



HAL
open science

Impact d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal

Charles Burdet

► **To cite this version:**

Charles Burdet. Impact d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal. Santé publique et épidémiologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC058 . tel-02167851

HAL Id: tel-02167851

<https://theses.hal.science/tel-02167851>

Submitted on 28 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
préparée à l'Université Paris Diderot

Spécialité Epidémiologie Clinique

Ecole Doctorale Pierre Louis de Santé Publique à Paris
Epidémiologie et Sciences de l'Information Biomédicale (ED 393)

**Impact d'une antibiothérapie
sur le microbiote intestinal**

Présentée par Charles BURDET

Présentée et soutenue publiquement le 12 juin 2018 à Paris

Président du jury :	Dr Olivier Tenailon, DR Inserm, Université Paris Diderot
Rapporteur :	Pr Didier Guillemot, PU-PH, Université Versailles Saint Quentin
Rapporteur :	Pr Jean-Luc Mainardi, PU-PH, Université Paris Descartes
Examineur :	Dr Lulla Opatowski, MCF, Université Versailles Saint Quentin
Examineur :	Pr Marie-Cécile Ploy, PU-PH, Université de Limoges
Examineur :	Pr Daniel Vittecoq, PU-PH, Université Paris Sud
Directrice de thèse :	Pr France Mentré, PU-PH, Université Paris Diderot

Remerciements

A France, ma directrice de thèse, qui m'a accueilli comme interne en 2012 et me soutient depuis avec exigence, bienveillance et patience sans cesse renouvelées (je sais qu'il en faut !). Merci de ta confiance. Merci de l'enthousiasme avec lequel tu fais vivre l'unité de recherche et le département hospitalier, et de l'ambiance de travail que tu as su y créer, dans lesquels j'espère pouvoir continuer à travailler à l'avenir...

A messieurs Didier Guillemot et Jean-Luc Mainardi, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci de votre lecture attentive et critique de mon travail et de vos commentaires enrichissants.

A mesdames Lulla Opatowski et Marie-Cécile Ploy, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse.

A monsieur Olivier Tenaillon, qui me fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Merci pour ta bonne humeur permanente, tes conseils et les précieuses discussions que nous avons eues lors de nos séances microbiotes.

A monsieur Daniel Vittecoq, qui m'a accueilli comme interne puis chef de clinique dans son service, et m'a guidé dans ma formation. Après avoir jugé mon travail de thèse de médecine, vous avez accepté de juger de nouveau mon travail. Recevez ma plus sincère gratitude.

A tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de cette thèse. A Antoine Andremont, Erick Denamur, Xavier Duval, Jean de Gunzburg, pour leurs précieux conseils qui m'ont permis d'enrichir ce travail.

A Florence Séjourné, Annie Ducher, Sakina Sayah-Jeanne, Marina Varastet, ainsi qu'à l'ensemble des membres de la société Da Volterra, pour la confiance qu'ils m'ont accordée pour l'exploitation de leurs données.

A mes courageuses relectrices, Thu-Thuy et MÉRIL, pour leur enthousiasme à relire ce travail dans des délais extraordinairement courts, pour leurs remarques avisées et leur aide précieuse.

A Thu-Thuy, encore une fois, pour ton immense gentillesse, ta bonne humeur permanente et tes réponses précises à mes incessantes questions tout au long de ces dernières années.

A l'ensemble des membres de l'UMR 1137 IAME, passés ou présents, de l'équipe 4 ou des autres équipes, qui ont contribué à faire de ces dernières années une formidable expérience. A Anne, Antonio, Antoine, Emmanuelle, François, François, Hervé, Jérémie, Jérémie, Jimmy, Julie, Camille, Cédric, Sarah, Simon, Solène, Sylvie, Vincent, et tous les autres que j'oublie certainement, pour votre enthousiasme, votre amitié, votre gentillesse et pour la bonne ambiance qui règne au 4^{ème} étage.

A Houda et Tiphany, pour leur bonne humeur permanente, qui rendent la vie dans l'unité est si facile

A tous ceux que j'oublie certainement, en espérant qu'ils ne m'en tiennent pas rigueur.

A mes parents, mes frères et sœurs, pour leur soutien et patience inconditionnels tout au long de mes études.

A Marie, sans qui...

Titre

Impact d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal

Résumé

Le développement des méthodes de séquençage de nouvelle génération a permis d'approfondir les connaissances sur le rôle des communautés bactériennes commensales pour la santé de leur hôte, et l'impact négatif de la perturbation de leur équilibre. Les antibiotiques sont les principaux perturbateurs de cet équilibre, mais leur impact n'a pas été quantifié précisément.

Nous avons quantifié la relation entre les concentrations fécales d'antibiotiques et la perturbation de la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal, et modélisé le lien entre la perte de diversité bactérienne et la probabilité de décès dans un modèle animal de colite à *Clostridium difficile* induite par les antibiotiques. Nous avons montré que l'indice de diversité de Shannon et la distance UniFac non pondérée étaient les indices de diversité qui étaient le plus prédictif du décès dans ce modèle d'infection.

Chez des volontaires sains, nous avons développé un modèle mathématique semi-mécanistique de l'évolution de la diversité au sein du microbiote, mesurée par deux indices de diversité, après perturbation antibiotique, et quantifié la relation entre l'exposition individuelle plasmatique et fécale à un antibiotique, et son effet sur la perturbation de la diversité bactérienne au cours du temps. Nous avons également analysé le rôle de la voie d'élimination des antibiotiques pour la limitation de l'impact d'un antibiotique sur le microbiote. Ces travaux nous ont permis de montrer que le microbiote intestinal présente une grande sensibilité aux antibiotiques, et que la voie d'élimination ne semble de ce fait pas jouer un rôle prépondérant dans la perspective de limiter l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal.

Mots clés

antibiotiques ; microbiote intestinal ; dysbiose ; métagenomique ; antibiorésistance ; *Clostridium difficile* ; pharmacocinétique ; pharmacodynamique ; modélisation non linéaire à effets mixtes

Title

Impact of an antibiotic treatment on the intestinal microbiota

Abstract

The development of next generation sequencing broadened our knowledge on the role of commensal bacterial communities on their host's health, and the negative impact of their disruption. Antibiotics are the main disrupting factor, but their impact has not been precisely quantified.

We quantified the relationship between antibiotic fecal concentrations and the loss of bacterial diversity in the intestinal microbiota, and modelled the link between the loss of diversity and mortality in a hamster model of antibiotic-induced *Clostridium difficile* infection. We showed that the Shannon diversity index and the unweighted UniFrac distance are the 2 indices that best predict mortality in this model.

In healthy volunteers, we developed a semi-mechanistic model of the evolution over time of bacterial diversity – measured by two indices – after an antibiotic perturbation, and quantified the relationship between antibiotic concentrations in plasma and feces and the loss of bacterial diversity in the intestinal microbiota. We also analyzed the role of the antibiotic elimination pathway in the reduction of their impact on the microbiota. In this work, we showed that the intestinal microbiota is highly susceptible to antibiotics, and that the elimination route doesn't have a major role, in the perspective of limiting antibiotics' impact on the intestinal microbiota.

Keywords

antibiotics ; intestinal microbiota ; dysbiosis ; metagenomics ; bacterial resistance ;
Clostridium difficile ; pharmacokinetics ; pharmacodynamics ; moxifloxacin ; cefotaxime ;
ceftriaxone ; nonlinear mixed effects modelling

Table des matières

Résumé.....	Erreur ! Signet non défini.
Summary	Erreur ! Signet non défini.
Table des matières	7
Production scientifique liée à la thèse	9
Liste des figures.....	11
Chapitre 1. Introduction	13
1. Le microbiote intestinal	14
1.1. Méthodes d'études de la composition du microbiote intestinal	14
1.2. Mesures de la diversité au sein du microbiote intestinal.....	17
1.3. Importance de l'homéostasie du microbiote intestinal	18
2. Effets indésirables cliniques des antibiotiques : l'exemple de la colite à <i>Clostridium difficile</i>	19
2.1. Epidémiologie de l'infection à <i>Clostridium difficile</i>	20
2.2. Facteurs de risque d'infection à <i>Clostridium difficile</i>	21
3. Perturbation du microbiote intestinal : le rôle des antibiotiques.....	23
3.1. Effet sur la composition du microbiote intestinal	23
3.2. Effet sur l'émergence de la résistance bactérienne	25
3.3. Facteurs affectant l'exposition du microbiote intestinal aux antibiotiques.....	29
4. Modélisation des relations dose – concentration – effet	32
4.1. Modèles mathématiques.....	32
4.2. Modélisation non linéaire à effets mixtes	37
4.1. Modèles mathématiques de cinétique bactérienne.....	41
Objectifs de cette thèse.....	45
Chapitre 2. Concentrations fécales d'antibiotique, diversité bactérienne et mortalité : analyses dans un modèle animal	47
1. Réduction des concentrations fécales d'antibiotique et protection contre la mortalité	49
1.1. Résumé	49
1.2. Article 1.....	51
2. Préservation de la diversité bactérienne et protection contre la mortalité	73
2.1. Résumé	73
2.2. Article 2.....	75
Chapitre 3. Exposition fécale, diversité et résistance bactériennes : analyses chez le volontaire sain	105
1. Co-évolution de l'exposition aux antibiotiques et de la diversité bactérienne.....	107
1.1. Résumé	107
1.2. Article 3.....	109
2. Elimination biliaire et impact sur la diversité et la résistance bactériennes.....	149
2.1. Résumé	149
2.2. Article 4.....	151
Chapitre 4. Discussion et perspectives	175
Bibliographie.....	187
Annexe: article 5	207

Production scientifique liée à la thèse

Articles publiés

Burdet C, Sayah-Jeanne S, Nguyen TT, Miossec C, Saint-Lu N, Pulse M, Weiss W, Andremont A, Mentré F, de Gunzburg J. **Protection of hamsters from lethal antibiotic-induced *Clostridium difficile* colitis by an oral administration of a charcoal-based adsorbent.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017 Oct;61(10):e00543-17

Burdet C, Pajot O, Couffignal C, Armand-Lefèvre L, Foucrier A, Laouénan C, Wolff M, Massias L and Mentré F. **Population pharmacokinetics of amikacin in critically-ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia.** *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015 Jan;71(1):75-83

Articles soumis

Burdet C, Sayah-Jeanne S, Nguyen TT, Hugon P, Sablier-Gallis F, Saint-Lu N, Corbel T, Ferreira S, Pulse M, Weiss W, Andremont A, Mentré F, de Gunzburg J. **Antibiotic-induced dysbiosis predicts mortality in an animal model of *Clostridium difficile* infection.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Burdet C, Nguyen TT, de Gunzburg J, Ferreira S, Ducher A, Duval X, Varastet M, Andremont A, Guedj J, Mentré M and the DAV132-CL-1002 study group. **Modelling the impact of antibiotic treatment on microbiome diversity over time.** *BMC Medical Research Methodology*

Articles en préparation

Burdet C, Grall N, Linard M, Benhayoun M, Tubiana S, Fantin B, Laurent Massias L, Denamur E, Bridier Namias A, Tubiana S, Alavoine L, Andremont A, Mentré F, Duval X. **Impact of ceftriaxone versus cefotaxime on the intestinal microbiota: a randomized clinical trial in healthy volunteers**

Communications orales

Burdet C, Nguyen TT, Saint-Lu N, Sayah-Jeanne S, Hugon P, Sablier-Gallis F, Ferreira S, Andremont A, Mentré F, de Gunzburg J. **Impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal. Exemple de la colite à *Clostridium difficile*.** ANSES seminar, 15/11/2017, Paris, France

Communications affichées

Burdet C, Nguyen TT, Saint-Lu N, Sayah-Jeanne S, Hugon P, Sablier-Gallis F, Ferreira S, Andremont A, Mentré F, de Gunzburg J. **Change in bacterial diversity of fecal microbiota drives mortality in a hamster model of antibiotic-induced *Clostridium difficile* colitis.** IDWeek, 4-8/10/2017 San Diego, CA, USA

Burdet C, Nguyen TT, de Gunzburg J, Ferreira S, Ducher A, Duval X, Varastet M, Andreumont A, Mentré F. **Joint modeling of moxifloxacin pharmacokinetics and fecal microbiota disruption in healthy volunteers**. ACOP, 15-18/2017, Fort Lauderdale, CA, USA

Burdet C, Nguyen TT, de Gunzburg J, Ferreira S, Ducher A, Duval X, Varastet M, Andreumont A, Mentré F. **Joint modeling of moxifloxacin pharmacokinetics and fecal microbiota disruption in healthy volunteers**. PAGE, 6-9/06/2017, Budapest, Hungary

Burdet C, Nguyen TT, Saint-Lu N, Sayah-Jeanne S, Weiss W, Pulse M, Andreumont A, Mentré F, de Gunzburg J. **Modelling helps understanding reduction of mortality provided by DAV131A in a hamster model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* colitis**. IDWeek, 26-30/10/2016, New Orleans, USA

Burdet C, Nguyen TT, de Gunzburg J, Ducher A, Ghidi M, Duval X, Varastet M, Andreumont A, Mentré F. **Joint modeling of plasma and fecal moxifloxacin pharmacokinetics in healthy volunteers**. WCOP, 21-24/08/2016, Brisbane, Australia

Burdet C, Nguyen TT, de Gunzburg J, Ducher A, Ghidi M, Duval X, Varastet M, Andreumont A, Mentré F. **Joint modeling of plasma and fecal moxifloxacin pharmacokinetics in healthy volunteers**. PAGE, 7-10/06/2016, Lisbon, Portugal

Liste des figures

Figure 1. Structure secondaire de l'ARNr 16S d' <i>Escherichia coli</i>	15
Figure 2. Calcul de la distance UniFrac.	18
Figure 3. Mécanismes physiopathologiques expliquant le développement de l'infection à <i>Clostridium difficile</i> suite à l'administration d'antibiotiques.	25
Figure 4. Processus liés à la présence d'antibiotiques dans le tube digestif suivant une administration orale ou parentérale.	30
Figure 5. Représentation schématique d'un modèle à deux compartiments avec une élimination linéaire.	35
Figure 6. Représentation schématique d'un modèle d'absorption à compartiments de transit. ...	35
Figure 7. Modèle de turnover (en l'absence de médicament)	36
Figure 8. Exemple schématique d'un modèle de cinétique bactérienne avec une réplication saturable dans lequel l'élimination des bactéries est due à l'élimination naturelle	41

Chapitre 1. Introduction

Depuis quelques années, les communautés microbiennes commensales sont sources d'un intérêt important dans le champ de la recherche biomédicale. L'ensemble de ces communautés a été désigné par le néologisme « microbiome » par Joshua Lederberg, ou microbiote, afin de regrouper sous un même terme « la communauté écologique de l'ensemble des microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui cohabitent dans le corps humain » (1). Cette communauté a été jusqu'à récemment négligée.

Au cours des deux dernières décennies, le développement d'approches moléculaires d'analyse des génomes a permis d'approfondir les connaissances sur la composition des microbiotes, et sur leur rôle pour la santé de leur hôte (2). Ce rôle s'est avéré largement sous-estimé, et une littérature maintenant prolifique relie la composition du microbiote intestinal à un grand nombre d'états pathologiques, aigus ou chroniques. Le rôle de nombreux facteurs perturbateurs a été souligné, parmi lesquels les antibiotiques figurent au premier rang (3-5). Une des principales complications immédiates de l'administration d'antibiotiques est la survenue d'une infection à *Clostridium difficile*, source de diarrhée possiblement mortelle et véritable fardeau médico-économique. Dans le même temps, le rôle du microbiote intestinal dans la sélection et la diffusion de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques a été souligné (6). La consommation d'antibiotiques a été pointée du doigt pour son rôle dans l'épidémie actuelle de résistance aux antibiotiques, et aux impasses thérapeutiques potentielles auxquelles cette situation peut aboutir. Cela a conduit les autorités sanitaires à tenter de raisonner l'utilisation des antibiotiques (7).

Cependant, le lien entre les concentrations fécales d'antibiotiques et la perturbation du microbiote analysé à l'aide de méthodes moléculaires a été peu étudié, et la prise en compte des caractéristiques pharmacocinétiques des antibiotiques pourrait permettre une meilleure rationalisation du choix des molécules administrées aux patients infectés.

