serotype and *fimH* allele within the same subject as the same clone, leaving 320 unique strains (Supplementary Table 2). Among them, 118 were found at M1 or beyond and 202 found only at return and not beyond.

Among the 141 travelers, the mean number of unique strains (irrespective of the time of isolation) was 2.2 [min 1; max 9], with a total of 58 combinations of phylogroups. Among the 320 strains, the phylogroups were unevenly distributed (Chi-square test, $p=8.10^{-6}$, Supplementary Figure 3), with strains belonging to phylogroups B2 and D being more frequently found persisting beyond return compared to other phylogroups. Among the 320 strains, a mean of 8.5 ARG was found (min 1; max 17). The number of ARG differed according

to the phylogroup, with the phylogroup F associated with the highest number of ARG (Kruskal-Wallis test, p=0.04, Supplementary Figure 4). All strains had at least one ARG associated with resistance to third-generation cephalosporins, with bla_{CTX-M} being found in 290 strains. The other enzymes underlying resistance to third-generation cephalosporins were SHV (n=23), CMY-2-type cephalosporinases (n=6), and TEM (n=1).

We reconstructed a total of 89 *E. coli* MAGs (Supplementary Table 3). The mean genome size was 3.4 Mb (range: 0.6–6.4 Mb). In contrast to the multidrug-resistant *E. coli* strains described above, only 14 antibiotic resistance genes (ARGs) were identified across 7 *E. coli* MAGs, corresponding to an average of 0.2 ARG per MAG.

All the selected AFT models based on AIC used a log-normal distribution to model the persistence time of the clones (Supplementary Table 4). The selected AFT model concerning the impact of phylogroups estimated that the persistence times of bacteria from the B2, D or F phylogroups were respectively 2.87 ($p < 0.001$), 1.97 (p=0.002) and 2.46 ($p < 0.001$) longer higher than that of phylogroup A, while the persistence time of B1 was similar to that of A (p=0.837) (Figure 2A). Similarly, persistence was 2.20 times longer when the dominant *E. coli* was of phylogroup B2 compared to phylogroup A (p=0.008) (Figure 2B). The impact of the dominant from other groups was not significant (Supplementary Table 5). The selected (AFT) model assessing the overall impact of virulence-associated genes (VAGs) estimated that MRE persistence time was 1.16 times longer for every 10 additional VAGs carried (p=0.001) (Figure 2C). When considering the type of virulence factors, the AFT model estimated that persistence time increased by 1.25-fold (p=0.047) and 1.85-fold ($p < 0.001$) for every 10 additional genes associated with adhesins and iron acquisition, respectively (Figure 2D). Conversely, persistence time was 1.20 times shorter for every 10 additional genes associated with toxins (p=0.049). The number of VAGs associated with invasins had no significant impact (p=0.103). The selected AFT model assessing the impact of ARGs included no explanatory variables, indicating that they had no discernible effect on bacterial persistence time.

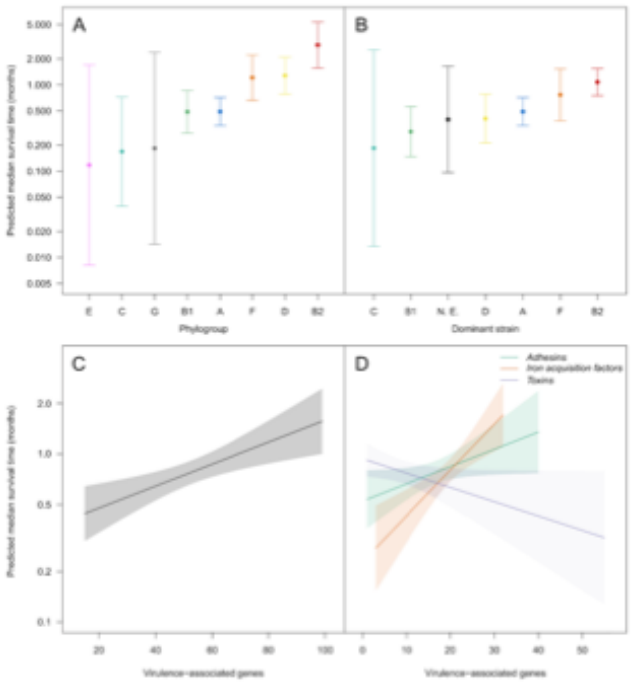
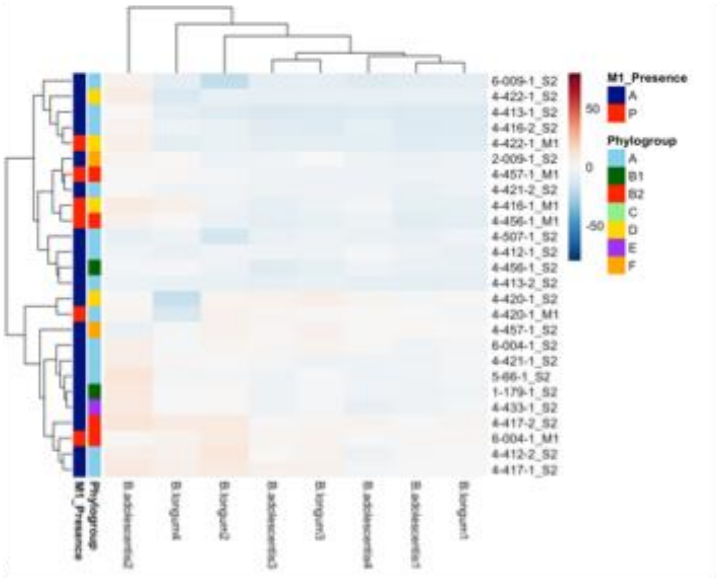


Figure 2. Predicted mean persistence time of the multidrug resistant *E. coli* bacteria based on the accelerated failure time models (AFT). The impact of the phylogroup of the strain (A), of the dominant strain (B), the total virulence-associated genes (VAGs) carried by the bacteria (C) and the number of VAGs carried associated with types of virulence factors: adhesins, iron acquisition and toxins (D). Estimates (points in A and B, solid lines in C and D) are represented with their confidence interval (error bars in A and B, envelopes in C and D). The non-*Escherichia* dominant strains are noted "N.E" in B.

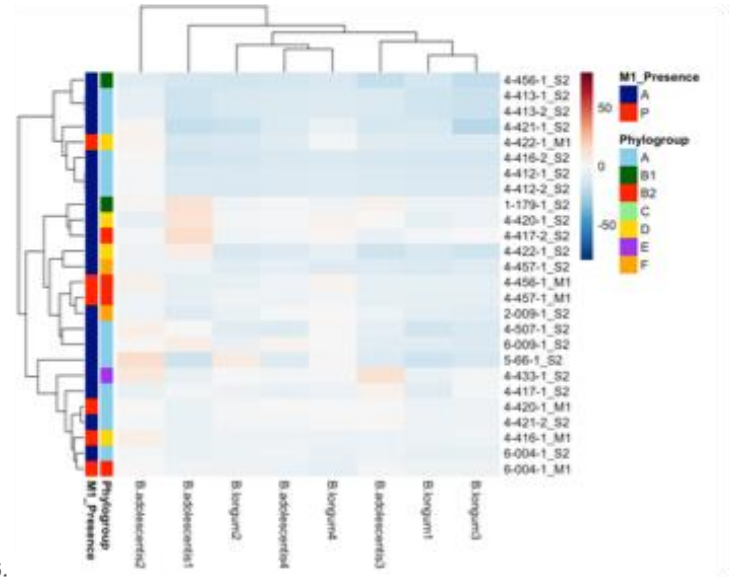
Bifidobacterium adolescentis affects E. coli growth in vitro

Given that *B. longum* and *B. adolescentis* were associated *in silico* with rapid MRE clearance, we investigated their potential to influence MRE growth *in vitro*. Two types of inhibitory effects were observed: a delay in growth during the exponential phase and a reduction in bacterial density during the stationary phase (Supplementary Figure 5) (40). In co-culture experiments with *E. coli*, *Bifidobacterium* strains exhibited variable inhibitory effects (Figure 3). Notably, a *B. adolescentis* strain CIP64.59T consistently inhibited *E. coli* growth during both phases, suggesting a strain-specific effect, whereas other strains showed milder or no effects. Additionally, during the exponential phase, a group of 10 *E. coli* strains appeared to be inhibited by all 8 *Bifidobacterium* strains, indicating a potential *E. coli*-specific susceptibility.

However, the *E. coli* phylogroups were not associated with the inhibition effects neither at exponential nor stationary phase (Kruskal-Wallis test, p=0.7 and p=0.5 respectively).



3-A



3-B.

Figure 3. Heatmap showing difference between Bifidobacterium and E. coli from bacterial strain co-culture at growth phase (A) and stationary phase (B)

To further investigate *Bifidobacterium* effect, tests with the *B. adolescentis* CIP64.59T FCS were performed to see whether the effect was associated with secreted metabolites. Regarding unheated neutral FCS and heated FCS (Supplementary Figure 5), various effects were observed with no specific pattern. Overall, the effect was not as marked as that observed in co-culture. Not all strains were impacted, no specific pattern could be identified, and the effect of *Bifidobacterium* did not appear to be associated with an enzymatic mechanism.

In the microbiome, no association was found between the relative abundance of *Bifidobacterium* sp., *B. adolescentis* or *B. longum* with the relative abundance of MRE (Supplementary Figure 7).

Discussion

The primary finding of this study is the identification of specific microbiome and genomic traits associated with the elimination of multidrug-resistant *E. coli* in individuals returning from tropical regions. These results reinforce our previous observations derived from smaller and separate datasets, through the integration of metagenomic and genomic sequencing, complemented by *in vitro* experiments (9,10). We took advantage of a specific traveler dataset offering unique conditions to study the spontaneous elimination of MRE after a recent colonization event. Of note, studies on similar datasets have not focused on MRE clearance but rather on the acquisition event itself. Indeed, an ancillary analysis of the COMBAT study examined whether the gut microbiome was associated with the acquisition of MRE rather than its persistence over time (6,41). Among 190 travelers to Africa or Asia, the results showed that pre-travel microbial richness, diversity, and community composition were not predictive of ESBL-E acquisition. Interestingly, individuals who remained uncolonized exhibited increased prevalence and abundance of *Citrobacter freundii* and certain *Bacteroides* species, suggesting a potential protective role. In contrast, no association between microbiome composition and MRE acquisition was found in the VOYAG-R cohort (9). In another study involving 10 international travelers, metagenomic sequencing of longitudinally collected fecal samples did not reveal any changes in microbiome diversity or composition associated with MRE acquisition or persistence at one month; possibly due to the limited number of subjects included (42). Last, a French study investigated whether gut microbiota composition was associated with carriage of ESBL-E in the general population (43). In a matched case-control design involving 352 individuals from a Paris hospital, 16S rRNA sequencing was used to compare gut microbial diversity and genus-level abundances between ESBL-E carriers and

non-carriers. Although nine genera showed initial associations with ESBL-E carriage, none remained significant after correction for multiple testing. No differences were found in overall microbial diversity. Overall, while current evidence suggests no microbiome differences between individuals who acquire MRE and those who do not, we observe differences between individuals who rapidly clear MRE and those who remain carriers.

Bifidobacterium plays a key role in the gut microbiota and contributes to colonization resistance by preventing the overgrowth of pathogens (44–47). Several mechanisms have been proposed to explain its protective role, such as nutrient competition or pH alteration (44,45). For instance, *Bifidobacterium* produces antimicrobial substances like lactic acid and short-chain fatty acids (SCFAs), creating an acidic environment that can hinder the growth of other pathogenic Enterobacterales (46,47). The production of acetate and propionate may also enhance the intestinal barrier effect and contribute to colonization resistance through intracellular acidification. Furthermore, a study demonstrated that certain *Bifidobacterium* strains can reduce the conjugation-mediated transfer of ARG between *Enterobacterales* (48). Both *in vitro* and *in vivo* experiments showed strain-specific inhibitory effects, as observed in the present study. These effects may be mediated by thermostable metabolites. Overall, the findings suggest that selected Bifidobacteria could contribute to limiting the spread of resistance genes in the gut. The association between *Bifidobacterium* and MRE has already been tested in a study aiming at assessing the capacity of a bacterial consortium (Vivomixx, made of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains) to eradicate the intestinal carriage of ESBL-E (49). In this trial, only 12.5% achieved decolonization after two months of probiotic administration, compared to 5% in the placebo group and not achieving statistical significance. Of note, the assessed probiotic did contain *Bifidobacterium* species, but not *B. adolescentis*. Indeed, while we observe in metagenomic sequencing an association between a high abundance of *B. adolescentis* and *B. longum* and the clearance of MRE, we could only observe an *in vitro* effect for a specific strain. This raises the issue of strain specific traits within species. We found that *B. adolescentis* strain CIP64.59T had a specific inhibitory effect on *E. coli* strains from our collection. This effect was less pronounced for the very closely related strains *B. adolescentis* strain CIP64.58 and strain CIP64.71. In contrast, strain CIP64.59T, which is on another branch, caused a major inhibitory effect. We compared the gene content of strain CIP64.59T with the seven other *Bifidobacterium* strains tested *in vitro* and identified 46 unique genes associated with diverse functions, including among others 24 linked to metabolic functions (general metabolism in particular sugar metabolism and nutrient uptake), bacterial competition and cell wall modification (Supplementary Table 6). The nutritional niche principle posits that ecological niches in the gut are defined by nutrient availability. Bifidobacteria are particularly well adapted to utilize a wide spectrum of complex

non-carriers. Although nine genera showed initial associations with ESBL-E carriage, none remained significant after correction for multiple testing. No differences were found in overall microbial diversity. Overall, while current evidence suggests no microbiome differences between individuals who acquire MRE and those who do not, we observe differences between individuals who rapidly clear MRE and those who remain carriers.

Bifidobacterium plays a key role in the gut microbiota and contributes to colonization resistance by preventing the overgrowth of pathogens (44–47). Several mechanisms have been proposed to explain its protective role, such as nutrient competition or pH alteration (44,45). For instance, *Bifidobacterium* produces antimicrobial substances like lactic acid and short-chain fatty acids (SCFAs), creating an acidic environment that can hinder the growth of other pathogenic Enterobacterales (46,47). The production of acetate and propionate may also enhance the intestinal barrier effect and contribute to colonization resistance through intracellular acidification. Furthermore, a study demonstrated that certain *Bifidobacterium* strains can reduce the conjugation-mediated transfer of ARG between *Enterobacterales* (48). Both *in vitro* and *in vivo* experiments showed strain-specific inhibitory effects, as observed in the present study. These effects may be mediated by thermostable metabolites. Overall, the findings suggest that selected Bifidobacteria could contribute to limiting the spread of resistance genes in the gut. The association between *Bifidobacterium* and MRE has already been tested in a study aiming at assessing the capacity of a bacterial consortium (Vivomixx, made of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains) to eradicate the intestinal carriage of ESBL-E (49). In this trial, only 12.5% achieved decolonization after two months of probiotic administration, compared to 5% in the placebo group and not achieving statistical significance. Of note, the assessed probiotic did contain *Bifidobacterium* species, but not *B. adolescentis*. Indeed, while we observe in metagenomic sequencing an association between a high abundance of *B. adolescentis* and *B. longum* and the clearance of MRE, we could only observe an *in vitro* effect for a specific strain. This raises the issue of strain specific traits within species. We found that *B. adolescentis* strain CIP64.59T had a specific inhibitory effect on *E. coli* strains from our collection. This effect was less pronounced for the very closely related strains *B. adolescentis* strain CIP64.58 and strain CIP64.71. In contrast, strain CIP64.59T, which is on another branch, caused a major inhibitory effect. We compared the gene content of strain CIP64.59T with the seven other *Bifidobacterium* strains tested *in vitro* and identified 46 unique genes associated with diverse functions, including among others 24 linked to metabolic functions (general metabolism in particular sugar metabolism and nutrient uptake), bacterial competition and cell wall modification (Supplementary Table 6). The nutritional niche principle posits that ecological niches in the gut are defined by nutrient availability. Bifidobacteria are particularly well adapted to utilize a wide spectrum of complex

carbohydrates that the host cannot digest, providing them with a significant competitive advantage (50–52). They can degrade both plant-derived polysaccharides (dietary fibers) and host-derived glycans, including human milk oligosaccharides (HMOs) and mucins (50,53,52). This metabolic versatility allows them to occupy nutritional niches that would otherwise remain accessible to pathogens such as *E. coli*, thereby restricting the pool of nutrients available for competing bacteria (54). Consistently, the identification of 24 metabolism-associated genes present in this one *Bifidobacterium* strain supports the hypothesis of an indirect inhibitory effect mediated by nutrient competition. These genes suggest that strain-specific metabolic traits may contribute to MRE elimination by limiting the ecological opportunities available for their persistence in the gut. Despite *in silico* predictions suggesting a role in MRE elimination, no protective effect was observed with the tested *B. longum* strains. Phylogenetic analysis reveals substantial strain-level diversity within this species, yet our study evaluated only four strains. Further investigations are required to assess a broader spectrum of *B. longum* strains and their potential protective properties.

We also focused on *E. coli* strains to investigate whether specific genomic traits could account for their persistence within the gut microbiota. We observed that *E. coli* phylogroups B2, D and F were associated with long-term carriage, in consistency with a previous work on this cohort focusing on strains at 6 months and over (10), and with previous ones on commensals in general, which identified these phylogroups as strong residents and as carrying more virulence-associated genes, notably linked to adhesins and iron acquisition systems (55). The presence of a dominant strain from phylogroups B2, the most resident one, also seemed correlated with longer carriages of MRE. A dominant strain with a long residence time might indicate that the gut environment is generally favorable and benefits resistant strains, rather than more competitive. From *in vitro* experiments, we did not observe a specific effect of *B. adolescentis* strain CIP64.59T and specific phylogroups of *E. coli*, suggesting that the carriage duration of MRE would be driven by two distinct mechanisms: the microbiota composition (with the role of *Bifidobacterium*) and MRE intrinsic factors (55).

The strength of our study lies in the carefully designed cohort, with subjects matched based on travel destination and MRE abundance, both known factors associated with acquisition and long-term carriage. We analyzed the gut microbiota using shotgun whole-genome sequencing, combining short and long reads to improve MAG reconstruction and enable precise species-level identification. Furthermore, we investigated both microbiome and genomic determinants within the same cohort. Our study has limitations, though. First, the relatively small sample size (75 subjects per arm) may limit the statistical power and generalizability of the findings. Second, the high genetic and functional diversity observed among *Bifidobacterium* species

contrasts with the limited number of strains tested *in vitro*, which may not fully capture the complexity of their interactions. Third, the absence of an *in vivo* model precludes direct validation of the observed effects under physiological conditions.

Future studies should aim to address these limitations by expanding strain diversity, incorporating appropriate *in vivo* models such as a mouse gut colonization model, and validating the underlying mechanisms through targeted experimental approaches. *In vivo* confirmation could pave the way for the use of this specific strain or its derived products as a probiotic, potentially helping travelers eliminate acquired MRE more effectively and return more rapidly to a healthy microbiota state.

Acknowledgements

We are grateful to Julie Lao (IAME Research Center, Paris, France) for bioinformatic assistance.

Funding

This study was funded by Janssen Horizon (program Microbiota 2018).

Conflict of interest

All authors: none to declare.

Data availability

The raw metagenomic and genomic sequencing data generated and analyzed in this study have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession number PRJNA1336681.

contrasts with the limited number of strains tested *in vitro*, which may not fully capture the complexity of their interactions. Third, the absence of an *in vivo* model precludes direct validation of the observed effects under physiological conditions.

Future studies should aim to address these limitations by expanding strain diversity, incorporating appropriate *in vivo* models such as a mouse gut colonization model, and validating the underlying mechanisms through targeted experimental approaches. *In vivo* confirmation could pave the way for the use of this specific strain or its derived products as a probiotic, potentially helping travelers eliminate acquired MRE more effectively and return more rapidly to a healthy microbiota state.

Acknowledgements

We are grateful to Julie Lao (IAME Research Center, Paris, France) for bioinformatic assistance.

Funding

This study was funded by Janssen Horizon (program Microbiota 2018).

Conflict of interest

All authors: none to declare.

Data availability

The raw metagenomic and genomic sequencing data generated and analyzed in this study have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the BioProject accession number PRJNA1336681.

Bibliography

1. Sati H, Carrara E, Savoldi A, Hansen P, Garlasco J, Campagnaro E, et al. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. The Lancet Infectious Diseases [Internet]. 14 avr 2025 [cité 3 juill 2025];0(0). Disponible sur: https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(25)00118-5/fulltext

2. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. févr 2022;399(10325):629-55.

3. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev. oct 2013;26(4):744-58.

4. Bezabih YM, Sabiiti W, Alamneh E, Bezabih A, Peterson GM, Bezabhe WM, et al. The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing Escherichia coli in the community. J Antimicrob Chemother. 1 janv 2021;76(1):22-9.

5. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny PH, El Mniai A, Boussadia Y, et al. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. Clin Infect Dis. 15 août 2015;61(4):593-600.

6. Arcilla MS, Hattem JM van, Haverkate MR, Bootsma MCJ, Genderen PJJ van, Goorhuis A, et al. Import and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study. The Lancet Infectious Diseases. 1 janv 2017;17(1):78-85.

7. Armand-Lefèvre L, Andremont A, Ruppé E. Travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Med Mal Infect. oct 2018;48(7):431-41.

8. Cotto O, Armand-Lefèvre L, Matheron S, Ruppé E, Blanquart F. Within-Host Dynamics and Duration of Colonization of Travel-Acquired Multidrug-Resistant Enterobacterales in Untreated Individuals. Clin Infect Dis. 18 sept 2023;77(6):934-6.

9. Leo S, Lazarevic V, Gaïa N, Estellat C, Girard M, Matheron S, et al. The intestinal microbiota predisposes to traveler's diarrhea and to the carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after traveling to tropical regions. Gut Microbes. 2019;10(5):631-41.

10. Armand-Lefèvre L, Rondinaud E, Desvillechabrol D, Mullaert J, Clermont O, Petitjean M, et al. Dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales colonization in long-term carriers following travel abroad. Microb Genom. juill 2021;7(7):000576.

11. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 25 mars 2005;307(5717):1915-20.

12. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. Nat Rev Immunol. nov 2013;13(11):790-801.

13. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to Clostridium difficile. Nature. janv 2015;517(7533):205-8.

14. Caballero S, Kim S, Carter RA, Leiner IM, Sušac B, Miller L, et al. Cooperating Commensals Restore Colonization Resistance to Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium. Cell Host Microbe. 10 mai 2017;21(5):592-602.e4.

15. Babraham Bioinformatics - Trim Galore! [Internet]. [cité 23 juill 2025]. Disponible sur: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/

16. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. Genome Res. mai 2017;27(5):824-34.

17. Mikheenko A, Saveliev V, Gurevich A. MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. Bioinformatics. 1 avr 2016;32(7):1088-90.

18. Kang DD, Li F, Kirton E, Thomas A, Egan R, An H, et al. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. PeerJ. 26 juill 2019;7:e7359.

19. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res. juill 2015;25(7):1043-55.

20. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 24 juin 2011;12(6):R60.

21. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [cité 11 sept 2025]. Disponible sur: https://www.r-project.org/

22. Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, et al. vegan: Community Ecology Package [Internet]. 2025 [cité 23 juill 2025]. Disponible sur: https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html

23. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE. 22 avr 2013;8(4):e61217.

24. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 15 juill 2014;30(14):2068-9.

25. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, Lees JA, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. Genome Biol. 22 juill 2020;21(1):180.

26. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. PLOS ONE. 10 mars 2010;5(3):e9490.

27. Marin J, Clermont O, Royer G, Mercier-Darty M, Decousser JW, Tenaillon O, et al. The Population Genomics of Increased Virulence and Antibiotic Resistance in Human Commensal Escherichia coli over 30 Years in France. Applied and Environmental Microbiology. 18 juill 2022;88(15):e00664-22.

28. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. Microbial Genomics. 2018;4(7):e000192.

29. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. BMC Genomics. 26 nov 2008;9(1):560.

30. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for Escherichia coli Subtyping Based on fimH Alleles. Journal of Clinical Microbiology. 25 juill 2017;55(8):2538-43.

31. Ingle DJ, Valcanis M, Kuzevski A, Tauschek M, Inouye M, Stinear T, et al. In silico serotyping of E. coli from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. Microbial Genomics. 2016;2(7):e000064.

32. Seemann T. tseemann/abricate [Internet]. 2025 [cité 20 sept 2025]. Disponible sur: https://github.com/tseemann/abricate

33. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 1 déc 2020;75(12):3491-500.

34. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. Antimicrob Agents Chemother. juill 2014;58(7):3895-903.

35. Therneau T. A package for survival analysis in R.

36. Wei LJ. The accelerated failure time model: A useful alternative to the cox regression model in survival analysis. Statistics in Medicine. 1992;11(14-15):1871-9.

37. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. In: Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G, éditeurs. Selected Papers of Hirotugu Akaike [Internet]. New York, NY: Springer; 1998 [cité 11 sept 2025]. p. 215-22. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_16

38. Yamashita T, Yamashita K, Kamimura R. A Stepwise AIC Method for Variable Selection in Linear Regression. Communications in Statistics - Theory and Methods. 3 oct 2007;36(13):2395-403.

39. CRBIP-Catalogue [Internet]. [cité 20 sept 2025]. Disponible sur: https://catalogue-crbip.pasteur.fr/recherche_catalogue.xhtml

40. Meredith HR, Andreani V, Ma HR, Lopatkin AJ, Lee AJ, Anderson DJ, et al. Applying ecological resistance and resilience to dissect bacterial antibiotic responses. Science Advances. 5 déc 2018;4(12):eaau1873.

41. Full article: Enterobacteriaceae and Bacteroidaceae provide resistance to travel-associated intestinal colonization by multi-drug resistant Escherichia coli [Internet]. [cité 3 juill 2025]. Disponible sur: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2022.2060676

42. Langelier C, Graves M, Kalantar K, Caldera S, Durrant R, Fisher M, et al. Microbiome and Antimicrobial Resistance Gene Dynamics in International Travelers. Emerg Infect Dis. juill 2019;25(7):1380-3.

29. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic Escherichia coli strains. BMC Genomics. 26 nov 2008;9(1):560.

30. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, et al. Development of a Web Tool for Escherichia coli Subtyping Based on fimH Alleles. Journal of Clinical Microbiology. 25 juill 2017;55(8):2538-43.

31. Ingle DJ, Valcanis M, Kuzevski A, Tauschek M, Inouye M, Stinear T, et al. In silico serotyping of E. coli from short read data identifies limited novel O-loci but extensive diversity of O:H serotype combinations within and between pathogenic lineages. Microbial Genomics. 2016;2(7):e000064.

32. Seemann T. tseemann/abricate [Internet]. 2025 [cité 20 sept 2025]. Disponible sur: https://github.com/tseemann/abricate

33. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 1 déc 2020;75(12):3491-500.

34. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. Antimicrob Agents Chemother. juill 2014;58(7):3895-903.

35. Therneau T. A package for survival analysis in R.

36. Wei LJ. The accelerated failure time model: A useful alternative to the cox regression model in survival analysis. Statistics in Medicine. 1992;11(14-15):1871-9.

37. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. In: Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G, éditeurs. Selected Papers of Hirotugu Akaike [Internet]. New York, NY: Springer; 1998 [cité 11 sept 2025]. p. 215-22. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_16

38. Yamashita T, Yamashita K, Kamimura R. A Stepwise AIC Method for Variable Selection in Linear Regression. Communications in Statistics - Theory and Methods. 3 oct 2007;36(13):2395-403.

39. CRBIP-Catalogue [Internet]. [cité 20 sept 2025]. Disponible sur: https://catalogue-crbip.pasteur.fr/recherche_catalogue.xhtml

40. Meredith HR, Andreani V, Ma HR, Lopatkin AJ, Lee AJ, Anderson DJ, et al. Applying ecological resistance and resilience to dissect bacterial antibiotic responses. Science Advances. 5 déc 2018;4(12):eaau1873.

41. Full article: Enterobacteriaceae and Bacteroidaceae provide resistance to travel-associated intestinal colonization by multi-drug resistant Escherichia coli [Internet]. [cité 3 juill 2025]. Disponible sur: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2022.2060676

42. Langelier C, Graves M, Kalantar K, Caldera S, Durrant R, Fisher M, et al. Microbiome and Antimicrobial Resistance Gene Dynamics in International Travelers. Emerg Infect Dis. juill 2019;25(7):1380-3.

43. Nadimpalli ML, Sehgal N, Rojas-Salvatierra L, Gilman RH, Earl AM, Worby CJ, et al. Role of the gut microbiome in frequent gut colonization with extended-spectrum β lactamase-producing Enterobacterales among Peruvian children. Gut Microbes. 17(1):2541029.

44. Khan I, Bai Y, Zha L, Ullah N, Ullah H, Shah SRH, et al. Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection. Front Cell Infect Microbiol. 23 déc 2021;11:716299.

45. Martin AJM, Serebrinsky-Duek K, Riquelme E, Saa PA, Garrido D. Microbial interactions and the homeostasis of the gut microbiome: the role of Bifidobacterium. Microbiome Res Rep. 2023;2(3):17.

46. Du J, Yang H. 2'-Fucosyllactose as a prebiotic modulates the probiotic responses of *Bifidobacterium bifidum*. Current Research in Food Science. 1 janv 2025;10:100975.