La relation complexe entre l'hôte, les bactéries et le médicament antimicrobien peut être caractérisée à l'aide de modèles mathématiques semi-mécanistiques. Couplés à des méthodes de modélisation à effets mixtes, ces modèles permettent la prise en compte du caractère longitudinal des données répétées, et d'estimer des paramètres caractérisant la population d'étude, dont les valeurs moyennes et la variabilité interindividuelle des paramètres des modèles (8).

L'objectif global de ce travail de thèse est d'approfondir l'étude de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal. Dans une première partie, nous présenterons les connaissances actuelles concernant les méthodes d'analyse des microbiotes, le rôle perturbateur que les antibiotiques jouent

sur le microbiote intestinal et les moyens disponibles pour en quantifier l'effet (Chapitre 1). Dans un deuxième temps, nous présenterons les travaux menés dans le cadre de cette thèse : d'une part les études menées à partir de modèles animaux (Chapitre 2), et d'autre part les études conduites chez des volontaires sains (Chapitre 3). Enfin, dans un dernier chapitre, nous discuterons des résultats obtenus afin de les mettre en perspective de travaux ultérieurs.

1. Le microbiote intestinal

1.1. Méthodes d'études de la composition du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est constitué d'un très grand nombre de bactéries. Leur nombre total a été estimé à 10^{14} , et cette communauté est constituée de plusieurs centaines d'espèces bactériennes, avec une très grande variabilité inter-individuelle (9). Le nombre de bactéries varie le long du tube digestif, allant de moins de 10^3 /mL dans l'estomac et le duodénum, à 10^4 - 10^7 /mL dans le jejunum et l'ileum et jusqu'à 10^{11} - 10^{12} /mL dans le caecum et le colon (10), où le microbiote comprend plus de 500 espèces anaérobies et où le nombre de gènes bactériens a été récemment estimé à plus de 3 millions (11). Cette complexité rend l'étude du microbiote intestinal difficile. Plusieurs catégories de méthodes d'étude peuvent être distinguées, ayant chacune ses avantages et inconvénients. Les principales sont la culture bactérienne et les méthodes moléculaires, dont l'analyse ciblant certaines espèces ou certains gènes d'intérêt, et le séquençage à haut débit de l'ensemble des génomes présents au sein du microbiote.

1.1.1. *La culture bactérienne*

La culture bactérienne constitue la méthode la plus ancienne d'analyse du microbiote. Elle est encore cependant largement utilisée, notamment en routine hospitalière, par exemple pour l'étude de prélèvements cliniques réalisés chez des sujets suspects d'infection, ou pour la recherche de colonisation fécale à bactéries multirésistantes. La culture présente l'avantage de la simplicité et d'un coût relativement peu élevé. L'utilisation de milieux de culture spécifiques, enrichis en facteurs nutritifs favorisant ou en antibiotiques inhibant la croissance de certaines bactéries, rend cette méthode très sensible à la détection de bactéries constituant des populations sous-dominantes de l'écosystème étudié.

Cette méthode d'analyse a été la méthode de choix pour la détection de certaines bactéries d'intérêt, comme par exemple celles résistantes à un type d'antibiotique donné. Elle reste actuellement largement utilisée, y compris pour analyser l'impact des antibiotiques sur un microbiote (intestinal, oro-pharyngé ou nasal par exemple) (12, 13). Cependant, elle est limitée aux espèces dont

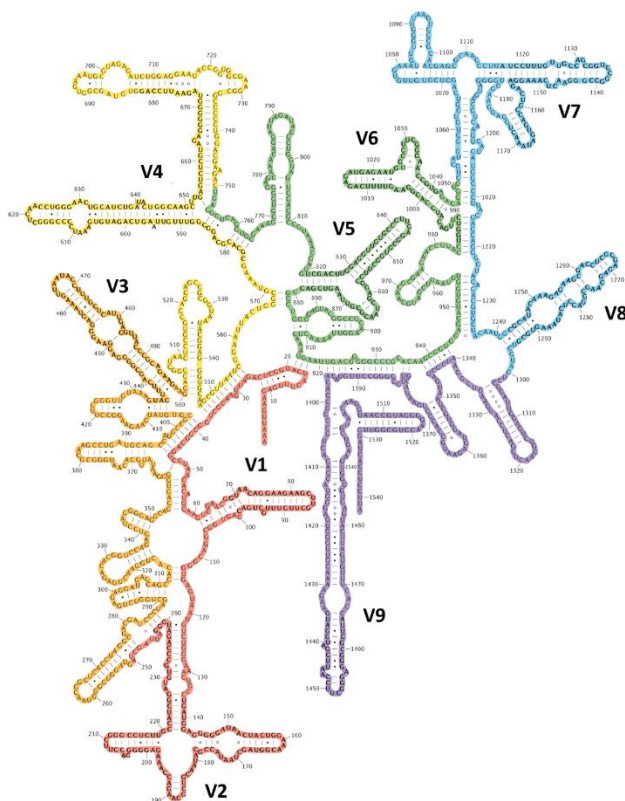
la culture est possible au laboratoire, alors que l'on estime qu'environ 80% des espèces bactériennes identifiées par les méthodes moléculaires ne sont pas cultivables (14).

1.1.2. Méthodes moléculaires

Le développement des méthodes moléculaires d'analyse bactérienne fait suite au constat de la conservation de certaines régions des ARN ribosomiques 16S (15).

L'ARN ribosomique 16S correspond à l'ARN constituant la petite sous-unité du ribosome bactérien. Il s'agit d'une molécule d'environ 1500 nucléotides, constituée de 9 régions hypervariables en fonction de l'espèce bactérienne, séparées les unes des autres par des régions conservées entre les espèces (voir Figure 1). Les régions variables permettent l'analyse des relations phylogénétiques entre espèces bactériennes, tandis que les régions conservées sont utilisées pour la mise au point d'amorces de PCR quasiment universelles, permettant de ce fait l'amplification des portions d'intérêt de la molécule.

Figure 1. Structure secondaire de l'ARNr 16S d'*Escherichia coli*. D'après (16).



La PCR ciblée

La première approche développée a été la PCR quantitative, qui repose sur l'amplification d'une portion d'un gène. Appliqué au gène de l'ARN 16S spécifique d'une espèce bactérienne donnée, cette approche permet de quantifier l'espèce dans le milieu analysé. Il est également possible de cibler et

de quantifier d'autres gènes, tels que les gènes conférant la résistance à un type d'antibiotique donné, indépendamment des espèces bactériennes qui les portent. Cette méthode a l'avantage d'être très spécifique de l'espèce bactérienne ciblée, permettant ainsi de révéler la présence d'espèces bactériennes présentes en quantités qui ne seraient pas détectables par des méthodes plus globales comme l'analyse métagénomique. La spécificité de la PCR quantitative permet d'estimer de façon précise la quantité des différentes espèces d'intérêt. Elle fournit ainsi une information précieuse lorsque l'on souhaite analyser une partie du microbiote, mais n'est pas adaptée à l'analyse globale de l'ensemble du microbiote intestinal. C'est pourquoi l'analyse métagénomique, par séquençage à haut débit, concentre actuellement l'attention de la communauté scientifique.

L'analyse métagénomique

Le métagénome désigne l'ensemble de l'information génétique présente dans un écosystème. Après extraction, l'ADN bactérien contenu dans l'écosystème étudié est préparé pour le séquençage. Deux approches sont principalement utilisées : une approche consistant en l'amplification ciblée de certaines régions de l'ADN, comme par exemple le gène de l'ARN ribosomique 16S, et une autre passant par une cassure aléatoire des molécules d'ADN puis par l'amplification des fragments ainsi obtenus. Dans les deux cas, l'amplification est réalisée en utilisant une PCR. Nous nous concentrerons sur la méthode de séquençage par amplification ciblée des régions codant pour l'ARN ribosomique 16S (2), qui est utilisée dans ce travail de thèse. Le séquençage s'effectue par amplification, à l'aide d'amorces universelles. Pour cette phase, l'utilisation de nucléotides fluorescents, qui émettent une fluorescence lue par un laser à chaque incorporation, permet d'établir la séquence amplifiée.

L'analyse des séquences nécessite ensuite un travail bio-informatique complexe, afin de supprimer les chimères produites par les PCR et les erreurs de séquençage. A cette fin, plusieurs logiciels ont été développés afin de faciliter ces étapes bio-informatiques. Les plus utilisés, tous deux open source, sont les logiciels mothur (17) et QIIME (18). Les séquences filtrées peuvent ensuite être regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs), ou taxons, sur la base de leur homologie de séquence. Habituellement, un seuil de 97% d'homologie est utilisé pour cette définition (2). L'affiliation taxonomique de chaque taxon peut ensuite être réalisée à l'aide de bases de données ouvertes régulièrement mises à jour.

Le nombre de séquences obtenues peut varier entre les échantillons en raison d'artefacts techniques, notamment car les amorces de PCR utilisées lors de l'amplification ne présentent pas la même affinité pour l'ensemble des séquences d'ADN ribosomique 16S présentes dans l'échantillon analysé, et car les nombreux cycles de PCR nécessaires aux amplifications induisent un biais dans la quantification des espèces présentes. Ainsi, sans couplage à une autre méthode d'analyse, la

quantification absolue de chaque taxon n'est pas possible et la composition taxonomique de chaque échantillon n'est disponible qu'en termes d'abondance relative (2).

1.2. Mesures de la diversité au sein du microbiote intestinal

Les analyses de la diversité bactérienne reposent sur des métriques initialement développées dans le champ de l'écologie et de la biologie de l'évolution (19), en prenant l'espèce comme unité fondamentale d'analyse. Ces mesures consistent en des indices quantitatifs globaux qui sont calculés, dans le cadre de données issues des méthodes de séquençage à haut débit, après mise en œuvre d'un processus appelé *raréfaction* (2). En effet, les différences entre le nombre de séquences obtenues pour chaque échantillon peuvent affecter l'estimation de la diversité présente. Le nombre de séquences d'ADN contenu dans chaque échantillon est ainsi habituellement uniformisé entre les différents échantillons en procédant au tirage aléatoire sans remise d'un nombre identique de séquences pour chaque échantillon. Ce nombre est habituellement choisi arbitrairement comme le plus grand possible, tout en limitant le nombre d'échantillons n'ayant pas un nombre de séquences suffisant pour être maintenus dans l'analyse (2).

Parmi les méthodes d'analyse de la diversité, on peut distinguer la diversité α , qui correspond à la diversité présente au sein d'un échantillon, de la diversité β , qui s'attache à mesurer les différences entre 2 écosystèmes. Plusieurs indices de diversité sont habituellement utilisés pour l'analyse de la diversité au sein des microbiotes, intégrant ou non l'abondance relative et le nombre de taxons identifiés dans chaque échantillon, ainsi que la phylogénie.

Pour la diversité α , les indices les plus courants mesurent le nombre total n de taxons bactériens observés, qui se réfère à la richesse taxonomique, l'abondance relative des taxons, qui se réfère à l'uniformité taxonomique, ou combinent ces deux notions. Ils n'intègrent en général pas les relations phylogénétiques identifiées au sein de l'écosystème. Les indices le plus souvent rapportés dans la littérature sont les suivants :

- le nombre n de taxons observés dans l'échantillon
- l'indice Chao1 (20), mesurant la richesse taxonomique : $S_{est} = n + \frac{(f_1)^2}{2 \times f_2}$, avec f_1 nombre de taxons représentés par une seule séquence dans l'échantillon et f_2 nombre de taxons représentés par deux séquences dans l'échantillon ;
- l'entropie de Shannon (21), $H = - \sum_{i=1}^n p_i \times \log(p_i)$, avec p_i abondance relative du taxon i dans l'échantillon ;
- l'indice de Simpson (22), qui se rapporte à l'uniformité de la distribution des taxons dans la communauté : $D = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$, avec p_i l'abondance relative du taxon i dans l'échantillon.

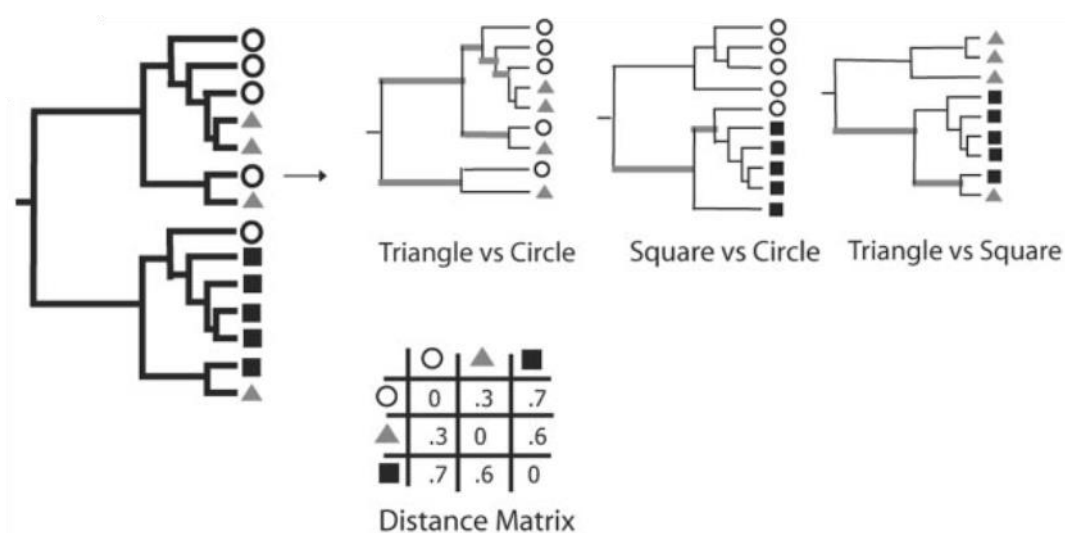
Pour la diversité β , les indices couramment rapportés sont :

- la distance de Bray-Curtis (23) entre les échantillons j et k : $BC_{j,k} = 1 - \frac{2 \times \sum_{i=1}^p \min(N_{ij}, N_{ik})}{\sum_{i=1}^p (N_{ij} + N_{ik})}$, où N_{ij}

est l'abondance brute de l'OTU i dans l'échantillon j et N_{ik} est l'abondance brute de l'OTU i dans l'échantillon k ;

- la distance UniFrac, introduite en 2005, calculée à partir de l'arbre phylogénétique construit sur les 2 échantillons comparés. Cette distance correspond à la fraction de la longueur totale des branches qui est propre à l'un ou à l'autre des échantillons (24). Une version pondérée de cette distance, prenant en compte l'abondance relative de chaque taxon bactérien, est également utilisée (25).

Figure 2. Calcul de la distance UniFrac. Les ronds, les carrés et les triangles représentent des taxons bactériens issus de 3 écosystèmes différents. Les branches de l'arbre phylogénétique sont représentées en noir si elles sont uniques à un des écosystèmes, et en gris si elles sont partagées. D'après (24).



1.3. Importance de l'homéostasie du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal influence positivement l'état de santé de l'hôte (26). Il contribue au développement du corps humain et à la maturation du tube digestif, et est impliqué dans le métabolisme de l'hôte, en facilitant notamment la digestion des sucres et en synthétisant des vitamines et des acides aminés essentiels, et dans la protection de l'hôte, par l'effet de barrière naturel qu'il joue contre les pathogènes et dans l'induction de la réponse immunitaire (27).

Si le tube digestif des nouveaux nés est stérile, sa colonisation après la naissance est rapide, et est influencée par de nombreux facteurs tels que le mode d'accouchement et d'alimentation du nouveau-né, l'hygiène, et l'éventuelle administration de médicaments à la mère ou l'enfant (28). Plusieurs études ont fait état d'un lien entre certaines maladies pédiatriques, telles que l'asthme, les allergies alimentaires ou les maladies du tube digestif, et la composition du microbiote intestinal (26). Le microbiote intestinal semble également influencer le développement de maladies auto-immunes chez

l'adulte, notamment les maladies inflammatoires du tube digestif, les arthrites inflammatoires, le lupus systémique et la sclérose en plaque, en modifiant l'état immunitaire de l'hôte (29). Un rôle dans le développement de maladies hépatiques chroniques ou de troubles neurologiques a également été mis en évidence (30, 31).