47. Chang KC, Nagarajan N, Gan YH. Short-chain fatty acids of various lengths differentially inhibit Klebsiella pneumoniae and Enterobacteriaceae species. mSphere. 28 févr 2024;9(2):e0078123.

48. Moubareck C, Lecso M, Pinloche E, Butel MJ, Doucet-Populaire F. Inhibitory Impact of Bifidobacteria on the Transfer of β-Lactam Resistance among Enterobacteriaceae in the Gnotobiotic Mouse Digestive Tract. Appl Environ Microbiol. févr 2007;73(3):855-60.

49. Ljungquist O, Kampmann C, Resman F, Riesbeck K, Tham J. Probiotics for intestinal decolonization of ESBL-producing Enterobacteriaceae: a randomized, placebo-controlled clinical trial. Clin Microbiol Infect. avr 2020;26(4):456-62.

50. Grimm V, Westermann C, Riedel CU. Bifidobacteria-Host Interactions—An Update on Colonisation Factors. Biomed Res Int. 2014;2014:960826.

51. Bottacini F, Ventura M, van Sinderen D, O'Connell Motherway M. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. Microbial Cell Factories. 29 août 2014;13(1):S4.

52. Zhuang Y, Gao D, Jiang W, Xu Y, Liu G, Hou G, et al. Core microbe Bifidobacterium in the hindgut of calves improves the growth phenotype of young hosts by regulating microbial functions and host metabolism. Microbiome. 16 janv 2025;13(1):13.

53. O'Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. Front Microbiol [Internet]. 15 juin 2016 [cité 28 sept 2025];7. Disponible sur: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00925/full

54. Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, et al. Carbon nutrition of Escherichia coli in the mouse intestine. Proceedings of the National Academy of Sciences. 11 mai 2004;101(19):7427-32.

55. Morel-Journel T, Lehtinen S, Cotto O, Amia R, Dion S, Figueroa C, et al. Residence-colonization trade-off and niche differentiation enable coexistence of Escherichia coli phylogroups in healthy humans. ISME J. 1 janv 2025;19(1):wraf089.

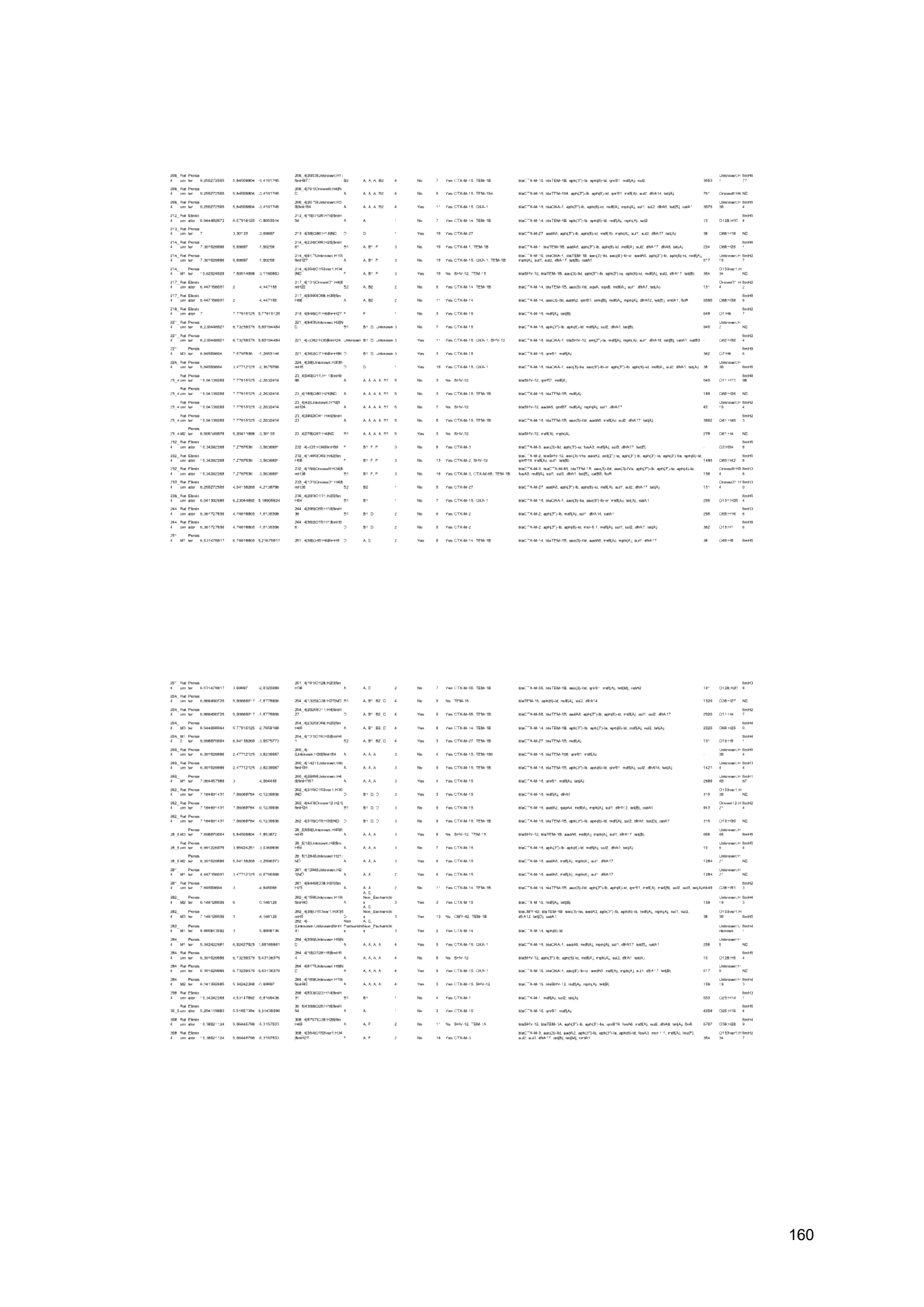
Supplementary data

Table 1. Traveler's characteristics

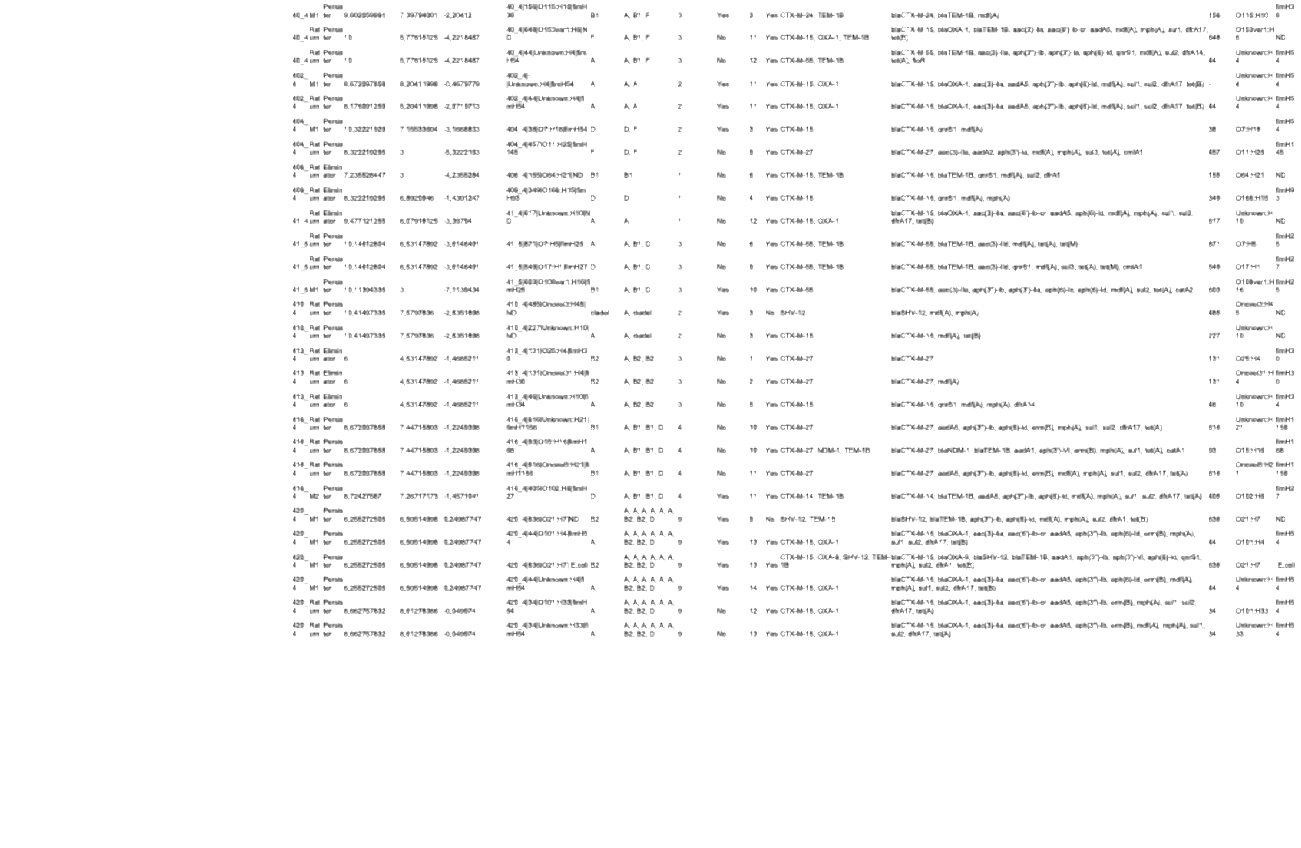
	Eliminators (No.)	Persisters (No)	*P*Value
Total	75	75	
Sex			
M	24	25	0,89
Age, yo			
18-34	50	50	1,00
34-49	18	11	0,26
49-64	4	10	0,12
≥ 65	3	4	0,73
Digestive disorders			
Yes	42	35	0,48
Antibiotic use			
Yes	22	17	0,52
Healthcare use during travel			
Yes	2	6	0,18
Malaria chemoprophylaxis			
No	21	28	0,31
Other	32	29	0,79
Other and antibiotic	3	8	0,14
Doxycycline	9	5	0,42
Other different than Doxycycline	10	3	0,09
Travel destination			
Asia	31	60	0,00
South America	18	9	0,12
Sub-Saharan Africa	26	6	0,00
Type of travel			
Mixte	7	11	0,36
Organized tour, Hotel	18	16	0,86
Backpacking	32	37	0,54
Friends_Family	18	9	0,12
All inclusive resort	0	2	0,25
Occupation			
Professionals, Senior managers	31	30	1,00
Unemployed	20	23	0,65
Employee	9	7	0,80
Middle managers	10	11	0,83
Small business owners and independent professionals	0	1	0,50
Laborers	5	2	0,45
Missing data	1	1	1,00

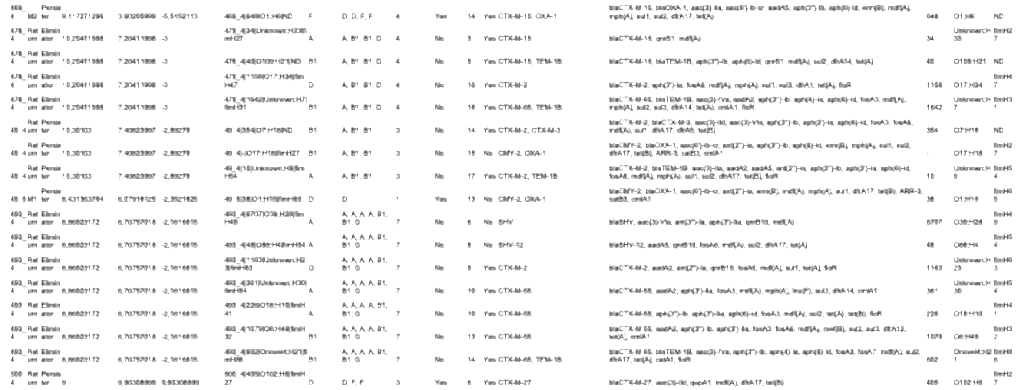
Table 2: Unique Escherichia coli strains identified in the travelers. 3GC_R_EB: Enterobacterales resistant to third generation cephalosporins. ARG: antibiotic resistance gene.

Subject	Time point	Enterobacterales_density	3GC_R_EB density	3GC_R_EB abundance	Relative Strain_code	Phylogroup	Phylogroup_by_subject	N_unique strains	Presence Beyond otsrm	rN_RG	A_4B	CTX Beta_lactamases	ARG_list	ST_wick	Wer Serotype	flimH
1_8	Rat Elimination	9.477121265	6.806179507	-2.6706413	1_5[642(OlcrveiZ:1+408[fim H54	A	A, A	2	No	6	Yes	CTX-M-55, TEM-1B,	blaC^X-M-55, blaTEM-1Pl, oaxc(3)-IId, mdf[A], tet(A), tet(M)	542	Cmcvei2^94 0	flimH3 08
1_8	Rat Elimination	9.477121265	6.806179507	-2.6706413	1_5[6868[Unknown:+(2t6[fl mH28	A	A, A	2	No	14	Yes	CTX-M-55, TEM-1B,	blaC^X-M-55, blaTEM-1P[, oaxc(3)-IId, oaxbA1 aph(3")-Ib, aph(3")-Ia, aph(6)-Id, qnrS1, mdf[A], mel[B], oul2, oul3, dfrA12, tet[A], tet[M], floR	5866	Unknowncr^ 26	flimH2 3
10_2	Rat Elimination	6.8678227891	5_2304.4892	-1.8471782	10_2[67:7[Unknown:+100[N O	A	A	·	No	14	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, blaOXA-1, oaxc(3)-IIa, oaxc(6')-Ib-cr oaxbA5, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1 oul2, dfrA17, tet[A], tet[M]	617	Unknowncr^ 10	flimH2 ND
102_ 1	Rat Elimination	9.100637054 5	3	-6.1003705	102_1[-[Unknown:Unknown@fim H54	D	D, D	2	No	8	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, qnrS1 mdf[A], oul2, dfrA14, tet[A]	-	Unknown:Cu nknown	flimH5 4
102_ 1	Rat Elimination	9.100637054 5	3	-6.1003705	102_1[5[S[5 I IO:1S3vcei1.H9 8mH54	D	D, D	2	No	8	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, qnrS1 mdf[A], oul2, dfrA14, tet[A]	5861	O1 ISvar1.H 9	flimH5 4
103_ 1	Rat Persister	11.02116869	8.7239.8376	-2.2857895	103_1[4-43[Unknown:.H2[1 flmH24	B1	A, B1 D	3	No	11	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, oaxc(3)-IId, oaxbA2, qaqaA4, mdf[A], mph[A], oul1, dfrA12, tet(Tc), cmlA1	643	Unknown:^^	flimH2 4
103_ 1	Persister	9.6020956691	6.8061789	-2.795868	103_1[4459[O102:H8[flmH 27	D	A, B1 D	3	Yes	9	Yes	CTX-M-15, OXA-1	blaC^X-M-15, blaOXA-1, oaxc(3)-IIa, oaxc(6')-Ib-cr oaxbA5, mdf[A], mph[A], oul1, dfrA17	405	O1 02:H8	flimH2 7
103_ 1	Persister	9.6020956691	6.5440568604	-3.6791852	103_1[227[Unknown:H10[64	A	A, B1 D	3	Yes	2	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, mdf[A]	227	Unknown:^^ 10	flimH2 ND
104_ 1	Rat Persister	6.3978400688	7.2041.1898	8.8361.7887	104_1[3-45[C:23:H 1S[N D	D	D, D	2	Yes	11	Yes	CTX-M-14, TEM-1B,	blaC^X-M-14, blaTEM-1P[, oaxc(3)-IId, oaxbA2 qnrS1 mdf[A], mel[B], oul3, dfrA12, tet[A], cmlA1	3845	O2:9:H16	ND
104_ 1	Rat Persister	9.6020956691	7.5440568604	-0.9579819	104_1[-[O2:3:H 1S[ND	D	D, D	2	Yes	6	Yes	CTX-M-14, TEM-1B,	blaC^X-M-14, blaTEM-1P[, oaxc(3)-IId, qnrS1 mdf[A], tet(A)	-	O2:9:H16	ND
104_ 4	Rat Persister	8.6758612.83	4	-4.8758613	104_4[1959[O174:H28[flm H38	B1	B1	1	No	8	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, oaxbA2, qaqaA4 mel[B], oul1 dfrA12, tet[B], cmlA1	156	O174:H28	flimH3 8
107_ 1	Rat Elimination	9.2582725585	3.4771212.5	-1.7761513	107_1[839[O21:H7[ND	B2	A, B2	2	No	8	No	St-IV-12, TEM-1	blaStHV-12, blaTEM-1B, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, mdf[A], oul2, dfrA1 tet[B]	539	O21:H7	ND
107_ 1	Rat Elimination	9.2582725585	3.4771212.5	-1.7761513	107_1[-[28[Unknown:H9[fl mH54	A	A, B2	2	No	10	Yes	CTX-M-55, TEM-1B,	blaC^X-M-55, blaTEM-1P[, oaxbA2, qnrS1 mdf[A], oul3, dfrA12, tet[B], catbA2, cmlA1	10	Unknown:^^ 9	flimH5 4
11_1	Rat Persister	8.9[9876882	4.7761512.5	-4.1405288	11_1[4-7[Unknown:H9[N O	A	A, A, D	3	No	5	Yes	CTX-M-14, TEM-1B,	blaC^X-M-14, blaTEM-1B, oaxc(3)-IId, ermB[N, mdf[A]	617	Unknown:^^ 9	ND
11_1	Rat Persister	8.9[9876882	4.7761512.5	-4.1405288	11_1[38[O:182:H8[flmH8	D	A, A, D	3	No	13	Yes	CTX-M-14, TEM-1B,	blaC^X-M-14, blaTEM-1B, oaxc(3)-IId, oaxbA5 aph(3")-Ib aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1 oul2, dfrA17, tet[D], cmlA1	38	O1 02:H8	flimH5 4
11_1	Rat Persister	8.9[9876882	4.7761512.5	-4.1405288	11_1[44[Unknown:H4[flmH 54	A	A, A, D	3	Yes	13	Yes	CTX-M-15, OXA-1	blaC^X-M-15, blaOXA-1, oaxc(3)-IIa, oaxbA5 aph(3")-Ib aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1 oul2, dfrA17, tet[A], floR	64	Unknown:^^ 4	flimH5 4
11_2	Rat Elimination	9.7781512.8	6.5790836	-3.1983677	11_2[67:7[Unknown:.Unkn own@fim H29	A	A	1	No	12	Yes	CTX-M-15, OXA-1	blaC^X-M-15, blaOXA-1, oaxc(6')-Ib-cr oaxbA5 aph(3")-Ib aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1 oul2, dfrA17, tet[B]	617	Unknown:Cu nknown	flimH2 9
113_ 4	Rat Elimination	6.6388406861	3_3011.9	-5.5378191	113_4[4488[O29:+(1[flmH 39	B1	B1	1	No	16	Yes	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1B	blaC^X-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B, oaxc(6')-Ib-cr, oaxbA5 aph(3")-Ib aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1 oul2, dfrA17, tet[B]	648	O29:+116	flimH3 8
118_ 4	Rat Elimination	7	4.7076701.8	-2.2924286	118_4[3-1[O:1.301:+(2?[ND	D	D, D	2	No	10	Yes	CTX-M-14, TEM-1B,	blaC^X-M-14, blaTEM-1P[, oaxc(3)-IIa, oaxbA5 mel[A], mph[A], oul1, dfrA17, tet[A], cmlA1	31	O1 38:H27	ND
118_ 4	Rat Elimination	7	4.7076701.8	-2.2924286	118_4[68[Unknown[21:H4[fl mH27	D	D, D	2	No	11	Yes	CTX-M-27	blaC^X-M-27, oaxbA5, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, ermB[, mdf[A], mph[A], oul1, oul2, dfrA17, tet(A)	68	Unknown[21 4	flimH2 7
120_ 4	Rat Elimination	9.1768912.89	6.3424.2268	-2.8336886	120_1[5[6[O179:+(38[ND	B1	B1, D, F, Unknown	4	No	8	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, qnrS1 mdf[A]	58	O179:H30	ND
120_ 4	Rat Elimination	9.1768912.89	6.3424.2268	-2.8336886	120_1[-[2126[Q25:.H16[flm H1 1+1 58	Unknown	B1, D, F, Unknown	4	No	7	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, aph-(3")-Ib aph-(6')-Id qnrS1 mdf[A], oul2 dfrA14	1312	O26:+116	flimH1 08
120_ 4	Rat Elimination	9.1768912.89	6.3424.2268	-2.8336886	120_1[4940[O:.H16[flmH 65	D	B1, D, F, Unknown	4	No	8	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, aph(3")-Ib aph(6)-Id, qnrS1 mdf[A], oul2, dfrA14, tet[A]	4640	O1 9H16	flimH6 5
168_ 4	Rat Elimination	6.7993460549	7.9026.9999	-1.1972836	168_4[9963[C15:H34[flm H54	D	D	·	No	4	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, qnrpA4, mdf[A], dfrA12	9463	O15:+H4	flimH5 4
169_ 4	Rat Elimination	9.5898115.25	7.1368.7808	-3.7996432	169_4[48[O9:+11 flmH84	A	A, A	2	No	8	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, qnrS1 mdf[A], oul2, dfrA14, tet[A]	48	O9:H11	flimH8 4
169_ 4	Rat Elimination	9.5898115.25	7.1368.7808	-3.7996432	169_4[8:4[O6[C61:.H 1S[flm H54	A	A, A	2	No	8	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, qnrS1 mdf[A], oul2, dfrA14, tet[A]	6406	O61:+116	flimH5 4
170_ 4	Persister	9.8453.9804	8.4148.7335	-1.4.3012.47	170_4[5:4[O:2[H8:H28[flm H27	A	A, A, A, D, E	5	Yes	6	No	St-IV-12	blaStHV-12, aaxbA2, mdf[A], oul3, tet(A), cmlA1	5420	O68:+128	flimH2 7
170_ 4	Rat Persister	9.1363533768	7.8627.9763	-1.4675789	170_4[- [Unknown:+1[8[flmH54	A	A, A, A, D, E	5	Yes	4	No	St-IV-12	blaStHV-12, mdf[A], mph[A], tet[B]	-	Unknown:^^ 30	flimH5 4
170_ 4	Rat Persister	9.1363533768	7.8627.9763	-1.4675789	170_4[- [Unknown:+1[45[flmH54	E	A, A, A, D, E	5	No	8	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, aph-(3")-Ib aph-(6')-Id, ere(A), mdf[A], mph[A], sul1, sul2, dfrA5	-	Unknown:^^ 45	flimH5 4
170_ 4	Persister	9.278753.8	8.4913.8168	-1.7673819	170_4[4959[O:102.:H8[flmH 27	D	A, A, A, D, E	5	No	19	Yes	CTX-M-15, OXA-1	blaC^X-M-15, blaOXA-1, oaxc(3)-IIa, oaxc(6')-Ib-cr oaxbA5, mdf[A], mph[A], sul1, dfrA17, tet(B)	405	O1 02:H8	flimH2 7
170_ 4	Persister	9.1.7.8091.28	7.5812.4124	-2.49488	170_4[227[Unknown:.H10[ND	A	A, A, A, D, E	5	No	2	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, mdf[A]	227	Unknown:^^ 10	ND
173_ 4	Rat Persister	7.3011295886	4.8061789.7	-2.49488	173_4[14[O:44:+11[ND	D	D	·	Yes	2	Yes	CTX-M-14	blaC^X-M-14, mdf[A]	414	O44:+118	ND
18_3	Rat Elimination	6.7[6803344	3.9038.8896	-2.8125134	18_3[4-4[Unknown:.H4[flmH54	A	A	·	No	12	Yes	CTX-M-15, OXA-1	blaC^X-M-15, blaOXA-1, oaxc(6')-Ib-cr oaxbA5 aph(3")-Ib aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1, oul2, dfrA17, tet[B]	64	Unknown:^^ 4	flimH5 4
183_ 4	Rat Persister	9.167317.33	8.5852.5734	-1.4675789	183_4[227[Unknown:.H10[ND	A	A, A, A, D	4	No	8	Yes	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1B	blaC^X-M-15, blaOXA-1, mdf[A], tet(B), oaxA^	227	Unknown:^^ 10	ND
183_ 4	Rat Persister	9.167317.33	8.5852.5734	-1.4675789	183_4[62868[Unknown.H2 0@fim H54	A	A, A, A, D	4	No	12	Yes	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1B	blaC^X-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B, oaxc(3)-IId, oaxbA5 aph(3")-Ib, aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul2, dfrA1, tet(B)_, oaxA1	5288	Unknown:^^ 20	flimH5 4
183_ 4	Rat Persister	6.6723937858	7.6025.8906	-1.6706379	183_4[36[O12:H:30[flmH15	D	A, A, A, D	4	Yes	14	Yes	CtxM-2, CTX-M-14, TEM-1B	blaCtxM-2, blaC^X-M-14, blaTEM-1B, oaxc(3)-IId, oaxbA5 aph(3")-Ib, aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1 oul2, dfrA17, tet[B], oaxA1	38	O2:H30	flimH5 ND
183 4	Persister	7.6868700684	4_3011.9	-3.39794	183_4[1312[O:1.1H16[flm H54	A	A, A, A, D	4	Yes	13	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-1P[, oaxc(3)-IId, oaxbA2 aph(3")-Ib aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], sul1 oul2, dfrA12, tet[B], oaxA1	1312	O11:+116	flimH5 4
19_1	Rat Persister	8.3012295886	7.4471580.3	-0.853872	19_1[-[Unknown:+1[45[ND	A	A, A, A, D, F	5	Yes	7	Yes	CTX-M-27	blaC^X-M-27, oaxbA5, ermB[^, mdf[A], mph[A], sul1, dfrA17	-	Unknown:^^ 45	ND
19_1	Rat Persister	8.3012295886	7.4471580.3	-0.853872	19_1[38[O2:H30@fim H8	D	A, A, A, D, F	5	Yes	13	Yes	CtxM-2, CTX-M-14, TEM-1Pl	blaCtxM-2, blaC^X-M-14, blaTEM-1B, oaxbA5, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, mdf[A], mph[A], oul1, oul2, dfrA17, tet[D], oaxA1	38	O2:H30	flimH5 4
19_1	Rat Persister	8.3012295886	7.4471580.3	-0.853872	19_1[12868[O7:1 +(32@fim H54	A	A, A, A, D, F	5	Yes	13	Yes	CTX-M-27, TEM-1B,	blaC^X-M-27, blaTEM-1P[, oaxbA5, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, qnrS1, ermB[, mdf[A], oul1, oul2, dfrA14, dfrA17, tet[A]	1286	O7:1 +(32	flimH4 1
19_1	Persister	5.3232116285	4.6791812.5	-1.2.43858	19_1[227[Unknown:H10[N O	A	A, A, A, D, F	5	Yes	5	Yes	CTX-M-15, OXA-1	blaC^X-M-15, blaOXA-1, mdf[A], tet(B), oaxA^	227	Unknown:^^ 10	ND
19_1	Persister	5.3232116285	4.6791812.5	-1.2.43858	19_1[64[O:1 +6[ND	F	A, A, A, D, F	5	Yes	14	Yes	CTX-M-15, OXA-1, TEM-1B	blaC^X-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B, oaxc(3)-IIa, oaxc(6')-Ib-cr oaxbA2, aph(3")-Ib, aph(6)-Id, aph(3")-Ia, oaxbA5 ermB[, mdf[A], mph[A], sul1 oul2 dfrA12 tet(B)	648	O1 9H6	ND
19_5	Rat Elimination	6.7242.7587	4.4471580.3	-2.2771176	19_5[643[Unknown:+16[N O	B1	B1	1	No	8	No	St-IV-12, TEM-1	blaStHV-12, blaTEM-1B, aaxbA5 mdf[A], mph[A], sul1, dfrA17 tet(B)	940	5	ND
2_1	Rat Persister	9.6020956691	7.4148.7335	-2.1878686	2_1[1788[Unknown:H7:+40[fl mH28	A	A, D	2	No	6	Yes	CTX-M-27	blaC^X-M-27, ermB[, mdf[A], mph[A], tet[A], catbA1	1788	Unknown:^^ 0	flimH2 3
2_1	Rat Persister	9.6020956691	7.4148.7335	-2.1878686	2_1[68[O:1 61:H16[flmH27	D	A, D	2	No	10	Yes	CTX-M-27	blaC^X-M-27, aaxc(3)-IIa, aaxbA5, ermB[, mdf[A], mph[A], sul1 dfrA17 tet(A), catbA1	68	O1 5:+116	flimH2 7
2_8	Rat Elimination	9.1368770886	3	-6.1368791	2_8[1722[O7:1 +(58[flmH15 3	F	F	1	No	3	Yes	CTX-M-14, TEM-1B,	blaC^X-M-14, blaTEM-1P[, tet[A]	1722	O1 H28	flimH1 53
201_ 4	Rat Elimination	9.7781512.5	7.3424.2268	-2.4357286	201_4[848[O1:+16[ND	F	F	1	No	2	Yes	CTX-M-14	blaC^X-M-14, mdf[A]	648	O1 9H6	ND
204_ 4	Rat Persister	7.2.5411.888	7.2041.1898	-3	204_4[44[Unknown:.H4[fl mH54	A	A	1	Yes	11	Yes	CTX-M-15, TEM-1B,	blaC^X-M-15, blaTEM-176, oaxc(3)-IId, oaxbA5, aph(3")-Ia, mdf[A], mph[A], sul1, sul3, dfrA17, tet[A]	64	Unknown:^^ 4	flimH5 4
205_ 4	Rat Persister	9.1.7.8091.28	6.0413.9268	-1.7623591	205_4[7448[Unknown:.H8[fl mH54	A	A, alborel6	2	Yes	12	Yes	CTX-M-1, OXA-1	blaC^X-M-1, blaOXA-1, oaxbA5 aph-(3")-Ib, aph-(3")-Ia, aph-(6')-Id mef(A), sul1 dfrA17 tet[A], tet[B], catA1	744	Unknown:^^ 9	flimH5 4
205_ 4	Rat Persister	9.2041.1898	6.3222.1829	-2.881.9917	205_4[2857[Unknown:.Un known@fim H643	alborel9	A, alborel9	2	No	16	Yes	CTX-M-55	blaC^X-M-55, aaxc(3)-IId, oaxbA2 aph(3")-Ib, aph(3")-Ia aph(6)-Id qnrS1, mcr-3.2, mdf[A], oul2, oul3, dfrA12, tet[A], cmlA1, floR	2587	Unknown:Cu nknown	flimH6 43
206_ 4	Rat Persister	9.2582725585	6.8458.6804	-3.4101745	206_4[617[Unknown:H8[N O	A	A, A, A, B2	4	No	8	Yes	CTX-M-15	blaC^X-M-15, aph-(3")-Ib aph-(6')-Id, mdf[A], oul2	617	Unknown:^^ 9	ND