Bien que le microbiote soit relativement stable au cours du temps chez des sujets non malades, certains facteurs environnementaux peuvent modifier sa composition. Citons l'âge, le mode de vie ou la prise de traitement médicamenteux (3). L'influence de l'alimentation est forte, tant à court terme (32) qu'à plus long terme (33). Le facteur dont l'influence est la plus importante est certainement l'administration d'antibiotiques.

2. Effets indésirables cliniques des antibiotiques : l'exemple de la colite à *Clostridium difficile*

La diarrhée est en effet l'une des complications les plus fréquentes faisant suite à la prise d'antibiotiques. Sa description remonte aux années 1950, mais elle était alors considérée bénigne, jusqu'à la description au milieu des années 1970 de cas de colite pseudomembraneuse affectant près de 10% des sujets traités par clindamycine (34). Sa fréquence augmentait alors régulièrement, en lien avec le développement de nouveaux antibiotiques et l'élargissement de leur spectre d'activité antibactérienne. On estime actuellement que la diarrhée survient chez 5% à 25% des patients traités par antibiotiques (35, 36), cette fréquence variant en fonction de facteurs liés à l'hôte tels que l'âge, l'état de santé sous-jacent, ou l'administration concomitante de médicaments affectant la motilité intestinale.

Les mécanismes physiopathologiques des diarrhées secondaires à la prise d'antibiotiques peu graves restent mal connus. Plusieurs agents pathogènes ont été incriminés, tels que *Staphylococcus aureus* ou *Candida* spp., notamment chez les patients âgés hospitalisés (37). Leur forme la plus grave, constituée par la colite pseudomembraneuse, a par contre été, et est toujours, l'objet d'intenses travaux de recherche, tant sur le plan physiopathologique que sur les plans épidémiologique et thérapeutique. Cette forme a été rattachée à la présence de *Clostridium difficile*, même si tous les patients colonisés par *Clostridium difficile* ne développent pas l'infection (38).

Clostridium difficile est une bactérie à Gram positif anaérobie sporulée, dont certaines souches pathogènes produisent 2 toxines, à l'origine de la désorganisation du cytosquelette de l'épithélium intestinal et d'une inflammation du tissu conjonctif sous épithélial. Les aspects physiopathologiques sont détaillés dans la section 3.1 de ce chapitre.

Les manifestations cliniques de l'infection à *Clostridium difficile* balaient un large spectre clinique, allant de la diarrhée banale jusqu'à des troubles digestifs sévères associés à des signes systémiques et à des complications menaçant le pronostic vital, telles que la colite pseudomembraneuse, le mégacôlon toxique ou le choc septique (39). L'infection est transmise par des spores résistantes à la chaleur, aux acides et aux antibiotiques. Ces spores sont ubiquitaires, isolées dans les infrastructures sanitaires, au sein de la chaîne alimentaire (40) et à de bas niveaux dans l'environnement (41, 42), permettant les transmissions nosocomiale et communautaire (43), et facilitant les récurrences infectieuses (44). La colonisation par *Clostridium difficile* est prévenue par l'effet de barrière naturelle du microbiote intestinal, dont l'affaiblissement est un facteur de risque majeur de l'infection (38, 45-49).

Une des raisons de la forte morbidité associée à l'infection à *Clostridium difficile* est que les traitements actuels de l'infection, qui reposent sur une antibiothérapie, sont associés à un taux élevé de récurrence, allant de 20% à 30% (50). La récurrence d'infection à *Clostridium difficile* peut résulter de la persistance de spores (définissant la rechute) ou de l'acquisition d'une nouvelle souche bactérienne (définissant la réinfection). La fréquence des récurrences augmente avec le nombre d'épisodes infectieux : elle est estimée à 20% après le premier épisode, à 40% après le second et à plus de 60% après le troisième épisode de colite (50). Chaque épisode est associé à un approfondissement de la perturbation du microbiote intestinal, du fait de la répétition des traitements antibiotiques administrés. Cela aboutit à la constitution d'un cercle vicieux dans lequel la colonisation et la croissance de *Clostridium difficile* sont favorisées, pouvant résulter en de multiples récurrences, en la survenue d'échecs thérapeutiques, en la multiplication des hospitalisations et en la perturbation de la qualité de vie, voire au décès (51).

2.1. Epidémiologie de l'infection à *Clostridium difficile*

L'infection à *Clostridium difficile* est actuellement la principale cause de diarrhée associée aux soins en Europe (52-55) et aux Etats-Unis (5, 56, 57). Au cours des 15 dernières années, l'incidence de l'infection à *Clostridium difficile* et la morbi-mortalité associée à cette infection ont augmenté, de même que le taux de ré-hospitalisation et le coût pour les systèmes de santé (5, 52, 53, 55, 56). Des cas d'endémicité et des épidémies ont été rapportés de toutes les régions du monde, dont l'Europe, les Amériques, l'Asie et le Pacifique Ouest (4, 5, 52-55, 58, 59). Cette situation a conduit le Centers for Diseases Control américain à considérer l'infection à *Clostridium difficile* comme une menace immédiate pour les systèmes de santé, du fait de la morbi-mortalité qu'elle induit et des coûts que sa prise en charge occasionne.

En Europe, les taux d'incidence de l'infection à *Clostridium difficile* parmi les patients hospitalisés se situent entre 0.7 et 28.7 pour 10 000 journées d'hospitalisation (57). La fréquence des infections dans une étude anglaise était de 1.2% dans le groupe placebo d'une étude randomisée évaluant l'effet de l'administration de probiotiques chez des patients de plus de 65 ans traités par antibiotiques (60). Cependant, un taux élevé de sous-diagnostic est suspecté, et au moins 40 000 cas d'infection sont supposés non diagnostiqués chaque année, du fait du manque de diagnostic clinique et de tests de laboratoires inadéquats (38, 52). Une étude conduite entre 2011 et 2013 en Europe, l'étude EUCLID, a fait état d'un taux moyen d'infection à *Clostridium difficile* de 7 pour 10 000 journées d'hospitalisation (52).

Le taux de mortalité liée à cette infection a été estimé à 15%-20% (4, 5, 61, 62). Dans une étude de cohorte canadienne, le risque relatif de mortalité s'élevait à 7.3 à 30 jours et à 3.5 à 180 jours lors d'un épisode d'infection à *Clostridium difficile*, par rapport à l'absence d'épisode infectieux (59). De façon similaire, une étude conduite en 2011 aux Etats-Unis à partir des données de surveillance au sein de laboratoires d'analyses médicales a permis d'estimer le nombre global de cas d'infection à 453 000 (intervalle de confiance à 95%, 397 100 – 108 900), dont les deux-tiers étaient acquis en milieu hospitalier (5). Le nombre de décès dans les 30 jours suivant le diagnostic a été estimé à 29 300 en 2011 (intervalle de confiance à 95%, 16 500 – 42 100), la mortalité étant principalement observée parmi les cas d'infections nosocomiales. Cette étude a également permis d'estimer le nombre de premières récurrences à 83 000 (intervalle de confiance à 95%, 57 000 – 108 900). D'autres études ont décrit un taux de première récurrence de 8.5% à 33% parmi les survivants à un premier épisode infectieux (63, 64).

Le poids médico-économique associé à l'infection à *Clostridium difficile* est lourd (53, 59, 65). La durée de séjour hospitalier lors de la survenue d'un premier épisode infectieux a été rapportée comme étant 33% plus longue qu'en l'absence de survenue de l'infection dans une étude allemande (65). Ce poids est particulièrement marqué lors des épisodes de récurrence : la durée de séjour hospitalier des patients présentant une récurrence infectieuse est quasiment multipliée par 4 par rapport aux patients ne présentant pas d'infection (65).

2.2. Facteurs de risque d'infection à *Clostridium difficile*

Les principaux facteurs de risque reconnus d'infection à *Clostridium difficile* sont la prise d'antibiotiques, l'âge supérieur à 65 ans, l'hospitalisation, l'antécédent d'infection à *Clostridium difficile*, de néoplasie ou d'insuffisance rénale chronique, et la prise de traitements immunosuppresseurs (46, 47, 66-68).

2.2.1. Antibiothérapie et infection à *Clostridium difficile*

L'administration d'antibiotiques est un facteur de risque connu de longue date de la survenue d'une infection à *Clostridium difficile* (45, 48, 49, 60, 68-74).

Une étude de cohorte canadienne a permis d'évaluer précisément ce risque, ainsi que sa persistance au cours du temps (45). En comparaison à des patients non traités par antibiotiques, l'incidence de survenue de l'infection était 2.2 fois plus importante si le traitement antibiotique avait été administré dans les 5 jours précédant la survenue de l'infection (IC95%, 1.2 ; 4.0) et 2.4 fois plus importante (IC95%, 1.4 ; 4.1) chez les patients ayant reçu une antibiothérapie au cours des 30 jours précédant la survenue de l'infection. Dans cette étude, l'incidence d'infection à *Clostridium difficile* était 3.4 fois plus élevée (IC95% 2.0 ; 5.7) chez les sujets traités par céphalosporines de 3^{ème} ou de 4^{ème} génération que chez les sujets non traités, et 2.2 fois plus élevée (IC95% 1.3; 3.7) chez les sujets traités par fluoroquinolones que chez les sujets non traités.

Une autre étude a quantifié le risque de l'infection dans les suites d'un traitement antibiotique chez des patients hollandais (70). Au cours d'un traitement antibiotique et dans le mois suivant l'arrêt du traitement, les patients traités par antibiotiques avaient un risque 7 à 10 fois plus élevé d'infection que ceux n'en ayant pas reçu. L'importance du rôle notamment des fluoroquinolones et des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération a été confirmée par une étude conduite aux Etats-Unis, dans laquelle les patients traités par l'une de ces deux classes d'antibiotiques avaient le risque le plus élevé de développer l'infection (hazard ratio ajusté 4.0, IC95% 2.7 ; 5.9 pour les fluoroquinolones, et 3.1, IC95% 1.9 ; 5.2 pour les céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations) (73). Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude canadienne (49). Plus récemment, une méta-analyse a confirmé le rôle important des céphalosporines et des fluoroquinolones dans la survenue de l'infection (68, 70, 71, 73, 75).

2.2.2. Autres facteurs de risque d'infection à *Clostridium difficile*

L'antécédent d'infection à *Clostridium difficile* est un facteur de risque de la survenue d'un nouvel épisode, indépendamment de l'âge (5, 38, 46, 66, 72, 76-80). Une méta-analyse a quantifié le risque relatif de récurrence à 1.02 (95% CI 1.01-1.02) pour chaque année supplémentaire (75).

L'âge supérieur à 65 ans est également un facteur de risque rapporté (47, 75, 81-83). Le rôle des modifications du microbiote intestinal au cours de la vie, telles que la réduction de la diversité bactérienne et de la résistance à la colonisation, ainsi que la répétition de traitements antibiotiques font partie des facteurs explicatifs potentiels (84, 85). Dans une méta-analyse récente, le risque relatif d'acquisition d'une infection à *Clostridium difficile* a été estimé à 1.6 (IC95%, 1.2 ; 2.1) chez les patients de plus de 65 ans (75).

L'hospitalisation, ou le séjour d'au moins une nuit en milieu hospitalier, est un facteur de risque fréquemment rapporté de développement de l'infection (46, 47, 71, 72, 74, 81, 86). Selon les études, le risque relatif associé au séjour hospitalier varie entre 2.2 et 2.4 (46, 47, 72, 74, 81).

Au sein des structures de soins de longue durée, des fréquences élevées d'infection à *Clostridium difficile* ont été rapportées par plusieurs études, variant de 22.4% à 33.3% (83, 87, 88). En comparaison aux patients traités en ville et après ajustement, les patients hospitalisés en structure de long séjour avaient un risque 7 fois plus élevé de survenue de l'infection (OR = 6.9, IC95%, 4.7 ; 10.2) (88). Ce risque était également augmenté chez des patients recevant des soins infirmiers (83).

Enfin, un grand nombre de comorbidités ont été indépendamment associées à la survenue d'une infection à *Clostridium difficile*, parmi lesquelles l'insuffisance rénale (83, 89), le cancer et les traitements antinéoplasiques (47, 69, 83), le diabète (67, 83) ou l'insuffisance cardiaque congestive (82, 83). Parmi les patients atteints de cancer, aucune association claire avec certains types de cancers particuliers n'a pu être mise en évidence (69, 90). Par ailleurs, certains autres facteurs tels que les maladies inflammatoires du tube digestif (83, 91) ou la prise de traitements inhibiteurs de la pompe à proton (47, 67, 69, 74, 83) ont été indépendamment associés à la survenue de l'infection. De manière plus générale, toute comorbidité, ou un score de comorbidité élevé, comme le score de Charlson, ont été identifiés comme facteurs de risque d'infection à *Clostridium difficile* (83, 92, 93), en particulier chez les patients de plus de 65 ans (83, 93).

3. Perturbation du microbiote intestinal : le rôle des antibiotiques

3.1. Effet sur la composition du microbiote intestinal

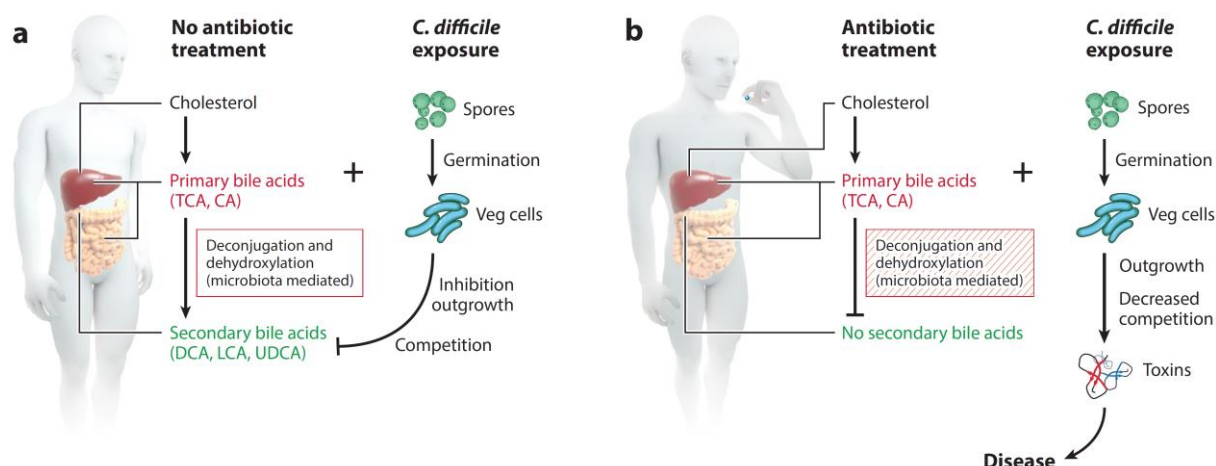
Les progrès spectaculaires au cours de la dernière décennie de techniques indépendantes de la culture, comme le séquençage de nouvelle génération, ont permis de mettre en évidence que la grande majorité des flores commensales est composée d'espèces bactériennes méconnues car non cultivables à l'aide des techniques utilisées jusque-là (14, 94). Une meilleure visualisation des modifications du microbiote intestinal induites par les antibiotiques a ainsi été rendue possible (95). Dans leur étude portant sur des sujets sains traités par ciprofloxacine pendant 5 jours, Dethlefsen *et al.* ont observé que l'administration d'antibiotiques avait un effet rapide en termes de réduction de la diversité bactérienne et de modification de la composition du microbiote intestinal (85, 96). Malgré un certain degré de résilience, le retour à l'état pré-thérapeutique ne semble pas complet. Une réduction de la diversité bactérienne a été observée à long terme, de même qu'une réduction de la résistance à la colonisation dans les suites de l'administration répétée d'un traitement antibiotique. Certains résultats suggèrent que les bactéries anaérobies seraient liées à la résistance à la colonisation (97-99).

Des résultats similaires ont été observés suivant un traitement par clarithromycine et métronidazole (100). Les conséquences de cette évolution vers un état d'équilibre alternatif ne sont pas connues. Cependant, des données récentes obtenues dans un modèle animal de néoplasie suggèrent que l'administration d'antibiotiques au cours d'un traitement antinéoplasique réduirait l'efficacité anticancéreuse (101, 102).