| | | |





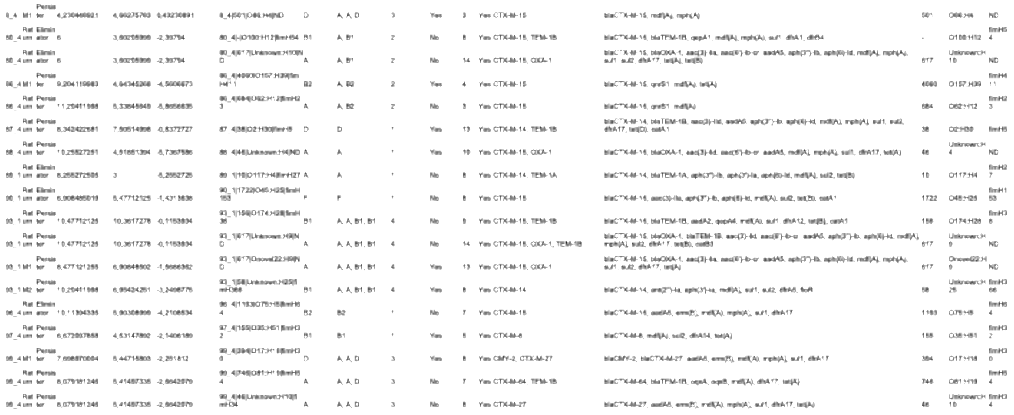


Table 3: Details of the metagenome-assembled genomes (MAGs) assigned to Escherichia coli. ARG: antibiotic resistance gene.

MAG_name	Total_length_bp	Phylogroup	Number_of_contigs	Largest_contig_size_(bp)_	GC_(%)	N50	N75	L50	L75	Ns_per_100_kbp	ARG_list	ST_Warwick	Serotype	*fimH*
103_1_Bin_output.28	4528747	B2	766	55759	50.8	7752	4124	13	34	0.00	aadA1, dfrA1	-	O81:H27	fimH5 42
46_1_Bin_output.21	2307776	A	744	13127	51.4	3301	2417	24	44	0.00	dfrA5	-	Unknown: Unknown	fimH2 7
126_1_Bin_output.28	4673934	F	87	254580	50.6	7940	4942	5	9	0.00	blaCTX-M-14	648	O1:H6	ND
133_4_Bin_output.23	6440596	A	360	223268	51.0	3557	1550	19	38	0.00	qnrB18	-	Unknown: Unknown	fimH8 58
251_4_Bin_output.62	4544344	B2	336	95948	50.6	2112	1095	46	99	0.00	aadA1, blaSHV-1, blaSHV-102, blaSHV-48, sul1	-	Unknown: H1	fimH1 0
59_4_Bin_output.5	3563718	D	856	25913	50.9	1	1	66	0	0.00	blaCTX-M-55, aadA1	-	O1:Unknown	ND
11_1_Bin_output.1	4342255	A	249	148279	51.0	4811	3097	22	46	0.00	catA1, tet(A)	43	Unknown: H2	fimH8 59
66_5_Bin_output.69	4938199	F	108	166939	50.4	3347	1597	8	4	0.00		2141	O107:H39	ND
308_4_Bin_output.3	4835401	D	231	116931	50.6	7689	5156	9	1	9	23	43	0.00	fimH2
41_4_Bin_output.81	4709548	D	56	343233	50.7	3313	1805	0	1	0	43	93	0.00	69	O25:H18	7
126_4_Bin_output.18	4623058	B1	83	206674	50.8	1388	8655	1	96	6	11	22	0.00	Unknown: H1	ND
312_4_Bin_output.33	4607193	B2	42	378074	50.7	8822	4376	0	5	0	19	35	0.00	38	8	ND
87_4_Bin_output.76	4578785	D	278	173110	50.9	1674	1088	3	3	7	45	5	0.00	33	O91:H14	fimH4 46
131_1_Bin_output.32	4496122	A	167	141480	50.9	2888	1388	7	3	1	31	63	0.00	95	O45:H7	ND
457_4_Bin_output.4	4489094	B2	339	68817	50.6	4673	2707	8	8	7	62	2	0.00	Unknown: H4	ND
381_4_Bin_output.32	4470667	A	99	302639	50.9	2238	1134	3	1	7	19	37	0.00	1286	Unknown: H5	ND
244_4_Bin_output.13	4470085	B2	224	108795	50.9	7340	4303	0	5	0	44	86	0.00	-	O45:H16	ND
218_4_Bin_output.86	4465360	B2	730	49381	50.5	3415	1980	9	8202	4660	15	34	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH3 4
214_4_Bin_output.56	4448330	B2	167	162253	50.7	5259	2966	3	5	3	8	0	0.00	-	O8:Unknown	fimH2 1
296_4_Bin_output.27	4434268	C	242	85511	50.8	3312	1864	8	0	0	28	56	0.00	-	O166:H7	ND
232_4_Bin_output.25	4386484	D	469	52351	50.7	1496		6	0	7479	47	90	0.00	-	O8:Unknown	ND
440_4_Bin_output.68	4384358	A	80	171851	50.9	7826	5022	4	3	4	19	36	0.00	10	O7:H45	fimH4 4
															O48:H32	fimH5 4

313_4_Bin_out put.51	3573256	Unknown	675	29644	51.43	6580	4009	16 9	34 5	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
39_5_Bin_outp ut.1	3550594	A	682	26611	51.17	6496	3838	17 3	35 1	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
183_4_Bin_out put.21	3496332	Unknown	688	33231	51.35	6314	3813	17 0	35 2	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
206_4_Bin_out put.68	3438122	A	294	68307	51.42	2234 5	9085	10 51	9	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
152_1_Bin_out put.28	3378971	F	825	47646	50.72	4683	2987	22 5	44 8	0.00	-	Unknown: H6	fimH2 7
62_5_Bin_outp ut.83	3354847	Non Escherichia	666	39814	51.11	6120	3568	14 8	33 0	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH3 98
404_4_Bin_out put.32	3329774	B1	34	297738	50.96	1588 6	9703 6	8	15	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH5 42
387_4_Bin_out put.22	3318930	B1	30	364144	51.03	1686 40	1240 43	7	12	0.00	-	O114 Unknown	fimH3 2
14_4_Bin_outp ut.20	3173816	A	70	231343	51.27	7660 3	4248 0	13	28	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH3 9
379_4_Bin_out put.35	3052204	A	338	56806	51.73	1681 8	6591	14 58	2	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
523_4_Bin_out put.20	3033382	B2	784	22452	51.15	4253	2847	22 1	43 8	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH5 4
363_4_Bin_out put.122	2932899	B2	17	375749	50.81 3	1912 46	1370 02	6	10	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH6 4
282_4_Bin_out put.1	2830833	B2	866	14691	51.37	3536	2440	26 4	50 9	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
159_4_Bin_out put.11	2770729	Unknown	77	205908	50.92	7573 0	3257 0	12	25	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
4_2_Bin_outpu t.28	2732232	Non Escherichia	39	214742	51.01	1169 21	8222 7	9	15	0.00	-	O9:H4	fimH3 4
19_1_Bin_outp ut.20	2663647	Non Escherichia	26	348147	51.32	1616 00	1088 79	6	11	0.00	-	O71:H32	ND
351_4_Bin_out put.77	2551788	Non Escherichia	61	191712	51.15 6	5579 4	3903 8	14	27	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
13_3_Bin_outp ut.11	2535290	Unknown	68	244764	49.73	5824 2	3295 5	11	26	0.00	-	O18ac/O18: H1	ND
327_4_Bin_out put.75	2529494	D	30	253173	51.33	1273 54	9061 7	7	13	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
33_5_Bin_outp ut.68	2525856	Unknown	819	13832	51.26	3292	2406	27 2	49 6	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
236_4_Bin_out put.46	2522162	Unknown	54	190379	51.47 3	7881 7	4134 1	11	23	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
161_1_Bin_out put.79	2500441	Non Escherichia	44	237998	51.34	1192 95	5761 1	8	17	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH5 4

337_4_Bin_out put.45	2464545	Non Escherichia	47	290482	51.53	8667 1	4710 9	8	18	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
213_4_Bin_out put.42	2368357	Unknown	67	153102	50.82	5722 9	3093 9	15	28	0.00	-	Unknown: H4 1	ND
86_4_Bin_outp ut.12	2359033	Unknown	45	240180	50.14	1229 46	4339 9	8	16	0.00	-	O75:H38	ND
369_4_Bin_out put.49	2330706	F	16	693286	50.42	2391 47	1939 12	3	6	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH5 8
36_4_Bin_outp ut.21	2259964	Non Escherichia	278	46667	51.13	1316 6	5668	11 48	8	0.00	-	Unknown: H4	ND
125_4_Bin_out put.17	2259241	Non Escherichia	624	15567	51.71	3975	2751	19 3	36 3	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
170_4_Bin_out put.63	2200624	Unknown	85	95929	50.84	4789 7	2557 0	16	33	0.00	-	Unknown: H3 4	fimH1 067
262_4_Bin_out put.47	2136112	F	157	96022	51.12	2995 3	9912	23	48	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
339_4_Bin_out put.74	2089904	A	113	85404	51.93	3374 6	1975 5	23	43	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
201_4_Bin_out put.42	2041909	A	615	13106	51.68	3635	2520	18 9	35 8	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
69_1_Bin_outp ut.44	2026944	Non Escherichia	608	16758	51.80	3548	2590	19 5	36 3	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH4 3
80_4_Bin_outp ut.67	1971614	A	607	13517	51.59	3497	2507	19 3	35 9	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH2 7
357_4_Bin_out put.71	1899775	Non Escherichia	25	316288	51.38	1262 66	5807 6	6	12	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH2 4
40_4_Bin_outp ut.52	1677017	B2	11	530748	51.02	3575 72	2039 04	2	4	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
30_5_Bin_outp ut.48	1632245	Unknown	15	391425	50.09	1551 04	1194 39	4	7	0.00	-	O99:H33	ND
52_4_Bin_outp ut.103	1508338	Non Escherichia	231	40103	51.83	8261	4645	11 49	0	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
102_1_Bin_out put.59	1465134	Non Escherichia	15	365215	51.11	1837 89	1075 01	3	6	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH1 0
66_4_Bin_outp ut.30	1337407	Non Escherichia	533	14695	51.46	2489 6	1963	19 0	34 1	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
410_4_Bin_out put.79	1249354	Non Escherichia	442	13118	51.95	2920	2228	15 4	27 4	0.00	-	Unknown: Unknown	ND
2_1_Bin_outpu t.23	850981	B1	349	5959	51.87	2476	2020	13 4	23 0	0.00	-	Unknown: Unknown	fimH2 7

1_5_Bin_outpu t.28	641732	Non Escherichi a	240	10925	51.23	2646	2123	85	15 1	0.00	-	Unknown: Un known	ND

Table 4: Explanatory factors and AIC of the AFT models selected by stepwise AIC method, for each set of explanatory factors and each persistence time distribution. The AFT model selected for each set of explanatory factors is highlighted in bold.

Set of factors	Time distribution	Factors considered	Factors selected	AIC
Phylogroup and dominant strain	exponential	phylogroup + dominant	phylogroup + dominant	472.745
	Weibull	phylogroup + dominant	phylogroup + dominant	474.564
	log-normal	**phylogroup + dominant**	**phylogroup + dominant**	**462.194**
	log-logistic	phylogroup + dominant	phylogroup + dominant	468.335
Virulence-associated genes (total)	exponential	number of VAGs	number of VAGs	663.590
	Weibull	number of VAGs	number of VAGs	664.551
	log-normal	**number of VAGs**	**number of VAGs**	**630.300**
	log-logistic	number of VAGs	number of VAGs	637.532
Virulence-associated genes (by type)	exponential	adhesins + protectins + iron acquisition factors + invasins + toxins	adhesins + iron acquisition factors + invasins + toxins	642.703
	Weibull	adhesins + protectins + iron acquisition factors + invasins + toxins	adhesins + iron acquisition factors + invasins + toxins	644.666
	log-normal	**adhesins + protectins + iron acquisition factors + invasins + toxins**	**adhesins + iron acquisition factors + invasins + toxins**	**614.341**
	log-logistic	adhesins + protectins + iron acquisition factors + invasins + toxins	adhesins + iron acquisition factors + invasins + toxins	621.304
Resistence genes	exponential	number of ARGs	None	811.787
	Weibull	number of ARGs	None	807.816
	log-normal	**number of ARGs**	**None**	**757.262**
	log-logistic	number of ARGs	None	765.982

Table 5: Estimated coefficient, with their respective standard error and p-value, for each of the AFT models selected based on AIC (one model per set of explanatory factors). P-values below 5% are noted in bold. All the quantitative factors were normalized before inclusion in the model

Set of factors	Explanatory factor	Coefficient	Standard error	P-value
Phylogroup and dominant strain	Intercept (phylogroup A/ dominant A)	-0.7116	0.2216	**0.0037**
	Phylogroup B1	0.0001	0.2136	0.9997
	Phylogroup B2	1.0570	0.2428	**<0.0001**
	Phylogroup C	-1.1.065	0.7088	0.1185
	Phylogroup D	0.6789	0.1855	**0.0003**
	Phylogroup E	-1.1065	0.9954	0.2663
	Phylogroup F	0.9008	0.2459	**0.0002**
	Phylogroup G	-1.1065	1.9616	0.3629
	Dominant B1	-0.5362	0.4790	0.2629
	Dominant B2	0.7875	0.2956	**0.0077**
	Dominant C	-0.9744	1.7484	0.5773
	Dominant D	-0.1859	0.4491	0.6789
	Dominant F	-0.4475	0.5055	0.3760
	Dominant not *Escherichia*	-0.2103	0.9442	0.8237
Virulence-associated genes (total)	Intercept	-0.2660	0.0816	**0.0011**
	Number of VAGs	0.2514	0.0767	**0.0011**
Virulence-associated genes (by type)	Intercept	-0.2538	0.0792	**0.0013**
	Adhesins	0.1737	0.0875	**0.0467**
	Iron acquisition factors	0.3300	0.0894	**0.0002**
	Invasins	-0.1236	0.0759	0.1034
	Toxins	-0.1602	0.0817	**0.0493**
Resistence genes	Intercept	-0.2939	0.0774	**0.0002**

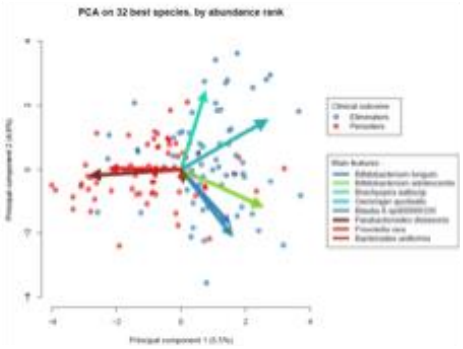


Figure 1. Principal component analysis (PCA) plot illustrating the distribution of samples from travelers who acquired and subsequently cleared MRE carriage within one month post-travel (white dots) and travelers who still carried MRE at one month (black dots). Only the 32 species significant in LEfSe are used. Differently colored arrows represent the key bacteria (dominant PCA features).