Les effets indésirables intestinaux faisant suite à la prise d'antibiotiques ont été rattachés naturellement à la perturbation du microbiote intestinal secondaire au traitement. Ainsi, les patients présentant une infection à *Clostridium difficile* ont une diversité bactérienne intestinale réduite, et leur microbiote présente une typologie différente de celle de patients indemnes de l'infection (103). Une analyse par séquençage métagénomique non ciblé a révélé que les fèces de patients présentant une infection à *Clostridium difficile* étaient déplétées de germes commensaux ayant un rôle protecteur, tels que *Bacteroides*, *Alistipes*, *Lachnospira*, et *Barnesiella*, et était enrichi en pathogènes opportunistes. Par ailleurs, chez des sujets traités par antibiotiques mais indemnes de l'infection, une réduction significative de l'abondance de souches commensales telles que *Alistipes* a été rapportée, sans réduction de la richesse bactérienne (103). Une dysbiose intestinale persistante a enfin été associée à des infections récurrentes à *Clostridium difficile* (50).

La physiopathologie de l'infection à *Clostridium difficile*, et notamment les relations entre la perturbation du microbiote intestinal et le développement de l'infection, ont été abondamment étudiées à l'aide de modèle animaux, notamment murins. Parmi eux, le modèle d'infection chez le hamster doré est particulièrement utilisé. Sa grande sensibilité à l'infection le rend particulièrement adapté à l'étude des mécanismes physiopathologiques au cours de l'infection aiguë. Les perturbations du microbiote intestinal induites par l'administration d'antibiotiques et leurs liens avec la physiopathologie de l'infection à *Clostridium difficile* ont été récemment synthétisés (104). Le développement de l'infection a ainsi été rattaché au métabolisme du cholestérol, et notamment à la métabolisation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires médiée par le microbiote intestinal (Figure 3). En l'absence de perturbation antibiotique, les acides biliaires secondaires inhibent la sporulation et la croissance de la bactérie au sein du microbiote intestinal. Les antibiotiques, en désorganisant la structure du microbiote, empêchent cette métabolisation, levant de ce fait l'inhibition exercée par les acides biliaires secondaires et permettant à l'infection de se développer.

Figure 3. Mécanismes physiopathologiques expliquant le développement de l'infection à *Clostridium difficile* suite à l'administration d'antibiotiques. D'après (104).



De manière générale, des modifications des quantités et de la composition taxonomique du microbiote intestinal suite à l'administration d'antibiotiques ont été régulièrement rapportées (12, 95). Les traitements antibiotiques perturbent l'équilibre entre les différents groupes bactériens habituellement retrouvés chez les sujets sains. Ce phénomène de dysbiose permet la colonisation par des souches bactériennes résistantes, potentiellement pathogènes, qui peuvent se multiplier *in situ* suite à l'exposition à une antibiothérapie (96, 105, 106). Les effets de l'antibiothérapie sur le microbiote intestinal sont rapides et profonds (107).

3.2. Effet sur l'émergence de la résistance bactérienne

3.2.1. *Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques*

En Europe, la surveillance de l'évolution de la résistance bactérienne est organisée par le Réseau européen de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (EARS-Net). Depuis 1998, ce réseau suit l'évolution de la résistance de 8 espèces bactériennes d'importance en pathologie humaine isolées dans les prélèvements cliniques, au sein de laboratoires sentinelles des pays participants. Les données disponibles montrent que la résistance bactérienne augmente dans tous les pays d'Europe. L'augmentation de la prévalence de la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération des souches d'*Escherichia coli*, bactérie commensale du tube digestif et 1^{er} organisme responsable de bactériémie, est le phénomène le plus inquiétant. Elle est passée de 0.1% en 1999 à 10.5% en 2012 (108). Cette augmentation est observée dans tous les pays, et en 2012 la prévalence de souches résistantes variait entre 4.4% et 38.1% (109). Les données de résistance aux quinolones des souches de *Escherichia coli* présentent la même tendance, de même que celle des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (21.5% de souches résistantes en 2005 et 28.8% en 2012) ou

aux fluoroquinolones (20.2% en 2005 et 27.9% en 2012) (110). Plus de 20% des souches de *Klebsiella pneumoniae* étaient multirésistantes en Europe en 2012, c'est-à-dire résistaient aux céphalosporines de 3^{ème} génération, aux quinolones et aux aminosides (109). La multirésistance entraîne une utilisation accrue des carbapénèmes, antibiotiques de dernière ligne, qui elle-même induit d'autres résistances. La prévalence de la résistance aux carbapénèmes des souches de *Klebsiella pneumoniae* était de 7.7% en moyenne en 2012, mais atteignait 28.8% en Italie et 60.5% en Grèce (109). De la même manière, l'isolement de souches de *Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine n'a cessé d'augmenter, pour dépasser 20% au Portugal et en Irlande en 2012 (109).

Si les chiffres de résistance observés en France ne sont pas aussi élevés que dans certains pays européens, la situation n'en est pas moins préoccupante. Les données de l'EARS-Net pour la France présentent les mêmes tendances. En 2012, moins de 1% des souches de *Klebsiella pneumoniae* étaient résistantes aux carbapénèmes, mais près de 20% étaient considérées comme multirésistantes (109). La résistance des souches de *Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de 3^{ème} génération était observée pour 10% et 17.8% des isolats cliniques, respectivement, en 2012, contre 1.4% et 4.1%, respectivement, en 2005. Enfin, plus de 75% des souches d'*Enterococcus faecium* étaient résistantes à l'amoxicilline, et près de 1% à la vancomycine en 2012.

Dans le cadre du plan antibiotique 2011-2016, cette situation a conduit l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé à établir une liste d'antibiotiques considérés comme critiques du fait de leur aptitude à générer des résistances bactériennes (7). Cette liste contient une famille d'antibiotiques, les fluoroquinolones, ainsi que l'association d'amoxicilline et d'acide clavulanique et la classe des céphalosporines. Dans cette classe, les céphalosporines de 3^{ème} génération, et particulièrement la ceftriaxone, sont pointées du doigt.

3.2.2. *Emergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques*

Deux voies d'émergence et de la diffusion de la résistance bactérienne aux antibiotiques sont principalement décrites (6, 111). La première est la sélection de souches bactériennes porteuses d'une mutation conférant la résistance au sein de la population bactérienne d'un foyer infectieux, et la seconde est la sélection de bactéries résistantes au sein des microbiotes. Ce second mode de sélection de souches résistantes étant habituellement silencieux cliniquement, il a jusqu'à présent été sous-estimé au profit de la sélection au sein de foyers infectieux, dont la traduction clinique est plus immédiate.

Que ce soit au sein des microbiotes ou d'un foyer infectieux, l'émergence de la résistance peut être expliquée par plusieurs mécanismes complémentaires. D'une part, les bactéries soumises à une pression de sélection antibiotique peuvent présenter des mutations de résistance leur conférant un

avantage sélectif en présence d'antibiotique. D'autre part, des transferts de gènes horizontaux ont été décrits, aussi bien entre espèces bactériennes commensales et pathogènes, qu'entre espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées (112, 113, 114). Enfin, l'acquisition de bactéries résistantes peut résulter d'un apport exogène, notamment du fait d'échanges entre individus, de l'apport alimentaire ou de contacts avec un environnement contaminé. Dans ce travail de thèse, le terme d'« émergence » de la résistance sera employé pour désigner la détection de bactéries résistantes dans un échantillon, sans préjuger du mécanisme ayant conduit à cette apparition.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'importance du rôle des microbiotes dans l'émergence et la diffusion de la résistance bactérienne (6, 111). Si la résistance au sein de foyers infectieux ne concerne le plus souvent qu'une seule espèce bactérienne, présente en nombre limité et soumise à des concentrations d'antibiotiques contrôlées au site infecté, la sélection au sein des microbiotes peut concerner plusieurs centaines d'espèces et un nombre très important de souches bactériennes, dans des sites auxquels la concentration d'antibiotique n'est pas contrôlée et où la diversité génétique permet un plus grand nombre de possibilités génétiques pour une souche bactérienne d'acquérir un gène de résistance. Des données récentes suggèrent que lorsque l'exposition du microbiote intestinal varie secondairement à une modification de la dose d'antibiotique administrée, l'impact de l'antibiothérapie est modifié (115). Cette pression de sélection sur les bactéries des flores commensales s'exerce chez tous les sujets traités, après chaque prise, qu'il existe ou non une infection constituée par ailleurs. Ce dernier point est important puisqu'une part très importante des traitements antibiotiques sont administrés à des sujets qui n'ont pas d'infection bactérienne évolutive, comme lors du traitement d'infections de nature virale ou du traitement prophylactique des infections post-opératoires. Les posologies et modes d'administration des antibiotiques sont développés pour atteindre des concentrations cibles non sélectives au site de l'infection, sans analyse des conséquences sur les flores commensales.

3.2.3. Emergence de la résistance bactérienne étudiée par la culture

Les études analysant l'impact des antibiotiques sur la composition qualitative de la flore digestive ont initialement utilisé les méthodes de culture bactérienne pour décrire l'effet d'une antibiothérapie. L'administration d'antibiotiques à doses curatives a un impact sur l'émergence de la résistance au sein des microbiotes (116-121), et a un impact sur leur composition bactérienne. Une étude menée auprès de 48 sujets sains traités pendant 14 jours par une fluoroquinolone, la ciprofloxacine, a montré qu'un tiers des sujets traités étaient colonisés avec des entérobactéries résistantes à la ciprofloxacine un mois après la fin du traitement, contre 12.5% avant traitement (118). Dans une étude cas-témoins appariée portant sur 416 patients hospitalisés dans un service d'hématologie, l'odds-ratio de

colonisation fécale à entérobactérie résistante au céfotaxime (une céphalosporine de 3^{ème} génération) en cas d'exposition individuelle à cet antibiotique au cours de l'hospitalisation était estimé à 7.3 (IC95%, 1.8 – 30) (116). Dans une étude comparant l'efficacité thérapeutique de l'ertapénème, un carbapénème, et d'une association de ceftriaxone (une céphalosporine de 3^{ème} génération) et métronidazole au cours d'infections intra-abdominales, 2.6% des patients recevant de la ceftriaxone étaient colonisés à entérobactéries résistantes à la ceftriaxone avant traitement, contre 17.1% à la fin du traitement et 22.4% deux semaines après la fin du traitement (121). Les céphalosporines de 3^{ème} génération ont un effet rapide en termes de suppression de la flore sensible et d'émergence de germes résistants (122-125). C'est également le cas des quinolones (118, 126, 127). Ces études suggèrent que la résistance bactérienne apparaît à la fin des traitements, alors que les concentrations fécales d'antibiotiques diminuent.

3.2.4. *Emergence de la résistance bactérienne étudiée par méthodes moléculaires*

L'impact des traitements antibiotiques sur la résistance bactérienne au sein du microbiote intestinal est donc un phénomène bien connu, mais sa caractérisation repose principalement sur les résultats obtenus par culture bactérienne. Actuellement, aucune donnée quantitative précise n'existe concernant les modifications induites par une antibiothérapie sur le contenu du microbiote intestinal en gènes de résistance. Ce qui arrive après la fin du traitement est peu décrit, alors même que les études basées sur la culture bactérienne suggèrent que cette période est une période clé pour l'émergence de la résistance (118). Certaines études existent, mais ont été réalisées chez de faibles nombres de sujets et se sont concentrées seulement sur certaines populations bactériennes, à l'aide de PCR ciblées.

Ainsi, Jernberg *et al.* (128) ont analysé les bactéries du genre *Bacteroides* de 4 sujets traités par clindamycine, un lincosamide, pendant 7 jours. Ils ont rapporté un déclin de la diversité du genre *Bacteroides*, qui persistait au cours des 2 années de suivi. Ils ont également rapporté l'émergence et la persistance à long terme de clones de *Bacteroides* résistants. Le contenu fécal en gènes conférant la résistance à la clindamycine était rapidement augmenté après le début du traitement, et persistait à un niveau élevé jusqu'à la fin du suivi. Des conclusions similaires ont été tirées de l'analyse de la population des bactéries du genre *Enterococcus* chez ces sujets (129). Ces études suggèrent que l'impact des antibiotiques sur le contenu du microbiote intestinal en gènes de résistance persiste à long terme, sans retour complet à l'état pré-thérapeutique.

Globalement, ces résultats incitent fortement à mieux documenter l'impact d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal. Ils suggèrent une importance insoupçonnée du maintien de l'homéostasie du microbiote intestinal, tant pour réduire le risque de dysbiose intestinale que pour limiter

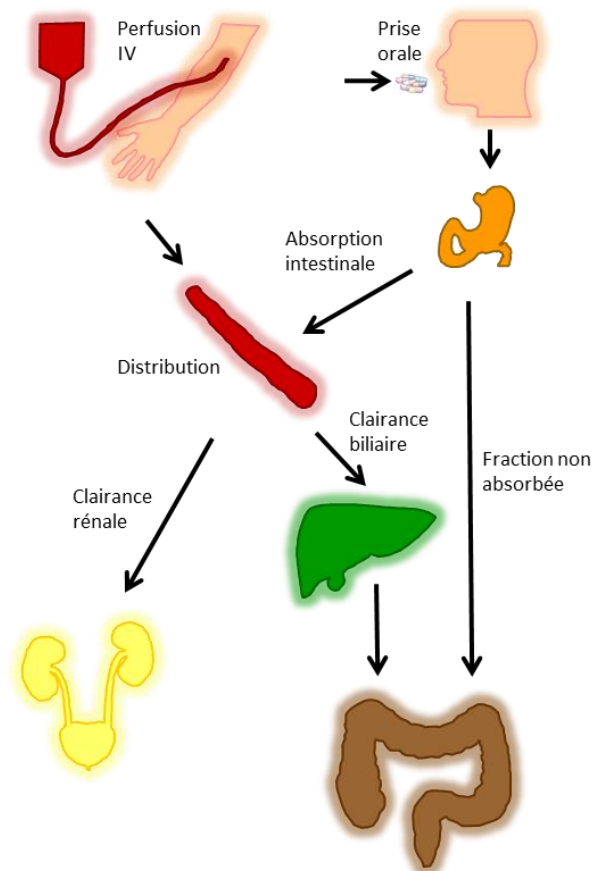
l'émergence de la résistance. A cette fin, l'administration d'antibiotiques doit ainsi être raisonnée afin de limiter leur impact sur les microbiotes. Il semble par ailleurs primordial d'identifier les vecteurs de l'impact des antibiotiques sur le microbiote.

3.3. Facteurs affectant l'exposition du microbiote intestinal aux antibiotiques

Deux facteurs principaux contribuent à la variabilité de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal: le niveau d'exposition du microbiote à l'antibiotique, et l'activité antibactérienne intrinsèque de l'antibiotique sur les bactéries constitutives du microbiote. L'activité antibactérienne intrinsèque des antibiotiques est le fondement de leur utilisation chez des patients infectés. Le choix de l'antibiothérapie empirique repose sur des données épidémiologiques de résistance bactérienne, compte tenu de l'organe supposément infecté. Le plus souvent, une antibiothérapie à large spectre est administrée initialement, après réalisation de prélèvements microbiologiques. La sensibilité aux antibiotiques de la ou des bactérie(s) identifiée(s) est habituellement obtenue après 2 à 3 jours. L'antibiothérapie est alors modifiée pour une molécule dont le spectre d'activité est plus étroit, centré sur la souche isolée. Cependant, si l'effet des antibiotiques sur les bactéries cultivables du microbiote intestinal est assez bien décrit (12), celui-ci doit être réévalué à l'aide des nouvelles méthodes d'analyse indépendantes de la culture, afin d'avoir une meilleure connaissance de l'effet global des antibiotiques sur le microbiote intestinal (130).

Le degré d'exposition du microbiote intestinal aux antibiotiques résulte des caractéristiques pharmacocinétiques des molécules administrées et du schéma posologique utilisé. Que l'administration soit faite par voie intraveineuse ou par voie orale, une fraction variable de la dose administrée est éliminée par voie biliaire, sous forme inchangée ou après métabolisation (Figure 4). Les métabolites peuvent eux-mêmes présenter une activité antibactérienne, similaire ou non à celle de la molécule mère.

Figure 4. Processus liés à la présence d'antibiotiques dans le tube digestif suivant une administration orale ou parentérale.



Un petit nombre d'études suggère qu'il est possible de réduire l'impact d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal en prenant en compte la voie d'élimination des antibiotiques administrés (124, 125, 131). Ce rôle des caractéristiques pharmacocinétiques est particulièrement bien illustré par la comparaison de l'impact de deux antibiotiques de la famille des céphalosporines de 3^{ème} génération, la ceftriaxone et le céfotaxime. Ces deux molécules ont un spectre d'activité antimicrobienne très similaire. Elles ont une efficacité comparable (132-136), et sont utilisées dans les mêmes indications. Elles ont leur place dans la grande majorité des infections communautaires nécessitant une hospitalisation en salle de médecine ou en soins intensifs (137-139). Leurs différences tiennent principalement à leurs caractéristiques pharmacocinétiques, qui conditionnent leur maniabilité.

La ceftriaxone est une molécule dont la demi-vie a été estimée à 8 heures (140-142). Cette longue demi-vie permet une utilisation facilitée et une administration en une seule injection quotidienne. Sa liaison aux protéines plasmatiques est importante, atteignant des valeurs de l'ordre de 90% (143). Son élimination biliaire est forte, environ 50% d'une dose administrée par voie intraveineuse étant retrouvée dans les selles (144). La proportion de ceftriaxone éliminée dans les urines a été estimée

entre 40% et 65% (144). L'élimination est faite sous forme active dans les selles et les urines. Une étude a montré que l'excrétion biliaire de la ceftriaxone présente une forte variabilité interindividuelle (145). La forte élimination biliaire de la ceftriaxone est considérée comme expliquant son effet observé sur la flore digestive. En effet, des données quantitatives expérimentales ont été obtenues chez la souris avec différentes céphalosporines de 3^{ème} génération ayant un taux variable d'élimination biliaire. Les résultats suggèrent que l'impact sur la flore intestinale est d'autant plus faible que la fraction excrétée est faible (131). Chez l'homme, dans une étude portant sur 6 volontaires chez lesquels la concentration de ceftriaxone était mesurée dans le duodénum, la réduction des comptes d'*Escherichia coli* et de *Bacteroides spp.* observée dans les selles, de même que l'augmentation des comptes de *Lactobacillus spp.* et de *Enterococcus spp.* (espèces naturellement résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération), étaient fortement corrélée au taux d'excrétion biliaire de la ceftriaxone (145).

A la différence de la ceftriaxone, le céfotaxime est une molécule dont la demi-vie, de l'ordre d'une heure, impose trois injections quotidiennes (146). Elle est métabolisée en désacétyl-céfotaxime, ayant une faible activité microbienne, puis en dérivés inactifs. L'élimination est principalement réalisée par voie urinaire (90%), et 10% de la dose administrée est éliminée par voie fécale (146, 147). Un tiers de la dose administrée est éliminé par le rein sous forme inchangée, 25% sous la forme de son métabolite principal et environ 20 % sous la forme de métabolites inactifs (146). L'effet du céfotaxime sur les entérobactéries est modéré, et les comptes d'entérocoques et de levures sont peu modifiés (148, 149).

Peu d'études ont directement comparé l'impact de ces 2 molécules sur le microbiote intestinal. Deux études randomisées ont été conduites chez des patientes pour lesquelles une intervention chirurgicale gynécologique était programmée (124, 125). L'antibiothérapie, administrée à titre prophylactique par voie intraveineuse, consistait soit en une dose unique de 2 grammes de ceftriaxone, soit en une dose unique de 2 grammes de céfotaxime. Dans l'étude de Bräutigam *et al.* portant sur 30 patientes, les comptes d'*Escherichia coli* étaient réduits à des niveaux similaires au 5^{ème} jour après traitement (125). Une augmentation des comptes d'*Enterococcus faecalis* était observée dans le groupe ceftriaxone sans modification notable des comptes dans le groupe céfotaxime, mais la différence n'était pas significative. Enfin, l'émergence de *Candida spp.* était observée dans le groupe ceftriaxone à des taux significativement plus élevés que dans le groupe céfotaxime. Dans l'étude de Michea-Hamzhepour *et al.* incluant 27 patientes, l'administration de céfotaxime entraînait une réduction modérée des comptes de bactéries aérobies à Gram négatif, sans détection de germes résistants au cours des 7 jours de suivi après traitement (124). L'effet de la ceftriaxone était plus marqué. Une réduction significative des comptes d'entérobactéries et de *Pseudomonas spp.* était observée, ainsi qu'une augmentation marquée de la flore fongique. Une augmentation de la flore

totale aérobie résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération était également observée. Cette flore résistante persistait pendant toute la période de suivi.

Deux études écologiques récentes vont dans le même sens (150, 151). Dans l'étude avant-après de Grohs *et al.*, l'incidence de prélèvements cliniques mettant en évidence une infection à une souche d'entérobactérie résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération dans un hôpital universitaire parisien était comparée avant et après l'arrêt d'utilisation de ceftriaxone dans l'hôpital (151). L'augmentation d'incidence d'infections cliniques à entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération par hyperproduction de céphalosporinase observée avant l'intervention était significativement infléchie après suppression de la ceftriaxone du centre hospitalier. Cet infléchissement était observé malgré une augmentation de la consommation de céfotaxime au cours de la période post-intervention. Dans l'étude de Gbaguidi-Haore *et al.*, les données annuelles de consommation d'antibiotiques et de résistance bactérienne observées en France ont été analysées entre 2007 et 2009 par modélisation à effets mixtes (150). A la différence de la consommation de céfotaxime, la consommation de ceftriaxone était corrélée au taux d'incidence d'infections à *Escherichia coli* résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Les consommations de ceftriaxone et céfotaxime étaient toutes deux corrélées à l'incidence d'infections à *Enterobacter cloacae* résistant aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

En conclusion, ces données laissent entrevoir un impact plus important de la ceftriaxone sur le microbiote intestinal. Cependant, aucune de ces études n'a comparé de façon prospective les 2 molécules selon un régime d'administration standard en pratique clinique, limitant ainsi la validité de leurs conclusions. De fait, la ceftriaxone est largement plus utilisée que le céfotaxime. Les données non publiées de la Commission des Anti-infectieux de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris pour 2013 montraient une utilisation de ceftriaxone deux fois plus importante que celle de céfotaxime, en considérant le nombre de doses journalières recommandées. Cette différence est probablement liée à la meilleure maniabilité de la ceftriaxone.

4. Modélisation des relations dose – concentration – effet

4.1. Modèles mathématiques

La modélisation mathématique et statistique est de plus en plus utilisée en pharmacologie pour étudier les relations dose – concentration – effet des médicaments. Les modèles pharmacocinétiques décrivent la relation entre la dose de produit administrée et sa concentration dans l'organisme, et les modèles pharmacodynamiques décrivent la relation entre la concentration et son effet sur

l'organisme. Ces modèles permettent de décomposer les différentes sources de variabilité de la relation dose – concentration – effet.

4.1.1. Modèles pharmacocinétiques

La pharmacocinétique d'un médicament dépend d'un certain nombre d'étapes physiologiques concomitantes, habituellement décrites par le processus ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Elimination) (152).

L'absorption se réfère le plus souvent à l'absorption systémique, c'est-à-dire aux étapes qui conduisent le médicament dans la circulation générale à partir de son site d'administration. Cette étape comprend le processus d'absorption proprement dite (absorption intestinale, passage de la barrière cutanée en cas d'administration transcutanée, *etc.*) et les éventuels effets de premier passage, tel que le premier passage hépatique pour les médicaments administrés par voie orale. L'étape d'absorption est généralement résumée par l'estimation de la biodisponibilité, fraction de la dose administrée atteignant effectivement la circulation générale. Dans le cas particulier d'une administration intraveineuse, la biodisponibilité est de 100%.

La distribution correspond à la répartition du médicament administré dans l'organisme, à partir de la circulation générale. Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques, le médicament peut exister sous différentes formes dans le plasma et les tissus. On distingue habituellement la fraction libre et la fraction liée aux protéines (plasmatiques ou tissulaires). Seule la fraction libre du médicament se répartit dans les tissus, et ce de façon réversible. Elle peut s'y lier à des protéines tissulaires. L'étape de distribution est représentée par le volume de distribution, volume théorique dans lequel diffuserait l'ensemble du médicament administré pour atteindre la concentration observée dans le plasma.

Le processus d'élimination du médicament comprend les deux dernières étapes de la pharmacocinétique, le métabolisme et l'excrétion. Il s'agit des différents mécanismes mis en œuvre pour permettre au médicament de quitter l'organisme. L'étape de métabolisme est celle de la modification des structures chimiques des composés administrés, elle a lieu essentiellement au niveau du foie mais certaines réactions peuvent se dérouler dans d'autres organes. L'étape d'excrétion correspond à l'élimination du médicament administré sous forme inchangée ou de ses métabolites hors de l'organisme. L'excrétion peut se dérouler dans les urines, dans la bile, *etc.*

La quantification de l'élimination est faite à l'aide de la notion de clairance, définie comme un débit. Elle peut être interprétée comme le volume de fluide entièrement épuré de médicament par unité de temps. Elle se calcule par le rapport entre la vitesse d'élimination du médicament et la concentration du médicament au site d'élimination. Elle peut être définie pour l'ensemble de l'organisme (on parle de clairance totale), ou au niveau d'un organe en particulier. Les clairances des différents organes sont généralement additives, leur somme constituant la clairance totale.

L'approche compartimentale consiste à représenter explicitement l'organisme sous forme de plusieurs compartiments à l'intérieur desquels la molécule est supposée suivre une cinétique homogène, sans que ceux-ci aient systématiquement une réelle correspondance physiologique (152). Cela se traduit par un modèle mathématique défini par un système d'équations différentielles ordinaires décrivant l'évolution, observée ou non, des concentrations de médicament dans chacun de ces compartiments. En fonction de la complexité du modèle, le système peut avoir ou non une solution analytique. Le passage de la molécule d'un compartiment à l'autre peut être décrit par des processus d'ordre 0, dans lequel la quantité transférée est constante au cours du temps, d'ordre 1, dans lequel la quantité transférée est proportionnelle à celle présente à l'intérieur du compartiment à l'instant t , ou par des processus non linéaires prenant en compte une saturation.

Les paramètres pharmacocinétiques de la molécule peuvent ensuite être dérivés des paramètres physiologiques du modèle décrivant le processus ADME, ou calculés numériquement à partir des prédictions du modèle.

Par exemple, un modèle à 2 compartiments avec une élimination d'ordre 1, représenté Figure 5, aura pour équation :

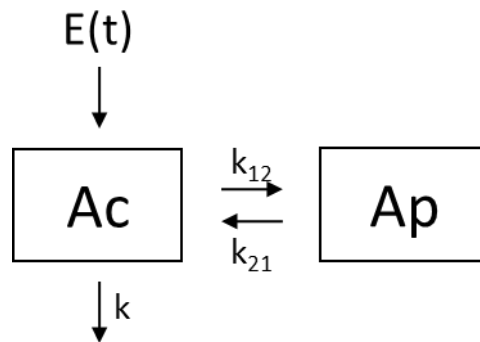
$$\frac{dA_c}{dt} = E(t) + k_{21} \times A_p - (k + k_{12}) \times A_c$$

$$\frac{dA_p}{dt} = k_{12} \times A_c - k_{21} \times A_p$$

$$C_c = \frac{A_c}{V}$$

en notant A_c la quantité de molécule dans le compartiment central; A_p la quantité de molécule dans le compartiment périphérique; $E(t)$ la fonction d'entrée de la molécule dans le compartiment central ; k la constante d'élimination ; k_{12} and k_{21} les constantes de transfert; C_c la concentration de la molécule dans le compartiment central et V le volume de distribution de la molécule à l'équilibre. Au temps $t = 0$, la quantité de médicament dans le compartiment périphérique est nulle, de telle sorte que l'on peut écrire : $A_p(0) = 0$.

Figure 5. Représentation schématique d'un modèle à deux compartiments avec une élimination linéaire

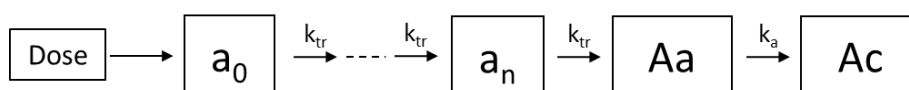


La quantité de médicament arrivant dans le compartiment central dépend du mode d'administration. Par exemple, lors d'une administration intraveineuse directe (sous la forme d'un bolus), on considère habituellement que l'ensemble de la dose est administrée et se répartit dans le compartiment central instantanément, de telle sorte qu'au temps $t = 0$, $A_c(0) = Dose$.

Lorsque l'administration du médicament se fait par voie orale, on suppose que l'absorption se produit à partir d'un compartiment spécifique, le compartiment d'absorption, à partir duquel la fraction biodisponible $F \times Dose$ du médicament est absorbée vers le compartiment central, avec – dans le cas d'une absorption d'ordre 1 – une vitesse k_a . La fonction d'entrée s'écrit alors : $E(t) = F \times Dose \times k_a \times e^{-k_a \times t}$ et $A_c(0) = 0$.

Par ailleurs, il est fréquent qu'un certain délai soit observé entre l'administration du médicament et son apparition dans le compartiment central, du fait par exemple du temps de latence nécessaire à la vidange gastrique pour une molécule absorbée au niveau jéjunal. Ce délai peut être modélisé par l'ajout d'un paramètre de latence, T_{lag} , ou en introduisant un ensemble de compartiments dits de transit (voir Figure 6), à travers lesquels passe la molécule après son administration avant d'arriver dans le compartiment d'absorption (153). L'utilisation d'un modèle à compartiments de transit s'est avérée plus adéquate pour modéliser le temps de latence entre l'administration et la détection du médicament dans le plasma (153).

Figure 6. Représentation schématique d'un modèle d'absorption à compartiments de transit.



Dans ce modèle, la quantité de médicament a_n dans le compartiment de transit n peut s'écrire sous

$$\text{la forme : } \frac{da_n}{dt} = k_{tr} \times a_{n-1} - k_{tr} \times a_n,$$

et l'évolution de la quantité du médicament dans le compartiment d'absorption s'écrit :

$$\frac{dA_a}{dt} = Dose \times F \times k_{tr} \times \frac{(k_{tr} \times t)^n \times e^{-k_{tr} \times t}}{n!} - k_a \times A_a.$$

4.1.2. Modèles pharmacodynamiques

La modélisation pharmacodynamique permet de décrire la relation existant entre les concentrations du médicament et les effets qui en résultent (152). Plusieurs classes de modèles ont été développées pour décrire cette relation.

Modèles d'effet direct

Les modèles dits à effet direct sont caractérisés par un lien direct entre la concentration mesurée et l'effet observé : l'effet observé est directement lié à la concentration mesurée au même temps. Si le médicament induit une augmentation de la réponse biologique, le modèle est appelé un modèle E_{max} et la réponse observée peut s'écrire : $E = E_0 + \frac{E_{max} \times C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$, où E_0 est la valeur initiale de l'effet lorsque la concentration est nulle, E_{max} est l'effet maximal du médicament, EC_{50} est la concentration du médicament correspondant à 50% de l'effet maximal et γ est le coefficient de sigmoïdité. Parfois, l'effet E est expliqué directement par la dose D du médicament administré. Le modèle s'écrit alors en remplaçant la concentration C du médicament par la dose D , et en remplaçant EC_{50} par ED_{50} .

Dans le cas où le médicament induit une diminution de la réponse, le modèle est un modèle I_{max} , qui s'écrit alors $E = E_0 \times (1 - \frac{I_{max} \times C^\gamma}{IC_{50}^\gamma + C^\gamma})$, où E_0 est la valeur initiale de l'effet lorsque la concentration est nulle, I_{max} est l'inhibition maximale de la réponse induite par le médicament, IC_{50} est la concentration du médicament correspondant à 50% de l'effet d'inhibition maximal et γ est le coefficient de sigmoïdité.

Modèles de turnover

Le plus souvent cependant, un décalage temporel est observé entre le profil des concentrations en fonction du temps et le profil de la réponse. Plusieurs modèles sont susceptibles de représenter ce décalage, selon qu'il est supposé être lié à un temps de latence nécessaire pour que le médicament atteigne sa cible (modèles à compartiment d'effet et modèles à compartiments de transit (152, 154)) ou qu'il est supposé lié au délai nécessaire pour que le médicament module le processus de production ou d'élimination de la réponse. Cette dernière classe de modèles dits de turnover considère la réponse biologique R comme une quantité biologique, produite à un taux R_{in} et éliminée selon un processus d'ordre 1, de constante de vitesse k_{out} (voir (155) et Figure 7).