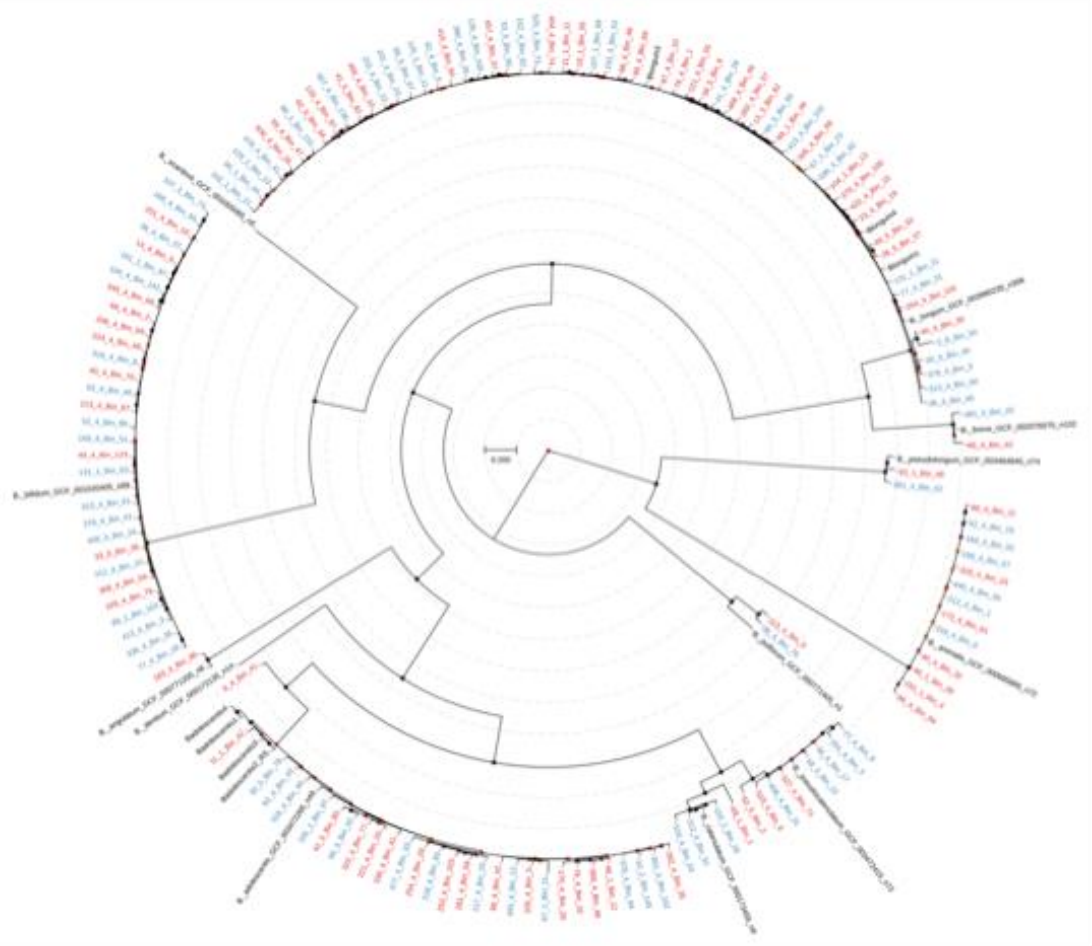


Figure 2. Phylogenic tree of *Bifidobacterium MAGs*

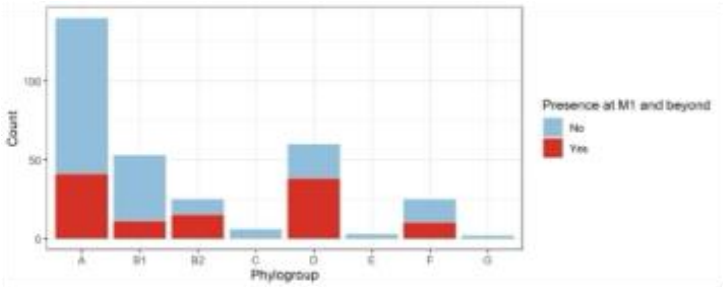


Figure 3. Distribution of phylogroups among eliminators and persisters (Chi-square test, $p=8.10^{-6}$)

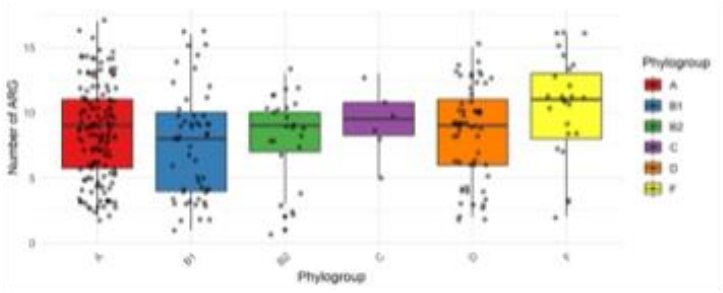


Figure 4. Distribution of ARG according to the phylogroup (Kruskal-Wallis test, p=0.04)

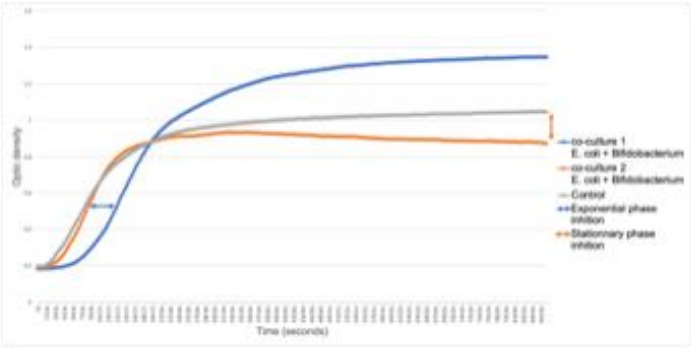


Figure 5. Example of a growth curve of an *E. coli* strain alone (control shown in grey) and *E. coli* associated with *Bifidobacterium* strains or their CFS, showing a delay in growth during the exponential phase (blue) or a decrease in growth during the stationary phase (orange).

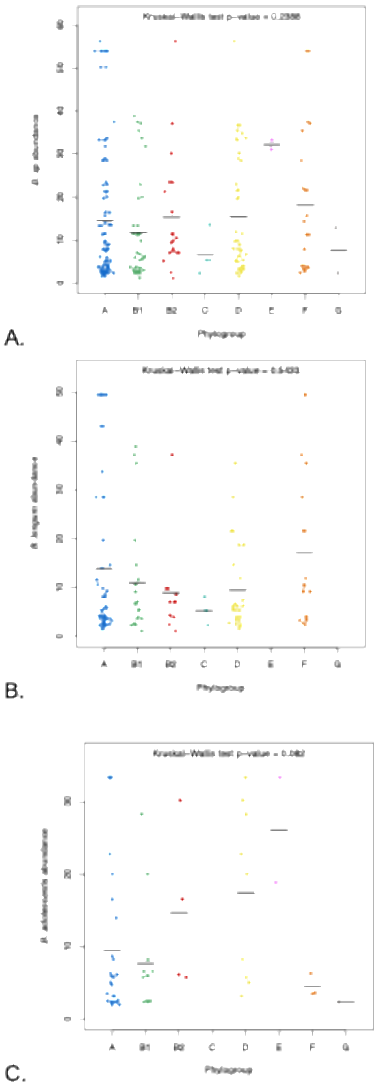


Figure 7. Relative abundance of (A) *Bidifobacterium sp*, (B) *Bifidobacterium longum* and (C) *Bifidobacterium adolescentis* according to *E. coli* phylogroup

Table 6. Unique Gene Set Identified in *B. adolescentis* Strain CIP64.59T

Gene ID	Description	Category
hpaIIM	Modification methylase HpaII	Defense system
sau3AIR_2	Type-2 restriction enzyme Sau3AI	Defense system
ydiS	Type-2 restriction enzyme BsuMI component YdiS	Defense system
ydjA	Type-2 restriction enzyme BsuMI component YdjA	Defense system
group_181	IS3 family transposase ISBmu11	Gene mobility
group_381	IS3 family transposase ISBlo10	Gene mobility
group_818	IS3 family transposase ISBlo9	Gene mobility
group_880	IS256 family transposase ISBlo5	Gene mobility
group_967	IS21 family transposase ISBad1	Gene mobility
devR	DNA-binding transcriptional activator DevR/DosR	Gene regulation
exuR_1	putative HTH-type transcriptional repressor ExuR	Gene regulation
whiB	Transcriptional regulator WhiB	Gene regulation
hin	DNA-invertase hin	Genetic recombination
xerC_1	Tyrosine recombinase XerC	Genetic recombination
dtd_2	D-aminoacyl-tRNA deacylase	Other
soj	Chromosome-partitioning ATPase Soj	Other
yccF_1	Inner membrane protein YccF	Other
higB2	Putative toxin HigB2	Bacterial competition
yafQ	mRNA interferase toxin YafQ	Bacterial competition
abf2	Intracellular exo-alpha-L-arabinofuranosidase 2	Cell wall modification / Sugar metabolism
bglA	Beta-glucosidase A	Cell wall modification / Sugar metabolism
epsJ	putative glycosyltransferase EpsJ	Cell wall modification / Sugar metabolism
group_229	Bifunctional beta-D-glucosidase/beta-D-fucosidase	Cell wall modification / Sugar metabolism
malL_2	Oligo-1,6-glucosidase	Cell wall modification / Sugar metabolism
mltG_3	Endolytic murein transglycosylase	Cell wall modification / Sugar metabolism
dapH	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-acetyltransferase	Metabolism
group_141	Iron-sulfur cluster carrier protein	Metabolism
group_165	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	Metabolism
group_328	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	Metabolism
group_368	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase	Metabolism
group_399	Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase 2	Metabolism
group_624	Arsenate reductase	Metabolism
tll	dTDP-6-deoxy-L-talose 4-dehydrogenase (NAD(+))	Metabolism
araQ_2	L-arabinose transport system permease protein AraQ	Nutrient uptake
bcrA	Bacitracin transport ATP-binding protein BcrA	Nutrient uptake
btuD_13	Vitamin B12 import ATP-binding protein BtuD	Nutrient uptake
cycB	Cyclodextrin-binding protein	Nutrient uptake
lacF_2	Lactose transport system permease protein LacF	Nutrient uptake
msmE_2	Multiple sugar-binding protein	Nutrient uptake
tcyC	L-cystine import ATP-binding protein TcyC	Nutrient uptake

tcyL	L-cystine transport system permease protein TcyL	Nutrient uptake
tcyM	L-cystine transport system permease protein TcyM	Nutrient uptake
yxeM	putative amino-acid-binding protein YxeM	Nutrient uptake
cotSA	Spore coat protein SA	Sporulation
group_505	putative protein	Unknown / Putative
group_966	hypothetical protein	Unknown / Putative

Collaboration : Microbiote, Réanimation et COVID

The role of the microbiota in the management of intensive care patients

Szychowiak et al. Annals of Intensive Care (2022) 12:3
https://doi.org/10.1186/s13613-021-00976-5

Annals of Intensive Care

REVIEW Open Access

The role of the microbiota in the management of intensive care patients

Piotr Szychowiak[1,2], Khanh Villageois-Tran[1,3], Juliette Patrier[1,4], Jean-François Timsit[1,4] and Étienne Ruppé[1,5*]

Abstract

The composition of the gut microbiota is highly dynamic and changes according to various conditions. The gut microbiota mainly includes difficult-to-cultivate anaerobic bacteria, hence knowledge about its composition has significantly arisen from culture-independent methods based on next-generation sequencing (NGS) such as 16S profiling and shotgun metagenomics. The gut microbiota of patients hospitalized in intensive care units (ICU) undergoes many alterations because of critical illness, antibiotics, and other ICU-specific medications. It is then characterized by lower richness and diversity, and dominated by opportunistic pathogens such as *Clostridioides difficile* and multidrug-resistant bacteria. These alterations are associated with an increased risk of infectious complications or death. Specifically, at the time of writing, it appears possible to identify distinct microbiota patterns associated with severity or infectivity in COVID-19 patients, paving the way for the potential use of dysbiosis markers to predict patient outcomes. Correcting the microbiota disturbances to avoid their consequences is now possible. Fecal microbiota transplantation is recommended in recurrent *C. difficile* infections and microbiota-protecting treatments such as antibiotic inactivators are currently being developed. The growing interest in the microbiota and microbiota-associated therapies suggests that the control of the dysbiosis could be a key factor in the management of critically ill patients. The present narrative review aims to provide a synthetic overview of microbiota, from healthy individuals to critically ill patients. After an introduction to the different techniques used for studying the microbiota, we review the determinants involved in the alteration of the microbiota in ICU patients and the latter's consequences. Last, we assess the means to prevent or correct microbiota alteration.

Keywords: Microbiota, Dysbiosis, Fecal microbiota transplantation, Probiotics, Intensive care, *C. difficile*, Multidrug-resistant bacteria

Background

In the gut, the microbiota mostly comprised bacteria, but it also harbors archaea, viruses, protozoans, and fungi. The composition of the gut microbiota is unique to each individual in that the gut microbiota of two given individuals consistently show differences in their composition [1]. Nonetheless, it is also highly dynamic and evolves throughout life under the influence of a wide diversity of genetic, environmental, medical, and dietary determinants.

In the intensive care setting, the gut microbiota of patients is submitted to various stresses including antibiotic exposure, modification of gastro-intestinal transit, artificial nutrition or sepsis which may lead to a dysbiosis during hospitalization. Indeed, the gut microbiota in critically ill patients appears to be different from that of healthy subjects, demonstrating markedly lower richness and diversity, and the near replacement of commensal genera by opportunistic pathogens [2]. Recent evidence has shown that dysbiosis in ICU patients might have consequences on survival, stressing that dysbiosis could be considered as an authentic, organ-failure-affecting prognosis along with renal, cardiac, or respiratory failures [3].

*Correspondence: etienne.ruppe@aphp.fr
[1] Université de Paris, IAME, INSERM, 75018 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

Springer Open

© The Author(s) 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Oropharyngeal and intestinal concentrations of opportunistic pathogens are independently associated with death of SARS-CoV-2 critically ill adults

Patrier et al. Critical Care (2022) 26:300
https://doi.org/10.1186/s13054-022-04164-0

Critical Care

RESEARCH Open Access

Oropharyngeal and intestinal concentrations of opportunistic pathogens are independently associated with death of SARS-CoV-2 critically ill adults

Juliette Patrier[1], Khanh Villageois-Tran[2,3], Piotr Szychowiak[1,3], Stéphane Ruckly[3,5], Rémi Gschwind[3], Paul-Henri Wicky[1], Signara Gueye[4], Laurence Armand-Lefevre[3,4], Mehdi Marzouk[1], Romain Sonneville[1,3,5], Lila Bouadma[1,3,5], Marie Petitjean[3], Fariza Lamara[1,5], Etienne de Montmollin[1,3,5], Jean-Francois Timsit[1,3,5*], Etienne Ruppé[3,4] and The French COVID Cohort Study Group

Abstract

Background: The composition of the digestive microbiota may be associated with outcome and infections in patients admitted to the intensive care unit (ICU). The dominance by opportunistic pathogens (such *as Enterococcus*) has been associated with death. However, whether this association remains all throughout the hospitalization are lacking.

Methods: We performed a single-center observational prospective cohort study in critically ill patients admitted with severe SARS-CoV-2 infection. Oropharyngeal and rectal swabs were collected at admission and then twice weekly until discharge or death. Quantitative cultures for opportunistic pathogens were performed on oropharyngeal and rectal swabs. The composition of the intestinal microbiota was assessed by 16S rDNA sequencing. Oropharyngeal and intestinal concentrations of opportunistic pathogens, intestinal richness and diversity were entered into a multivariable Cox model as time-dependent covariates. The primary outcome was death at day 90.

Results: From March to September 2020, 95 patients (765 samples) were included. The Simplified Acute Physiology Score 2 (SAPS 2) at admission was 33 [24; 50] and a Sequential Organ Failure Assessment score (SOFA score) at 6 [4; 8]. Day 90 all-cause mortality was 44.2% (42/95). We observed that the oropharyngeal and rectal concentrations of *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp. were associated with a higher risk of death. This association remained significant after adjustment for prognostic covariates (age, chronic disease, daily antimicrobial agent use and daily SOFA score). A one-log increase in *Enterococcus* spp., *S. aureus* and *Candida* spp. in oropharyngeal or rectal swabs was associated with a 17% or greater increase in the risk of death.

Conclusion: We found that elevated oropharyngeal/intestinal *Enterococcus* spp. *S. aureus* and *Candida* spp. concentrations, assessed by culture, are associated with mortality, independent of age, organ failure, and antibiotic therapy.

*Correspondence: jean-francois.timsit@aphp.fr

[1] AP-HP, Bichat Hospital, Medical and Infectious Diseases ICU (MI2), 75018 Paris, France
Full list of author information is available at the end of the article

BMC

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Annexes

Annexe 1 : Protocole librairies DNA Flex Library Prep (Illumina), adapté avec volume divisé par 4

1-Tagmentation

Décongeler le TB1 à Tamb et vortexer (Box 2/3 à -20°C)
Mettre le BLT à Tamb et vortexer (Box 3/3 à +4°C)
Allumer le thermocycleur

Préparation de l'ADN :
Transférer ~75-150 ng d'ADN dans un tube PCR 0.2mL – qsp 7,5 µL eau nuclease-free

Préparation mix de tagmentation :
Attention, bien vortexer le BLT vigoureusement pendant 10sec pour re-suspendre avant utilisation. Si re-suspension incomplète, vortexer de nouveau

Pour une réaction, mélanger 2,75 µL BLT + 2,75 µL TB1
Multiplier chaque volume par le nombre d'échantillons préparés

	X1	X8	X16	X24
BLT (µL)	2,75	22	44	66
TB1 (µL)	2,75	22	44	66

Vortexer doucement le mix de tagmentation pour re-suspendre
Diviser le mix de tagmentation en barrette de tubes de PCR 0.2 mL de manière à pouvoir distribuer à la pipette multicanaux (X8 : 5,5 µL/tube, X16 : 11µL/tube, X24 : 16,5µL/tube)

Répartir 5 µL de mix de tagmentation dans chaque échantillon
Mélanger par pipetage 10 fois pour re-suspendre
Mettre un film Microseal'B' sur la barrette
Déposer les échantillons dans le thermocycleur : Programme TAG-Flex

Couvercle 100°C – V_R = 12.5 µL	
55°C	15 min
10°C	∞

2- Post-tagmentation cleanup

Mettre le TSB à Tamb. Si présence de précipités dans le tampon, incuber à 37°C pendant 10min. et vortexer jusqu'à dissolution (Box 1/3 à +4°C)
Mettre le TWB à Tamb. (Box 1/3 à +4°C)

Mettre 3 µL de TSB dans chaque tube d'une barrette de PCR 0.2 mL de manière à pouvoir distribuer à la pipette multicanaux (X8 : 3 µL/tube, X16 : 6 µL/tube, X24 : 9 µL/tube)
Ajouter 2,5 µL de TSB dans chaque échantillon pour arrêter la tagmentation
Mélanger par pipetage 10 fois
Mettre un film Microseal'B' sur la barrette
Déposer les échantillons dans le thermocycleur : Programme Post-TAG

Couvercle 100°C – V_R = 15 µL	
37°C	15 min
10°C	∞

A cette étape, sortir les réactifs pour l'étape suivante d'amplification
Décongeler l'EPM dans la glace et mélanger par retournement (Box 2/2 à -20°C)
Décongeler la plaque d'Index adapters (Nextera CD Indexes/UDT indexes) à Tamb (à -20°C)

Placer les échantillons sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~3 min)
Éliminer le surnageant avec la pipette multicanaux (retirer ~15 µL)

Le TSB contient de l'EDTA qui est un inhibiteur de PCR è Lavage des billes recouverte l'ADN tagmenté avec le TWB (tagmentation wash buffer)

Faire 2 lavages :
Mettre 65 µL de TWB dans chaque tube d'une barrette de PCR 0.2 mL de manière à pouvoir distribuer à la pipette multicanaux (X8 : 65 µL/tube, X16 : 130 µL/tube, X24 : 195 µL/tube)
Retirer les échantillons de la plaque aimantée
Ajouter par pipetage lent 30 µL de TWB directement sur les billes
Mélanger par pipetage lent jusqu'à re-suspension des billes
Placer les échantillons sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~3 min)
Éliminer le surnageant avec la pipette multicanaux (~30) µL
Retirer les échantillons de la plaque aimantée
Ajouter par pipetage lent 30 µL de TWB directement sur les billes
Fermer les échantillons et placer sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~3min)
Garder sur la plaque aimantée jusqu'à l'étape d'amplification. Le tampon TWB permet de prévenir le séchage des billes.

3- Amplification de l'ADN tagmenté

Décongeler l'EPM dans la glace et mélanger par retournement et centrifuger brièvement (Box 2/2 à -20°C)
Décongeler la plaque d'Index adapters (Nextera DNA CD Indexes) à Tamb (à -20°C)

Préparation du mix de PCR :
Pour une réaction, mélanger 5,5 µL EDM + 5,5 µL eau nuclease-free
Multiplier chaque volume par le nombre d'échantillons préparés

	X1	X8	X16	X24
EDM (µL)	5,5	45	90	135
eau (µL)	5,5	45	90	135

Vortexer puis centrifuger le mix de PCR
Diviser le mix de PCR en barrette de tubes de PCR 0.2 mL de manière à pouvoir distribuer à la pipette multicanaux (X8 : 11 µL/tube, X16 : 22 µL/tube, X24 : 33 µL/tube)

Sur la plaque aimantée, éliminer la totalité du surnageant avec la pipette multicanaux (retirer ~30 µL) et retirer l'excédent de surnageant avec une P10
Retirer de la plaque aimantée
Ajouter immédiatement 10 µL de mix de PCR dans chaque échantillon
Mélanger par pipetage 10 fois jusqu'à re-suspension des billes
Ajouter 2,5 µL d'index dans chaque échantillon
Mélanger avec la pipette multicanaux réglée sur 10 µL 10 fois
Mettre un film Microseal'B' sur la barrette, centrifuger à 280g pendant 1min
Déposer les échantillons dans le thermocycleur : Programme BLT-PCR

Couvercle 100°C – V_R = 15 µL		
37°C	15 min	
10°C	∞	
Répéter le cycle 5 fois suivant :		
	98°C	45 sec
	62°C	30 sec
	68°C	2 min
68°C	1 min	
10 °	∞	

SAFE STOPPING POINT : à cette étape, les échantillons peuvent être conservés à +4°C jusqu'à 3 jours

4- Clean up des librairies

Mettre le SPB (équivalent billes AMPure) à Tamb pendant 30 min. et vortexer pour re-suspendre les billes. Veiller à bien vortexer avant utilisation. (Box 1/3 à +4°C)
Décongeler le RSB dans la glace lors de la 1ère utilisation et vortexer. (Box 2/3 à -20°C) Pour les utilisations suivantes, le tampon RSB est conservé à +4°C.
Préparer de l'éthanol 80% (X8 : 5mL (4mL OH +1mL H20), X16 : 10mL, X24 : 15mL)

Placer les échantillons sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~5 min)

Premier lavage avec SPB dilué :
Vortexer et mélanger par retournement le SBP jusqu'à re-suspension
Pour une réaction, mélanger 11,25 µL SPB + 10 µL eau nuclease-free
Multiplier chaque volume par le nombre d'échantillons préparés

	X1	X8	X16	X24
SPB (µL)	11,25	101,25	191,25	281,25
eau (µL)	10	90	170	250

Mettre 22 µL de SPB dilué dans chaque tube d'une barrette de PCR 0.2 mL de manière à pouvoir distribuer à la pipette multicanaux (X8 : 22 µL/tube, X16 : 44 µL/tube, X24 : 66 µL/tube)

Une fois que la solution devient claire (~5min. sur la plaque aimantée), prélever 11,25 µL de surnageant et les placer dans une nouvelle barrette de tubes de PCR 0.2 mL (ATTENTION : ne pas jeter le surnageant à cette étape)

Ajouter 21,25 µL de SPB dilué dans chaque échantillon (nouvelle barrette avec les 11,25 µL de surnageant)
Mélanger par pipetage 10 fois
Mettre un film Microseal'B' sur la barrette
Incuber à Tamb pendant 5 min précisément

Deuxième lavage avec SPB pur :
Pendant les 5 min d'incubation à Tamb, vortexer et mélanger par retournement le SBP jusqu'à re-suspension
Mettre 3,75 µL de SPB pur dans chaque tube d'une nouvelle barrette de PCR 0.2 mL (X8 : 1 barrette, X16 : 2 barrettes, X24 : 3 barrettes)

Placer les échantillons sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~5 min) (ATTENTION : ne pas jeter le surnageant à cette étape)

Transférer 31,25 µL de surnageant dans la nouvelle barrette contenant les 3,75 µL de SPB pur = étape d'élimination des gros fragments qui reste sur les billes et on récupère les petits fragments dans les 31,25 µL de surnageant

Mélanger par pipetage 10 fois
Mettre un film Microseal'B' sur la barrette
Incuber à Tamb pendant 5 min précisément
Placer les échantillons sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~5 min)
Sur la plaque aimantée, éliminer la totalité du surnageant avec la pipette multicanaux (retirer ~35 µL)
= étape d'élimination des petits fragments qui sont dans le surnageant et on garde les gros fragments sur les billes

2 lavages avec éthanol 80% :
Toujours sur la plaque aimantée, ajouter 200 µL d'éthanol 80% par échantillon sur les billes et sans mélanger
Incuber à Tamb 30 sec
Toujours sur la plaque aimantée, éliminer la totalité du surnageant avec la pipette multicanaux (retirer ~200 µL)
Répéter une 2ème fois
Retirer l'excédent d'éthanol 80% à la P10
Sur la plaque aimantée, faire sécher à Tamb pendant 5 min. Vérifier l'absence d'éthanol résiduel

Pendant les 5 min d'incubation, mettre 32 µL de RSB dans chaque tube d'une barrete de PCR 0.2 mL (X8 : 32µL/tube , X16 : 64µL/tube , X24 : 96µL/tube)

Retirer de la plaque aimantée et ajouter 32 µL de RSB
Mélanger par pipetage 10 fois
Incuber à Tamb pendant 2 min

Placer les échantillons sur une plaque aimantée et attendre que la solution devienne claire (~2 min) (ATTENTION : ne pas jeter le surnageant à cette étape)

Transférer 30 µL de surnageant dans une nouvelle barrette de tubes de PCR 0.2 mL

Dosage au Qubit HS ⇒ Objectif entre 2,5-3,5 ng/µL

SAFE STOPPING POINT : à cette étape, les échantillons peuvent être conservés à -20°C jusqu'à 30 jours

5- Pool des librairies

Afin d'obtenir une densité de cluster maximale, pooler l'ensemble des librairies à volume équimolaire
Si les concentrations des librairies se trouvent entre 2,5 et 3,5 ng/µL,
A l'aide d'une pipette multicanaux, prélever 5 µL de librairies et transférer dans une nouvelle barrette de PCR 0.2 mL. Puis prélever chaque puit de la barrette dans un tube Eppendorf 1.5 mL
Vortexer pour mélanger puis centrifuger
Doser au Qubit HS avec 2 µL

6- Dilution des librairies à la concentration de 1 nM

Pour convertir la concentration du pool de librairies de ng/µL en nM, utiliser la formule suivante en utilisant 600pb comme taille moyenne de librairies ⇒ objectif pool de librairies à 1 nM : diluer le pool avec le tampon RSB