Figure 7. Modèle de turnover (en l'absence de médicament)



En l'absence du médicament, les équations du modèle s'écrivent : $\frac{dR}{dt} = R_{in} - k_{out} \times R$. A l'équilibre, $R_0 = \frac{R_{in}}{k_{out}}$.

Ces modèles sont dits « indirects » car les concentrations n'agissent pas directement sur la réponse d'intérêt, mais sur les paramètres qui régissent son évolution au cours du temps. Le médicament peut induire une inhibition ou une stimulation de la production ou de l'élimination de la réponse biologique. Dans le cas d'une réduction de la réponse observée suite à l'administration du traitement, il est ainsi possible que le médicament induise soit une inhibition de la production de la réponse R_{in} : $R'_{in} = (1 - \frac{I_{max} \times C}{IC_{50} + C}) \times R_{in}$, soit une stimulation de son élimination k_{out} : $k'_{out} = (1 + \frac{E_{max} \times C}{EC_{50} + C}) \times k_{out}$.

4.2. Modélisation non linéaire à effets mixtes

L'estimation des paramètres individuels par une régression non linéaire des données individuelles pour chaque sujet n'est pas satisfaisante. En effet, la moyenne et la variance attendues des paramètres dans la population sont alors estimées à partir des paramètres individuels, mais cette approche néglige l'erreur de l'estimation des paramètres, ce qui conduit à une surestimation de leur variabilité. Dans le cas de données riches, c'est-à-dire d'un nombre important de données par sujet, les résultats obtenus avec cette approche sont acceptables, car les erreurs d'estimation des paramètres sont alors faibles. Par contre, dans le cas de données éparées, la régression non linéaire individuelle peut se révéler impossible. La modélisation statistique à effets mixtes permet de pallier à ces problèmes, en analysant simultanément l'ensemble des données longitudinales des sujets et en permettant l'estimation des caractéristiques de la population, c'est-à-dire de la moyenne dans la population et de la variabilité interindividuelle des paramètres du modèle étudié.

4.2.1. *Modèle statistique*

La structure générale des modèles non linéaires à effets mixtes est la suivante :

$$y_{ij} = f(\theta_i, t_{ij}) + g(\theta_i, t_{ij}) \times \varepsilon_{ij}$$

où y_{ij} est l'observation pour le sujet i au temps t_{ij} , f est le modèle structural non linéaire, qui permet de décrire l'évolution de la réponse y au cours du temps, θ_i est le vecteur des paramètres individuels, ε_{ij} est l'erreur résiduelle, et g est le modèle de l'erreur résiduelle.

Les erreurs résiduelles ε_{ij} sont supposées indépendantes et suivre une distribution normale, de moyenne nulle et de variance 1. La fonction g peut être écrite : $g(\theta_i, t_{ij}) = \sigma_{inter} + \sigma_{slope} \times f(\theta_i, t_{ij})$, où σ_{inter} est le paramètre pour la composante additive de l'erreur résiduelle et σ_{slope} est le paramètre pour la composante proportionnelle. Des modèles d'erreur résiduelle constante ($\sigma_{inter} \neq$

0, $\sigma_{slope} = 0$), proportionnelle ($\sigma_{inter} = 0$, $\sigma_{slope} \neq 0$) ou combinée ($\sigma_{inter} \neq 0$, $\sigma_{slope} \neq 0$) sont habituellement utilisés en pharmacométrie.

Dans ces modèles, la fonction f est supposée commune à tous les individus, mais le vecteur des paramètres θ_i pour le sujet i varie d'un individu à l'autre. Chaque paramètre individuel θ_i peut être décomposé en une partie fixe μ , qui représente la valeur moyenne ou typique du paramètre dans la population, et en une partie aléatoire $\eta_i \sim \mathcal{N}(0, \Omega)$, où Ω est la matrice de variance-covariance, spécifique de chaque sujet et qui permet de quantifier l'écart du sujet par rapport au comportement moyen de la population. Le vecteur des paramètres individuels s'écrit alors comme: $\theta_i = \mu + \eta_i$ si θ_i est supposé suivre une loi normale, ou comme : $\theta_i = \mu \times e^{\eta_i}$, dans le cas plus fréquent où θ_i est supposé suivre une loi log-normale. Cette hypothèse permet en effet d'assurer que les paramètres demeurent positifs.

Les paramètres individuels peuvent ensuite être estimés à l'aide d'une méthode bayésienne. La distribution des paramètres de population est utilisée comme distribution *a priori*, et les concentrations observées pour chacun des patients sont utilisées afin d'estimer la distribution *a posteriori* des paramètres chez le patient considéré. Les paramètres individuels sont souvent estimés comme le mode *a posteriori* de la distribution. L'établissement des profils cinétiques individuels consiste ensuite en l'application du modèle structural choisi aux patients à l'aide de leurs paramètres individuels ainsi estimés.

4.2.2. Méthodes d'estimation des paramètres

Il existe deux approches pour l'estimation des paramètres dans les modèles non linéaires à effets mixtes, la méthode dite du maximum de vraisemblance et l'approche bayésienne. La plupart des méthodes utilisées reposent sur l'estimation par maximum de vraisemblance (156). Cependant, la difficulté réside dans la non-linéarité du modèle structural f en ses paramètres, et la vraisemblance des observations n'admet pas de solution analytique.

Une première approche pour la calculer a été proposée au début des années 1970 par Lewis Sheiner, et a consisté à linéariser le modèle (157). Cela permet en effet de se ramener à un modèle linéaire mixte, dont la vraisemblance a une forme explicite. Plusieurs méthodes ont ainsi été développées. Les premiers algorithmes reposaient sur une linéarisation du modèle au premier ordre, soit autour de l'espérance des effets aléatoires, c'est-à-dire autour de 0, pour la méthode dite First Order (157), soit autour des estimations individuelles des effets aléatoires, pour la méthode dite First Order Conditional Estimation (158). Avec ces méthodes de linéarisation, les paramètres du modèle sont ensuite estimés par maximisation de la vraisemblance en utilisant un algorithme itératif, tels que l'algorithme de Newton-Raphson, qui converge vers l'estimation finale des paramètres du modèle.

La limite majeure de ces méthodes réside dans leur principe même, c'est-à-dire qu'elles sont basées sur une vraisemblance approchée, dont la convergence vers l'estimateur du maximum de vraisemblance n'a pas été démontrée. Ainsi, certains auteurs ont rapporté que ces algorithmes pouvaient produire des estimateurs biaisés et peu précis (159, 160).

D'autres algorithmes ont été proposés pour pallier à ces limites. Ils reposent sur un calcul dit exact de la vraisemblance, dans la mesure où ils ne font pas appel à une vraisemblance approchée, mais reposent sur une approximation qui peut être rendue aussi bonne que voulu, au prix d'un temps de calcul augmenté. Ces méthodes ont été rendues possibles grâce à l'amélioration de la puissance des ordinateurs.

Les premières méthodes d'estimations reposent sur l'intégration numérique pour le calcul de la vraisemblance. Une méthode basée sur une approximation de Laplace initialement proposée (161) a ensuite été étendue pour le développement de la quadrature de Gauss, basée sur un développement de l'approximation de Laplace à un ordre plus élevé. Ces méthodes présentent cependant l'inconvénient d'un temps de convergence long, et une méthode de quadrature de Gauss adaptative a été proposée par Pinheiro et Bates, permettant – outre un temps de calcul plus faible – une estimation plus précise et moins biaisée des paramètres du modèle (162).

D'autres méthodes, basées sur une intégration stochastique, font appel à la méthode de Monte Carlo. L'algorithme Stochastic Approximation Expectation Maximisation (SAEM), développé par Kuhn et Lavielle, s'appuie sur cette méthode (163). Il s'agit d'une version stochastique de l'algorithme EM dans laquelle les paramètres individuels sont considérés comme des valeurs manquantes. L'étape d'estimation se décompose en une simulation de paramètres individuels avec une méthode de Monte Carlo par chaînes de Markov, suivie du calcul de statistiques suffisantes de la vraisemblance des données complètes. La maximisation de ces statistiques suffisantes permet d'obtenir de nouvelles valeurs des paramètres, réutilisées à la première étape de l'itération suivante jusqu'à convergence de l'algorithme.

L'algorithme SAEM est implémenté dans le logiciel MONOLIX (<http://www.lixoft.eu>). L'algorithme SAEM est également implémenté dans le logiciel NONMEM depuis la version 7, dans S-ADAPT depuis la version 1.56 et dans le package R saemix (www.saemix.biostat.fr) depuis juillet 2011 (164).

Au cours de cette thèse, nous utiliserons l'algorithme SAEM implémenté dans MONOLIX pour analyser des données expérimentales par modélisation non linéaire à effets mixtes.

4.2.3. Evaluation du modèle

De nombreuses hypothèses sont faites lors du développement d'un modèle, qu'il s'agisse du choix du modèle mathématique structural, du modèle de variabilité ou du modèle de l'erreur résiduelle. Ces hypothèses doivent être évaluées et validées. Différents critères numériques et graphiques sont

utilisés pour l'évaluation (165). Nous présenterons ici les critères liés à la précision d'estimation des paramètres, et évoquerons les principales évaluations graphiques.

L'erreur standard (SE, Standard Error) associée à l'estimation de chaque paramètre du modèle quantifie la précision de cette estimation. Le résultat mesurant la précision d'estimation généralement reporté est l'erreur standard relative (RSE, Relative Standard Error), calculée comme le ratio de la SE sur l'estimation du paramètre associé. Cette métrique est exprimée en pourcentage. Une faible précision d'estimation, qui se traduit par une SE élevée, est due à un manque d'information, c'est-à-dire à un manque de données, pour l'estimation du paramètre. Cela peut être le signe que le modèle est sur-paramétré, mais également que le protocole de prélèvement de l'étude n'a pas été suffisamment bien conçu pour permettre l'estimation de ce paramètre. C'est pourquoi la précision d'estimation doit être évaluée au regard des données disponibles.

L'évaluation graphique des modèles comprend des évaluations basées sur les prédictions et d'autres basées sur les résidus du modèle.

Les diagnostics graphiques les plus simples sont basés sur la comparaison des observations aux prédictions du modèle. Il peut s'agir de l'ajustement pour chaque individu, qui permet de vérifier que le modèle décrit correctement les données observées en comparant pour chaque individu les observations aux profils prédits par le modèle, ou des graphiques des prédictions de population ou individuelles en fonction des observations, qui permettent d'évaluer la qualité du modèle structural et les hypothèses faites sur les modèles de variabilité et d'erreur résiduelle. De la même manière, le graphique des résidus pondérés en fonction du temps ou des prédictions individuelles permettent de détecter des anomalies de modèle structural ou de modèle d'erreur résiduelle.

D'autres diagnostics graphiques, plus complexes, sont basés sur des simulations faites à partir du modèle ajusté aux données. L'idée est de considérer graphiquement la correspondance entre les observations à partir desquelles le modèle a été ajusté et les données simulées sous le modèle obtenu. Si le modèle décrit correctement ces données, alors les données simulées doivent être similaires aux observations. Le graphique le plus couramment utilisé est le Visual Predictive Check (VPC), qui superpose la distribution des observations (habituellement, le 10^{ème} percentile, la médiane et le 90^{ème} percentile) à celle de données simulées, ou à l'intervalle de confiance à 95% des percentiles des données simulées. D'autres métriques sont également utilisées, telles que les NPDE (Normalized Prediction Distribution Errors) (166).

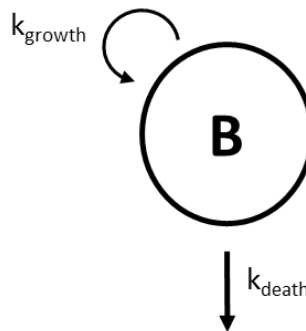
4.1. Modèles mathématiques de cinétique bactérienne

Les modèles de cinétique bactérienne sont en général composés de modèles décrivant (i) la croissance bactérienne, (ii) la pharmacocinétique de l'antibiotique et (iii) la relation entre la dose (ou la concentration) de l'antibiotique et son effet.

Le modèle de croissance bactérienne le plus simple ne comporte qu'un seul compartiment bactérien, noté B, et des constantes de croissance (k_{growth}) et de mort (k_{death}) bactériennes du premier ordre (voir Figure 8) (167) :

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \times B - k_{death} \times B$$

Figure 8. Exemple schématique d'un modèle de cinétique bactérienne avec une réplication saturable dans lequel l'élimination des bactéries est due à l'élimination naturelle



En général cependant, le nombre de bactéries ne croît pas de manière exponentielle, et la croissance bactérienne observée est un phénomène saturable, dans lequel le nombre maximal de bactéries supporté par le système s'écrit B_{max} . Cette croissance saturable peut être modélisée à l'aide d'une fonction logistique $1 - \frac{B}{B_{max}}$, qui limite la croissance bactérienne (168-170). Le modèle s'écrit alors :

$$\frac{dB}{dt} = k_{growth} \times \left(1 - \frac{B}{B_{max}}\right) \times B - k_{death} \times B$$

Une autre méthode permettant de rendre compte d'une croissance saturable consiste à modifier l'expression de la vitesse de croissance bactérienne k_{growth} en fonction d'une vitesse maximale de croissance, notée V_{max} , et du nombre de bactéries B_{50} correspondant au nombre de bactéries présentes à 50% de la vitesse de croissance maximale (171, 172) :

$$\frac{dB}{dt} = \frac{V_{max}}{B + B_{50}} \times B - k_{death} \times B$$

Ces deux méthodes se sont révélés comparables pour la modélisation d'une croissance bactérienne saturable (172).

L'effet antibactérien de l'antibiotique est la réduction du nombre total de bactéries. Cet effet peut être modélisé par une diminution de la vitesse de croissance bactérienne – l'antibiotique étant alors caractérisé comme ayant une activité bactériostatique – ou par l'augmentation de la vitesse de mort bactérienne – l'antibiotique étant alors qualifié de bactéricide. Ces effets sur les constantes de croissance et de mort bactérienne sont modélisés de la même façon que pour les modèles de turnover, à l'aide d'un modèle I_{max} (169, 170) ou d'un modèle E_{max} (167, 168, 171, 172).

En supposant que la population des bactéries est composée de sous-populations de bactéries sensibles (S) et résistantes (R), l'évolution de celles-ci au cours du temps peut être modélisée par un système de deux équations différentielles décrivant dS/dt et dR/dt respectivement. Cependant, peu d'études disposent des données adaptées à une analyse complète de toutes ces mesures, et peu d'applications sont publiées (8, 169, 170, 172, 173).

Les travaux publiés ne se sont penchés de manière quasi-exclusive que sur l'effet d'un antibiotique sur une seule population bactérienne, présente au sein d'un site infecté. Peu d'études se sont intéressées à la modélisation de la relation dose – effet des antibiotiques sur les microbiotes. Récemment, cette méthode a été appliquée pour l'analyse dynamique du lien entre les concentrations de ciprofloxacine et la cinétique d'entérobactéries sensibles et résistantes aux quinolones dans les selles (8). L'initiation du traitement conduisait à une élimination rapide des entérobactéries sensibles et à l'augmentation des comptes de bactéries résistantes, qui persistaient à des niveaux élevés jusqu'à 3 semaines après l'arrêt du traitement. Cette observation a été expliquée par la très faible sensibilité des bactéries résistantes à l'antibiotique, qui avaient une vitesse de croissance importante. En conséquence, les auteurs ont prédit que de très faibles concentrations d'antibiotiques dans les selles (jusqu'à 10 fois plus faibles que les concentrations atteintes avec des doses administrées en pratique clinique) sont suffisantes pour perturber profondément le microbiote, et favoriser l'augmentation rapide de la résistance. Cependant, cette étude – réalisée chez l'animal – n'a étudié que l'évolution des comptes d'entérobactéries, qui ne constituent qu'une faible proportion des bactéries constitutives du microbiote intestinal.

A notre connaissance, aucune étude n'a analysé la dynamique du microbiote intestinal après une perturbation antibiotique en utilisant les méthodes de séquençage à haut débit. Les modèles de cinétique bactérienne décrits plus haut ne sont pas adaptés aux données obtenues à l'aide de ces techniques, qui ne fournissent que la composition d'un échantillon en termes d'abondance relative et ne peuvent apporter la quantification absolue des différents taxons bactériens.