Doser au Qubit HS avec 5 µL pour vérifier la concentration après dilution

7- Dénaturation de l'ADN et Dilution librairies + Phix

Préparation de la solution NaOH 0,1M = 2 µL NaOH 10M + 198 µL eau nuclease-free
Préparation de Tris-HCl 200 mM = 10 µL Tris-HCl 1M + 40 µL eau nuclease-free
Préparation du Phix à 1nM à partir de la solution commerciale à 10 nM = dilution au 1/10

Dénaturation de l'ADN avec une solution de NaOH à 0,1M
Arrêt de la dénaturation avec une solution de Tris-HCl pH 7.4 50mM NaCl à 200mM

Concentration finale à charger (dans un volume final de 1,3 mL)
-Mid output: 1.5 pM
- High output: 1.8 pM

Ajouter du Phix Sequencing control V3 à chaque run, à hauteur de 1% et à la même concentration que le pool de librairies

Tableau 1. Tableau résumant l'ensemble des associations des souches de *Bifidobacterium*, test de Dunn ajusté selon Benjamini-Hochberg

Comparison	Phase exponentielle			Phase stationnaire		
	Effet	*p* non ajusté	*p* ajusté	Effet	*p* non ajusté	*p* ajusté
B.adolescentis1 - B.adolescentis2	-3,6632	0,0002	0,0010	-2,8166	-2,8166	-2,8166
B.adolescentis1 - B.adolescentis3	-0,5640	0,5728	0,6738	0,0900	0,0900	0,0900
B.adolescentis2 - B.adolescentis3	3,0991	0,0019	0,0051	2,9066	2,9066	2,9066
B.adolescentis1 - B.adolescentis4	-0,6419	0,5210	0,6445	-0,1546	-0,1546	-0,1546
B.adolescentis2 - B.adolescentis4	3,0213	0,0025	0,0059	2,6621	2,6621	2,6621
B.adolescentis3 - B.adolescentis4	-0,0779	0,9379	0,9620	-0,2445	-0,2445	-0,2445
B.adolescentis1 - B.longum1	-0,4089	0,6826	0,7802	1,4516	1,4516	1,4516
B.adolescentis2 - B.longum1	3,2543	0,0011	0,0032	4,2682	4,2682	4,2682
B.adolescentis3 - B.longum1	0,1551	0,8767	0,9148	1,3616	1,3616	1,3616
B.adolescentis4 - B.longum1	0,2330	0,8158	0,8587	1,6061	1,6061	1,6061
B.adolescentis1 - B.longum2	-1,5098	0,1311	0,1919	0,1424	0,1424	0,1424
B.adolescentis2 - B.longum2	2,1534	0,0313	0,0507	2,9591	2,9591	2,9591
B.adolescentis3 - B.longum2	-0,9458	0,3443	0,4642	0,0525	0,0525	0,0525
B.adolescentis4 - B.longum2	-0,8679	0,3854	0,5027	0,2970	0,2970	0,2970
B.longum1 - B.longum2	-1,1009	0,2709	0,3737	-1,3091	-1,3091	-1,3091
B.adolescentis1 - B.longum3	-1,1880	0,2348	0,3315	1,1038	1,1038	1,1038
B.adolescentis2 - B.longum3	2,4752	0,0133	0,0246	3,9204	3,9204	3,9204
B.adolescentis3 - B.longum3	-0,6240	0,5326	0,6522	1,0138	1,0138	1,0138
B.adolescentis4 - B.longum3	-0,5461	0,5850	0,6815	1,2584	1,2584	1,2584
B.longum1 - B.longum3	-0,7791	0,4359	0,5625	-0,3478	-0,3478	-0,3478
B.longum2 - B.longum3	0,3218	0,7476	0,8307	0,9614	0,9614	0,9614
B.adolescentis1 - B.longum4	-1,1845	0,2362	0,3296	-1,1972	-1,1972	-1,1972
B.adolescentis2 - B.longum4	2,4786	0,0132	0,0247	1,6194	1,6194	1,6194
B.adolescentis3 - B.longum4	-0,6205	0,5349	0,6484	-1,2872	-1,2872	-1,2872
B.adolescentis4 - B.longum4	-0,5427	0,5874	0,6777	-1,0427	-1,0427	-1,0427
B.longum1 - B.longum4	-0,7757	0,4380	0,5591	-2,6488	-2,6488	-2,6488
B.longum2 - B.longum4	0,3253	0,7450	0,8355	-1,3397	-1,3397	-1,3397
B.longum3 - B.longum4	0,0035	0,9972	0,9972	-2,3010	-2,3010	-2,3010
B.adolescentis1 - SFC_heated_B.adolescentis2	2,1020	0,0355	0,0561	-0,1401	-0,1401	-0,1401
B.adolescentis2 - SFC_heated_B.adolescentis2	5,7652	0,0000	0,0000	2,6765	2,6765	2,6765
B.adolescentis3 - SFC_heated_B.adolescentis2	2,6661	0,0077	0,0156	-0,2301	-0,2301	-0,2301
B.adolescentis4 - SFC_heated_B.adolescentis2	2,7439	0,0061	0,0128	0,0144	0,0144	0,0144
B.longum1 - SFC_heated_B.adolescentis2	2,5109	0,0120	0,0241	-1,5917	-1,5917	-1,5917
B.longum2 - SFC_heated_B.adolescentis2	3,6118	0,0003	0,0012	-0,2826	-0,2826	-0,2826
B.longum3 - SFC_heated_B.adolescentis2	3,2900	0,0010	0,0031	-1,2439	-1,2439	-1,2439
B.longum4 - SFC_heated_B.adolescentis2	3,2866	0,0010	0,0030	1,0571	1,0571	1,0571
B.adolescentis1 - SFC_heated_B.longum2	3,3961	0,0007	0,0023	1,1119	1,1119	1,1119
B.adolescentis2 - SFC_heated_B.longum2	7,0593	0,0000	0,0000	3,9285	3,9285	3,9285
B.adolescentis3 - SFC_heated_B.longum2	3,9601	0,0001	0,0004	1,0219	1,0219	1,0219

B.adolescentis4 - SFC_heated_B.longum2	4,0380	0,0001	0,0003	1,2664	1,2664	1,2664
B.longum1 - SFC_heated_B.longum2	3,8050	0,0001	0,0007	-0,3397	-0,3397	-0,3397
B.longum2 - SFC_heated_B.longum2	4,9059	0,0000	0,0000	0,9694	0,9694	0,9694
B.longum3 - SFC_heated_B.longum2	4,5841	0,0000	0,0000	0,0081	0,0081	0,0081
B.longum4 - SFC_heated_B.longum2	4,5807	0,0000	0,0000	2,3091	2,3091	2,3091
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_heated_B.longum2	1,2941	0,1956	0,2828	1,2520	1,2520	1,2520
B.adolescentis1 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-3,6949	0,0002	0,0009	-1,3120	-1,3120	-1,3120
B.adolescentis2 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-0,0317	0,9747	0,9829	1,5046	1,5046	1,5046
B.adolescentis3 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-3,1309	0,0017	0,0046	-1,4020	-1,4020	-1,4020
B.adolescentis4 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-3,0530	0,0023	0,0057	-1,1574	-1,1574	-1,1574
B.longum1 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-3,2860	0,0010	0,0030	-2,7636	-2,7636	-2,7636
B.longum2 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-2,1851	0,0289	0,0475	-1,4544	-1,4544	-1,4544
B.longum3 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-2,5069	0,0122	0,0236	-2,4158	-2,4158	-2,4158
B.longum4 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-2,5103	0,0121	0,0237	-0,1148	-0,1148	-0,1148
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-5,7969	0,0000	0,0000	-1,1719	-1,1719	-1,1719
SFC_heated_B.longum2 - SFC_heated_SFC_B.longum3	-7,0910	0,0000	0,0000	-2,4239	-2,4239	-2,4239
B.adolescentis1 - SFC_heated_SFC_B.longum4	1,8397	0,0658	0,1013	0,0398	0,0398	0,0398
B.adolescentis2 - SFC_heated_SFC_B.longum4	5,5028	0,0000	0,0000	2,8564	2,8564	2,8564
B.adolescentis3 - SFC_heated_SFC_B.longum4	2,4037	0,0162	0,0286	-0,0502	-0,0502	-0,0502
B.adolescentis4 - SFC_heated_SFC_B.longum4	2,4815	0,0131	0,0249	0,1943	0,1943	0,1943
B.longum1 - SFC_heated_SFC_B.longum4	2,2485	0,0245	0,0415	-1,4118	-1,4118	-1,4118
B.longum2 - SFC_heated_SFC_B.longum4	3,3494	0,0008	0,0026	-0,1027	-0,1027	-0,1027
B.longum3 - SFC_heated_SFC_B.longum4	3,0276	0,0025	0,0060	-1,0640	-1,0640	-1,0640
B.longum4 - SFC_heated_SFC_B.longum4	3,0242	0,0025	0,0060	1,2370	1,2370	1,2370
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_heated_SFC_B.longum4	-0,2624	0,7930	0,8421	0,1799	0,1799	0,1799
SFC_heated_B.longum2 - SFC_heated_SFC_B.longum4	-1,5565	0,1196	0,1772	-1,0721	-1,0721	-1,0721
SFC_heated_SFC_B.longum3 - SFC_heated_SFC_B.longum4	5,5345	0,0000	0,0000	1,3518	1,3518	1,3518
B.adolescentis1 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	1,8033	0,0713	0,1084	0,7336	0,7336	0,7336
B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	5,4665	0,0000	0,0000	3,5502	3,5502	3,5502
B.adolescentis3 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	2,3673	0,0179	0,0307	0,6436	0,6436	0,6436
B.adolescentis4 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	2,4452	0,0145	0,0263	0,8881	0,8881	0,8881
B.longum1 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	2,2122	0,0270	0,0449	-0,7180	-0,7180	-0,7180
B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	3,3131	0,0009	0,0029	0,5911	0,5911	0,5911
B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	2,9913	0,0028	0,0064	-0,3702	-0,3702	-0,3702
B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	2,9878	0,0028	0,0064	1,9308	1,9308	1,9308
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	-0,2987	0,7651	0,8347	0,8737	0,8737	0,8737
SFC_heated_B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	-1,5928	0,1112	0,1668	-0,3783	-0,3783	-0,3783
SFC_heated_SFC_B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	5,4982	0,0000	0,0000	2,0456	2,0456	2,0456
SFC_heated_SFC_B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2	-0,0363	0,9710	0,9875	0,6938	0,6938	0,6938
B.adolescentis1 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	2,4181	0,0156	0,0279	0,1292	0,1292	0,1292
B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	6,0812	0,0000	0,0000	2,9458	2,9458	2,9458
B.adolescentis3 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	2,9821	0,0029	0,0064	0,0392	0,0392	0,0392
B.adolescentis4 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	3,0599	0,0022	0,0057	0,2837	0,2837	0,2837

B.longum1 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	2,8269	0,0047	0,0101	-1,3224	-1,3224	-1,3224
B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	3,9279	0,0001	0,0004	-0,0133	-0,0133	-0,0133
B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	3,6061	0,0003	0,0012	-0,9746	-0,9746	-0,9746
B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	3,6026	0,0003	0,0011	1,3264	1,3264	1,3264
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	0,3160	0,7520	0,8279	0,2693	0,2693	0,2693
SFC_heated_B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	-0,9781	0,3280	0,4473	-0,9827	-0,9827	-0,9827
SFC_heated_SFC_B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	6,1129	0,0000	0,0000	1,4412	1,4412	1,4412
SFC_heated_SFC_B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	0,5784	0,5630	0,6689	0,0894	0,0894	0,0894
SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum2	0,6148	0,5387	0,6465	-0,6044	-0,6044	-0,6044
B.adolescentis1 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-4,4030	0,0000	0,0001	-0,8720	-0,8720	-0,8720
B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-0,7399	0,4594	0,5802	1,9446	1,9446	1,9446
B.adolescentis3 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-3,8390	0,0001	0,0006	-0,9619	-0,9619	-0,9619
B.adolescentis4 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-3,7612	0,0002	0,0008	-0,7174	-0,7174	-0,7174
B.longum1 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-3,9942	0,0001	0,0004	-2,3235	-2,3235	-2,3235
B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-2,8933	0,0038	0,0083	-1,0144	-1,0144	-1,0144
B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-3,2151	0,0013	0,0036	-1,9758	-1,9758	-1,9758
B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-3,2185	0,0013	0,0036	0,3253	0,3253	0,3253
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-6,5051	0,0000	0,0000	-0,7318	-0,7318	-0,7318
SFC_heated_B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-7,7992	0,0000	0,0000	-1,9839	-1,9839	-1,9839
SFC_heated_SFC_B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-0,7082	0,4788	0,5985	0,4400	0,4400	0,4400
SFC_heated_SFC_B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-6,2427	0,0000	0,0000	-0,9118	-0,9118	-0,9118
SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-6,2064	0,0000	0,0000	-1,6055	-1,6055	-1,6055
SFC_unheated_neutral_B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum3	-6,8211	0,0000	0,0000	-1,0012	-1,0012	-1,0012
B.adolescentis1 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	-0,2710	0,7864	0,8425	-1,7053	-1,7053	-1,7053
B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	3,3921	0,0007	0,0023	1,1113	1,1113	1,1113
B.adolescentis3 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	0,2930	0,7696	0,8319	-1,7953	-1,7953	-1,7953
B.adolescentis4 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	0,3708	0,7108	0,8047	-1,5508	-1,5508	-1,5508
B.longum1 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	0,1378	0,8904	0,9211	-3,1569	-3,1569	-3,1569
B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	1,2387	0,2154	0,3078	-1,8478	-1,8478	-1,8478
B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	0,9169	0,3592	0,4789	-2,8091	-2,8091	-2,8091
B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	0,9135	0,3610	0,4760	-0,5081	-0,5081	-0,5081
SFC_heated_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	-2,3731	0,0176	0,0307	-1,5652	-1,5652	-1,5652
SFC_heated_B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	-3,6672	0,0002	0,0010	-2,8172	-2,8172	-2,8172
SFC_heated_SFC_B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	3,4238	0,0006	0,0022	-0,3933	-0,3933	-0,3933
SFC_heated_SFC_B.longum4 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	-2,1107	0,0348	0,0557	-1,7451	-1,7451	-1,7451
SFC_unheated_neutral_B.adolescentis2 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	-2,0744	0,0380	0,0593	-2,4389	-2,4389	-2,4389
SFC_unheated_neutral_B.longum2 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	-2,6891	0,0072	0,0148	-1,8345	-1,8345	-1,8345
SFC_unheated_neutral_B.longum3 - SFC_unheated_neutral_B.longum4	4,1320	0,0000	0,0002	-0,8333	-0,8333	-0,8333