Concernant l'analyse de la diversité au sein du microbiote, la plupart des études quantitatives se sont focalisées sur la comparaison d'échantillons à l'aide d'analyses factorielles des indices de diversité bactérienne (174), ou à l'aide de comparaisons statistiques de 2 échantillons (175). Différentes méthodes d'analyse ont été développées pour la comparaison de l'abondance des OTUs dans deux échantillons, mais elles se sont jusque-là restreintes à l'analyse d'échantillons indépendants, et aux cas où un seul prélèvement fécal était disponible pour chaque sujet. Elles ne peuvent être appliquées aux cas où plusieurs échantillons sont disponibles pour le même individu, car ne prennent pas en compte la corrélation intra-individuelle des données. La modélisation non linéaire à effets mixtes permet, comme nous l'avons vu, de contourner cette difficulté.

Objectifs de cette thèse

L'objectif global de cette thèse est de mieux caractériser l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal.

Dans un premier temps, nous avons cherché à quantifier la relation entre les concentrations fécales d'antibiotique, la perte de diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal et ses conséquences cliniques. Ce travail s'est appuyé sur les résultats de plusieurs études conduites dans un modèle animal de colite à *Clostridium difficile* induite soit par une fluoroquinolone, la moxifloxacine, soit par un lincosamide, la clindamycine. Nous avons d'abord analysé le lien entre la concentration fécale de moxifloxacine libre et la probabilité de décès de l'animal, puis avons étudié l'effet de la moxifloxacine et de la clindamycine sur la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal. Nous avons enfin évalué les capacités de plusieurs indices de diversité bactérienne à prédire le décès des animaux. Ce travail est présenté dans le chapitre 2.

Dans un second temps, nous avons exploité les données de deux essais cliniques randomisés conduits chez des volontaires sains afin d'étudier l'impact de la moxifloxacine et de deux céphalosporines de 3^{ème} génération, la ceftriaxone et le céfotaxime, sur le microbiote intestinal. Ces antibiotiques ont été administrés selon des schémas posologiques mimant ceux utilisés en pratique clinique. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 3.

Concernant le travail sur l'effet de la moxifloxacine, nous avons évalué la capacité de modèles de turnover à décrire l'effet de l'administration de moxifloxacine à des volontaires sains sur la diversité au sein du microbiote intestinal, et son évolution au cours du temps. Deux indices de diversité ont été étudiés, à partir des résultats obtenus dans les travaux menés chez l'animal présentés dans la première partie de cette thèse.

Pour l'étude des deux céphalosporines de 3^{ème} génération, nous avons analysé le rôle de la voie d'élimination des antibiotiques sur la perturbation du microbiote intestinal. Nous avons tout d'abord comparé l'impact des deux antibiotiques sur l'émergence de la résistance au sein du microbiote intestinal mesurée par la culture bactérienne, et sur la colonisation du tube digestif par des bactéries non commensales. Ensuite, nous avons comparé l'effet de ces deux antibiotiques sur la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal, en utilisant les deux indices de diversité dont l'évolution a été modélisée précédemment.

Enfin, nous discutons de l'ensemble de ces travaux et des perspectives de cette thèse dans le chapitre 4.

Chapitre 2. Concentrations fécales d'antibiotique, diversité bactérienne et mortalité : analyses dans un modèle animal

Nous avons vu en introduction que les antibiotiques sont la principale cause de colite à *Clostridium difficile*. La physiopathologie de l'infection est liée à l'effet perturbateur que les antibiotiques exercent sur le microbiote intestinal. Afin d'étudier le lien entre le niveau d'exposition fécale aux antibiotiques, son impact sur la diversité bactérienne au sein du microbiote et ses conséquences cliniques, nous avons utilisé un modèle animal de colite à *Clostridium difficile* induite par les antibiotiques dans les deux premiers travaux de cette thèse.

Dans ce modèle, les animaux sont traités par un antibiotique, une fois par jour pendant 5 jours, administré par voie sous cutanée. Ils sont exposés au 3^{ème} jour de traitement à des spores d'une souche de *Clostridium difficile* productrice de toxines. La dose d'antibiotique administrée est choisie de telle sorte que la mortalité des animaux est de 100% au bout de 16 jours après le début du traitement antibiotique. Tous les animaux ont été traités par la même dose d'antibiotique. La réduction des concentrations fécales d'antibiotique a été obtenue en administrant des doses variables d'un adsorbant non spécifique à base de charbon actif, DAV131A, (0 à 1800 mg/kg/j), pendant 8 jours. Ce produit est actuellement en cours de développement clinique – sous la forme de DAV132 – par la société de biotechnologie Da Volterra (Paris, France). Les schémas d'administration de DAV131A étaient spécifiques à chaque travail.

Des échantillons de selles ont été collectés pour chaque animal juste avant le début du traitement et au 3^{ème} jour de traitement, pour détermination des concentrations fécales d'antibiotique libre par méthode microbiologique et des comptes de *Clostridium difficile*. Dans le deuxième travail, nous avons également analysé les échantillons de selles recueillis par métagénomique ciblée du gène de l'ARN ribosomique 16S, afin de mesurer la diversité bactérienne dans le microbiote intestinal.

Dans le premier travail chez l'animal, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une fluoroquinolone, la moxifloxacine, sur la mortalité animale, et dans le deuxième travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de la moxifloxacine et à celui de la clindamycine, un antibiotique de la classe des lincosamides. Ces deux classes d'antibiotiques étudiées sont parmi les plus pourvoyeuses de l'infection à *Clostridium difficile* chez l'homme. La moxifloxacine a été administrée à la dose de 30 mg/kg, et la clindamycine à la dose de 5 mg/kg.

1. Réduction des concentrations fécales d'antibiotique et protection contre la mortalité

1.1. Résumé

Dans ce premier travail, l'objectif était d'étudier le lien entre les concentrations fécales de moxifloxacine libre et la mortalité animale, et d'évaluer l'effet du schéma d'administration du DAV131A.

Au total, 215 animaux ont été répartis dans plusieurs groupes, qui différaient selon le schéma d'administration du DAV131A : selon l'administration d'une dose supplémentaire de DAV131A aux animaux 10 heures avant le début du traitement par moxifloxacine, l'horaire de la première administration de l'adsorbant par rapport à la 1^{ère} administration d'antibiotique (quelques heures avant, en même temps ou quelques heures après), la dose totale quotidienne d'adsorbant administré (entre 0 et 1800 mg/kg/j) et le nombre d'administrations quotidiennes (2 ou 3). Un groupe contrôle traité par moxifloxacine mais non inoculé par *Clostridium difficile* a également été constitué.

Nous avons comparé le taux de mortalité animale en fonction de la dose totale de DAV131A administrée, et observé une relation significative entre l'augmentation de la dose de DAV131A administrée et la réduction de la mortalité animale ($p < 10^{-15}$). Les concentrations fécales de moxifloxacine étaient négativement corrélées à la dose totale de DAV131A (coefficient de corrélation de Spearman $r = -0.9$, $p < 10^{-15}$), et étaient significativement plus élevées chez les hamsters dont l'issue de l'infection était fatale que chez les hamsters survivants (médiane [min ; max], 46.0 µg/g [12.3 ; 463.4] vs. 6.8 µg/g [0.3 ; 42.9], $p < 10^{-15}$).

Afin d'explorer la relation observée entre le régime d'administration du DAV131A, les concentrations de moxifloxacine libre dans les selles et le statut vital, et d'analyser le rôle des caractéristiques du schéma posologique du DAV131A dans la survenue du décès, nous avons analysé les données par modélisation. Le lien entre la dose totale de DAV131A administrée et la concentration fécale de moxifloxacine libre a été modélisé à l'aide d'un modèle d'inhibition totale, en supposant que l'effet maximal du DAV131A était de réduire à 0 les concentrations de moxifloxacine libre. L'impact des différents schémas posologiques d'administration du DAV131A a été étudié en testant une covariable sur le paramètre D_{50} , dose de DAV131A nécessaire pour réduire de 50% la concentration de moxifloxacine libre. Le lien entre la concentration de moxifloxacine libre dans les selles prédite par le modèle et la probabilité de décès de l'animal a été modélisé à l'aide d'une régression logistique. Les paramètres du modèle ont été estimés avec le logiciel R par la méthode du maximum de vraisemblance. Nous avons ensuite réalisé des simulations afin de déterminer la réduction de la

concentration de moxifloxacine libre et la dose de DAV131A nécessaires pour réduire la mortalité à 10%, et estimé leurs intervalles de confiance à 95% à l'aide de la delta méthode.

L'utilisation d'un modèle d'inhibition totale décrivait correctement les données observées. La concentration de moxifloxacine libre obtenue en l'absence de traitement par DAV131A était de 58 µg/g (IC95%, 50 ; 66), et la D₅₀ était de 405 mg/kg/j (IC95%, 318 ; 393). L'administration d'une dose de DAV131A 10 heures avant la première administration de moxifloxacine permettait de réduire la D₅₀ d'environ 40% (IC95%, 30%-50%). La réduction de la concentration de moxifloxacine libre à 15 µg/g (IC95%, 11 ; 18) permettait de réduire la mortalité animale à 5%, ce qui était obtenu en administrant une dose de DAV131A de 818 mg/kg/j (IC95%, 647 ; 989).

Les résultats de ce travail ont permis de montrer l'existence d'une relation croissante entre les concentrations de moxifloxacine libre dans les selles et la probabilité de décès suite à une infection à *Clostridium difficile* dans un modèle animal. Nous avons également montré que l'administration d'un adsorbant non spécifique réduit la mortalité de l'infection à *Clostridium difficile*, de façon dose-dépendante. Le schéma d'administration n'avait pas d'impact sur l'effet protecteur du produit, et l'administration d'une dose supplémentaire permettait l'obtention d'un surcroît d'efficacité. Ce résultat peut s'avérer important dans les cas où l'administration d'antibiotiques peut être programmée, comme c'est le cas dans le contexte de la chirurgie programmée. Ces résultats sont encourageants pour le développement de DAV132, pendant de DAV131A formulé pour une libération spécifique de l'adsorbant au niveau de l'iléon terminal et du colon chez l'homme.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication en 2017 dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

1.2. Article 1

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

EXPERIMENTAL THERAPEUTICS



Protection of Hamsters from Mortality by Reducing Fecal Moxifloxacin Concentration with DAV131A in a Model of Moxifloxacin-Induced *Clostridium difficile* Colitis

Charles Burdet,^{a,b} Sakina Sayah-Jeanne,^c Thu Thuy Nguyen,^a Christine Miossec,^{c,*} Nathalie Saint-Lu,^c Mark Pulse,^d William Weiss,^d Antoine Andreumont,^{a,b} France Mentré,^{a,b} Jean de Gunzburg^c

INSERM & Paris Diderot University, IAME, UMR 1137, Paris, France^a; AP-HP, Bichat Hospital, Paris, France^b; Da Volterra, Paris, France^c; UNT Health Science Center, Fort Worth, Texas, USA^d

ABSTRACT Lowering the gut exposure to antibiotics during treatments can prevent microbiota disruption. We evaluated the effects of an activated charcoal-based adsorbent, DAV131A, on the fecal free moxifloxacin concentration and mortality in a hamster model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* infection. A total of 215 hamsters receiving moxifloxacin subcutaneously (day 1 [D₁] to D₅) were orally infected at D₃ with *C. difficile* spores. They received various doses (0 to 1,800 mg/kg of body weight/day) and schedules (twice a day [BID] or three times a day [TID]) of DAV131A (D₁ to D₃). Moxifloxacin concentrations and *C. difficile* counts were determined at D₃, and mortality was determined at D₁₂. We compared mortality rates, moxifloxacin concentrations, and *C. difficile* counts according to DAV131A regimen and modeled the links between DAV131A regimen, moxifloxacin concentration, and mortality. All hamsters that received no DAV131A died, but none of those that received 1,800 mg/kg/day died. Significant dose-dependent relationships between DAV131A dose and (i) mortality, (ii) moxifloxacin concentration, and (iii) *C. difficile* count were evidenced. Mathematical modeling suggested that (i) lowering the moxifloxacin concentration at D₃, which was 58 $\mu\text{g/g}$ (95% confidence interval [CI] = 50 to 66 $\mu\text{g/g}$) without DAV131A, to 17 $\mu\text{g/g}$ (14 to 21 $\mu\text{g/g}$) would reduce mortality by 90%; and (ii) this would be achieved with a daily DAV131A dose of 703 mg/kg (596 to 809 mg/kg). In this model of *C. difficile* infection, DAV131A reduced mortality in a dose-dependent manner by decreasing the fecal free moxifloxacin concentration.

KEYWORDS *Clostridium difficile* infection, hamster animal model, mortality, prevention, moxifloxacin

Clostridium difficile is a sporulating Gram-positive bacillus that can lead to mild to severe intestinal infections, including pseudomembranous colitis and toxic megacolon (1). With 500,000 cases and 29,000 deaths in 2011 in the United States (2), the burden of *C. difficile* infection on the U.S. health care system has reached \$4.8 billion (3). *C. difficile* is the leading cause of health care-associated infections (4), and the Centers for Disease Control and Prevention consider it an immediate public health threat (5).

Antibiotics are the main risk factors for *C. difficile* infections because the gut microbiota is exposed to high concentrations of the drugs during oral or parenteral treatments, resulting in its disruption (6, 7). Reducing this exposure thus appears appealing for limiting the consequences of antibiotic treatments on the microbiota. Such an approach has been pioneered by administering β -lactamases together with

Received 14 March 2017 / Returned for modification 29 April 2017 / Accepted 14 July 2017

Accepted manuscript posted online 24 July 2017

Citation Burdet C, Sayah-Jeanne S, Nguyen TT, Miossec C, Saint-Lu N, Pulse M, Weiss W, Andreumont A, Mentré F, de Gunzburg J. 2017. Protection of hamsters from mortality by reducing fecal moxifloxacin concentration with DAV131A in a model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* colitis. Antimicrob Agents Chemother 61:e00543-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00543-17>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Jean de Gunzburg, gunzburg@davolterra.com.

* Present address: Christine Miossec, Véloquino, Paris, France.

C.B. and S.S.-J. contributed equally to this article, and F.M. and J.D.G. contributed equally to this article.

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on September 24, 2017 by guest

β -lactam antibiotics. This prevents colonization by resistant bacteria in mice (8, 9) as well as in dogs (10) and humans (11). It also reduces antibiotic concentrations in the human gut (12, 13) during treatments, and it preserves the intestinal microbiota in humanized gnotobiotic pigs (12). However, this promising approach is limited to β -lactams, while many other antibiotics are also at risk of provoking *C. difficile* infection, particularly fluoroquinolones (14).

In rats, delivering activated charcoal to the intestine allowed removal of ciprofloxacin residues from the gut and decreased antibiotic exposure of the microbiota without affecting its plasma pharmacokinetics (15). Similarly, we showed previously that oral DAV131A, a charcoal-based adsorbent, decreased intestinal colonization by β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in cefotaxime-treated mice (16).

Here we used the Syrian hamster model of *C. difficile* infection, which recapitulates many aspects of the human infection (17) and has been used widely to evaluate new therapies against *C. difficile* infection (18–20), to assess the protective effect of DAV131A. We also developed a mathematical model to analyze the relationships between DAV131A regimens, the fecal free moxifloxacin concentration, and hamster mortality.

(This work was partly presented at IDWeek 2016, New Orleans, LA, 26 to 30 October 2016 [21].)

RESULTS

Comparison of mortality rates, fecal free moxifloxacin concentrations, and *C. difficile* counts across DAV131A doses. Values for the fecal free moxifloxacin concentration at day 3 (D_3) were missing for only 3/215 hamsters (1.4%), and 1 value was below the limit of quantification (LOQ). Values for the *C. difficile* count at D_3 were missing for only 9/215 hamsters (4.2%), but as many as 121/215 (56.3%) values were below the LOQ.

Descriptive statistics on fecal free moxifloxacin concentrations, *C. difficile* counts, and mortality for each group in each study are reported in Table 1.

All (100%; 95% confidence interval [CI] = 90.0% to 100%) 35 hamsters from the control groups that received moxifloxacin but no DAV131A (groups 1A, 2A, and 3A) died; they had a median fecal free moxifloxacin concentration of 53.8 $\mu\text{g/g}$ (range, 24.5 to 211.3 $\mu\text{g/g}$) at D_3 , at the time of *C. difficile* inoculation. Conversely, none of the 60 animals receiving a daily dose of DAV131A of 1,800 mg/kg of body weight (groups 1H, 1I, 2B, 2C, and 3H) died (0%; 95% CI = 0.0% to 6.0%); they had a median fecal free moxifloxacin concentration of only 1.8 $\mu\text{g/g}$ (range, 0.0 to 20.3 $\mu\text{g/g}$). These animals showed no signs of disease or inflection in their weight gain (data not shown). Also, the median count of *C. difficile* was 6.0 \log_{10} CFU/g (range, <3.3 to 7.8 \log_{10} CFU/g) for the control groups that received moxifloxacin but no DAV131A, which is much higher than the 3.8 \log_{10} CFU/g (range, <3.3 to 5.9 \log_{10} CFU/g) observed for the moxifloxacin- and DAV131A (1,800 mg/kg/day)-treated group.

We observed a highly significant decrease in mortality when the DAV131A daily dose administered to hamsters increased ($P < 10^{-15}$) (Fig. 1). A significant association was also evidenced between the DAV131A daily dose and the fecal free moxifloxacin concentration (Spearman rank correlation coefficient [s] = -0.9 ; $P < 10^{-15}$) (Fig. 2) as well as between the DAV131A daily dose and the fecal count of *C. difficile* (s = -0.3 ; $P < 10^{-4}$) (Fig. 3). Approximately 60% of the moxifloxacin excreted during D_3 was retrieved from the fecal pellets collected during the period from 0 h (H_0) to H_{12} .

Comparison of fecal free moxifloxacin concentrations and *C. difficile* counts according to vital status. The median fecal concentration of free moxifloxacin was 46.0 $\mu\text{g/g}$ (range, 12.3 to 463.4 $\mu\text{g/g}$) in hamsters in which death occurred by D_{12} and 6.8 $\mu\text{g/g}$ (range, 0.28 to 42.9 $\mu\text{g/g}$) in hamsters that survived ($P < 10^{-15}$). Similarly, *C. difficile* counts were higher in hamsters in which death occurred than in survivors (5.2 \log_{10} CFU/g [range, <3.3 to 7.8 \log_{10} CFU/g] versus <3.3 \log_{10} CFU/g [range, <3.3 to 5.9 \log_{10} CFU/g]) ($P < 10^{-15}$). The areas under the receiver operating characteristic (ROC) curves for the fecal concentration of free moxifloxacin and for *C. difficile* counts

TABLE 1 Descriptive statistics on fecal free moxifloxacin concentrations at D₃, *Clostridium difficile* counts at D₃, and mortality rates at D₁₂ according to DAV131A daily dose for the three studies

Study no. (n)	Group name	DAV131A administration				Fecal free moxifloxacin concn at D ₃ (H ₀ to H ₁₂) (µg/g)				C. difficile count at D ₃ (H ₁₂ to H ₂₄) (log ₁₀ CFU/g)				Mortality at D ₁₂ (n (%))	
		Daily dose (mg/kg/day)	Administration at D ₁ -H ₁₀	Dosing time at D ₁	Dosing time at D ₂ to D ₈	n	Median	Minimum	Maximum	n	Median	Minimum	Maximum		
1 (90)	1A	0 (no placebo)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	46.4	24.5	136.5	9	4.9	3.5	6.0	10 (100)	
	1B	200 (100 BID)	Yes	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	47.5	24.5	463.4	8	4.8	<3.3	5.8	10 (100)	
	1C	200 (100 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	34.6	24.8	62.9	7	4.4	4	5.5	10 (100)	
	1D	600 (300 BID)	Yes	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	14.8	8.2	30.4	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	1E	600 (300 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	12.3	9.1	27.8	10	<3.3	<3.3	<3.3	2 (20)	
	1F	1,200 (600 BID)	Yes	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	7.1	3.0	10.8	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	1G	1,200 (600 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	6.6	5.1	27	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	1H	1,800 (900 BID)	Yes	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	1.5	0.2	4.9	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	1I	1,800 (900 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	5.2	1.6	20.3	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	2 (45)	2A	0 (no placebo)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	15	42.0	27.7	56.2	12	7.3	5.3	7.8	15 (100)
		2B	1,800 (900 BID)	Yes	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	15	1.6	1.0	2.0	15	4.6	3.4	5.4	0 (0)
2C		1,800 (900 BID)	Yes	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	15	1.9	0.9	3.8	15	4.6	3.7	5.9	0 (0)	
3 (80)	3A	0 (placebo)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	90	75.5	211.3	10	5.7	<3.3	7.1	10 (100)	
	3B	600 (300 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	19.6	10	24.1	10	<3.3	<3.3	4.0	1 (10)	
	3C	600 (300 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	23.4	17.3	42.9	10	<3.3	<3.3	3.7	0 (0)	
	3D	600 (300 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	15.7	11.3	38.9	10	<3.3	<3.3	<3.3	2 (20)	
	3E	1,200 (600 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	8.9	5.6	15.7	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	3F	1,200 (600 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	5	3.6	14	10	<3.3	<3.3	<3.3	0 (0)	
	3G	1,200 (600 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	7.3	3.0	29.6	10	<3.3	<3.3	3.7	0 (0)	
	3H	1,800 (900 BID)	No	H ₁ - ₄	H ₁ - ₄	10	2.4	0.7	16.3	10	<3.3	<3.3	4.9	0 (0)	
All groups						215	212	11.6	0.2	463.4	206	<3.3	7.8	60 (27.9)	

Downloaded from <http://aac.asm.org/> on September 24, 2017 by guest

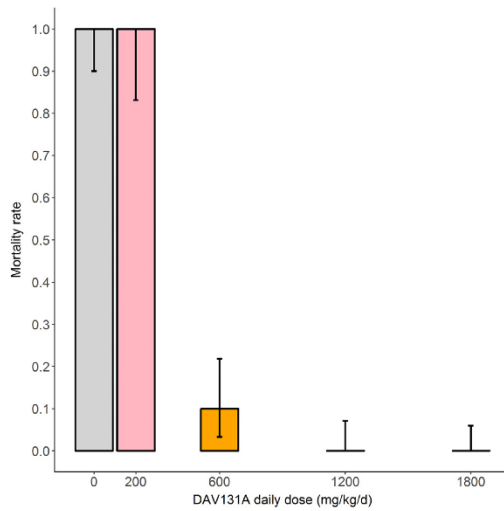


FIG 1 Mortality rates at D₁₂ according to DAV131A daily dose administered for the 215 hamsters in the 3 pooled studies. Bars represent the exact 95% confidence intervals of observed proportions.

for prediction of death were 0.97 (95% CI = 0.95 to 0.99) and 0.86 (95% CI = 0.79 to 0.92), respectively.

Influence of DAV131A dosing schedule on fecal free moxifloxacin concentration. Among the 180 hamsters treated with DAV131A (all groups except 1A, 2A, and 3A), the administration of an additional initial dose of DAV131A at D₁H₋₁₀ was significantly associated with a lower fecal free moxifloxacin concentration (median

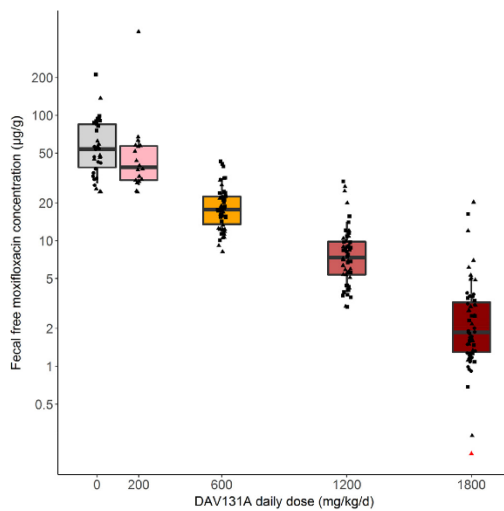


FIG 2 Box plots of fecal free moxifloxacin concentrations measured at D₃ according to DAV131A daily dose administered for the 212 hamsters in the 3 pooled studies. Triangles, dots, and squares represent the observed concentrations in studies 1, 2, and 3, respectively. Whiskers represent 10th and 90th percentiles. The red symbol represents a point below the limit of quantification.

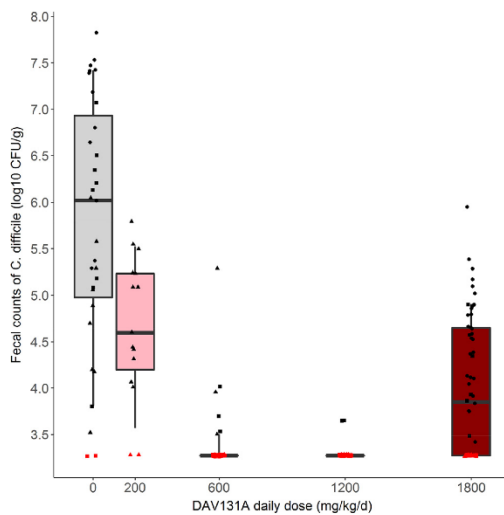


FIG 3 Box plots of the counts of *Clostridium difficile* measured at D_3 according to the DAV131A daily dose administered in the 206 hamsters of the three pooled studies. Triangles, dots, and squares represent the observed concentrations in studies 1, 2, and 3, respectively. Whiskers represent 10th and 90th percentiles. Red symbols represent data below the limit of quantification.

[range], 3.1 $\mu\text{g/g}$ [0.0 to 463.4 $\mu\text{g/g}$] versus 11.7 $\mu\text{g/g}$ [0.7 to 62.9 $\mu\text{g/g}$] ($P < 10^{-5}$) (see Fig. S1 in the supplemental material).

For the 40 hamsters treated with a daily dose of 1,800 mg/kg DAV131A and receiving an additional initial dose of DAV131A at D_1H_{-10} (groups 1H, 2B, and 2C), fecal free moxifloxacin concentrations were not significantly different between hamsters treated with DAV131A twice a day (BID) and those treated three times a day (TID) (1.6 $\mu\text{g/g}$ [0.0 to 4.9 $\mu\text{g/g}$] versus 1.9 $\mu\text{g/g}$ [0.9 to 3.8 $\mu\text{g/g}$] ($P = 0.2$) (Fig. S2).

Among the 80 hamsters treated with a daily dose of 600 or 1,200 mg/kg DAV131A BID and not receiving an additional initial dose of DAV131A at D_1H_{-10} (groups 1E, 1G, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, and 3G), there was no significant difference in fecal free moxifloxacin concentration whether the first dose of DAV131A was administered 4 h before (12.1 $\mu\text{g/g}$ [5.1 to 27.8 $\mu\text{g/g}$]), concomitant with (15.6 $\mu\text{g/g}$ [3.6 to 42.9 $\mu\text{g/g}$]), or 2 h after (12.8 $\mu\text{g/g}$ [3.0 to 38.9 $\mu\text{g/g}$]) the first administration of moxifloxacin ($P = 0.7$) (Fig. S3).

DISCUSSION

Our most important result was that DAV131A provided a dose-dependent reduction of mortality in a hamster model of moxifloxacin-induced *C. difficile* infection. A fecal free moxifloxacin concentration of 53.8 $\mu\text{g/g}$ (range, 24.5 to 211.3 $\mu\text{g/g}$), a *C. difficile* count of 6.0 \log_{10} CFU/g (range, 3.1 to 7.8 \log_{10} CFU/g), and a 100% mortality rate were observed for animals that did not receive DAV131A treatment, while the fecal free moxifloxacin concentration, *C. difficile* count, and mortality were decreased to 7.3 $\mu\text{g/g}$ (range, 3.0 to 29.6 $\mu\text{g/g}$), 3.8 \log_{10} CFU/g (range, 3.1 to 5.9 \log_{10} CFU/g), and 0%, respectively, with doses of 1,800 mg/kg/day. DAV131A is the first product to exhibit such a level of protection against mortality from antibiotic-induced *C. difficile* infection in hamsters. Indeed, a polymeric toxin-binding compound had been shown to protect only 70% to 90% of hamsters in an animal model of clindamycin-induced *C. difficile* infection (22); however, 20% to 40% of animals from the toxin-binding treatment group still had diarrhea 15 days after cessation of therapy, whereas protected animals in the experiments reported here had no signs of disease (data not shown).

The schedule of DAV131A administration (4 h before, concomitant with, or 2 h after

the first moxifloxacin administration) did not significantly affect the protective effect as assessed by survival, fecal free moxifloxacin concentration, and *C. difficile* count in feces (Table 1; see Fig. S3 in the supplemental material). In comparing administration schedules for the same total daily dose of DAV131A, BID was found not to be significantly less protective than TID. However, this result was drawn from analysis of only 15 hamsters that received DAV131A on a TID basis, all of which were treated with DAV131A at the highest dose (1,800 mg/kg/day) and had also received an additional initial dose of DAV131A at D₁H₋₁₀.

Another important result of our work is that the modeling approach described in Text S1 allowed us to investigate the mechanism of action by which DAV131A reduced mortality in hamsters. The effect appeared to be mediated by the reduction of the fecal concentration of free moxifloxacin when the dose of DAV131A was increased, in a dose-dependent manner.

Our results should, however, be tempered by the absence of bacteriology data from our modeling analysis. We did not include *C. difficile* counts in the model, as their ability to predict death was lower than that of fecal concentrations of free moxifloxacin. Furthermore, the symptoms of *C. difficile* infection are related to the action of toxins produced by pathogenic strains of *C. difficile* (1), whose presence and activity could not be assessed from fecal samples in our studies. We are currently developing new methods for measuring toxin production and activity in order to perform a more thorough analysis of the protective effect of DAV131A.

Altogether, our data provide encouraging prospects for the protection of the gut microbiota from perturbation during the use of antimicrobials, such as fluoroquinolones, which are widely used for therapeutic purposes and were associated with the rise of the hypervirulent epidemic *C. difficile* strains of the O27 ribotype (14). These results for hamsters suggest that the approach warrants further clinical development. Indeed, the hamster model of *C. difficile* infection is appropriate for reproducing the deleterious impact of antibiotic treatments on the gut microbiota that allows *C. difficile* spores to germinate and the disease to develop (23). Therefore, we believe that the efficacy of DAV131A obtained in this model is also relevant to the mechanism of action of the product. The modeling approach confirmed this by showing that the protective effect of DAV131A in the hamster model was mediated by the reduction of the antibiotic concentrations in the gut.

The interpolation of the dose of adsorbent between hamsters and humans constitutes a challenge because of the vast differences in gastrointestinal transit times and fecal excretion physiology between the two species. Additionally, they may also exhibit differences in antibiotic pharmacokinetics; however, the fact that the maximum fecal concentrations of free moxifloxacin measured in hamsters in the experiments reported here were within the range of what was found for humans treated with a clinical dose of moxifloxacin suggests similarities in the selective pressure exerted by antibiotics on the intestinal microbiota of hamsters in the model developed in this study and in humans (24). Even given the limitations discussed above in transposing results between animal models and human patients, in particular because gastrointestinal transit is much faster in hamsters than in humans, our results suggest that the product would not necessarily need to be administered before the antibiotic but could be given concomitantly or just after the first antibiotic intake. In cases where antimicrobial therapy can be programmed, a supplementary protection might be obtained by pretreating patients with DAV132, as suggested by the additional protection obtained in hamsters which received the first dose of DAV131A 10 h before the first injection of moxifloxacin. This should be investigated further in human studies.

It can thus be inferred from our results that DAV131A protected animals against *C. difficile* colonization and infection by preventing the disruption of the gut bacterial microbiota which is known to occur during fluoroquinolone treatments (6) and which constitutes the primary risk factor for *C. difficile* infection in humans (7). Therefore, treatment with DAV132, a human counterpart of DAV131A that was recently developed and tested in human volunteers (25), may represent a promising approach for the

prevention of *C. difficile* infection during antibiotic treatments. The first phase 1 clinical trial in human volunteers recently showed that the active component of DAV131A contained in the human-directed product DAV132 could be targeted to the ileocecal region in humans and that its concomitant use with an orally administered antibiotic did not affect the plasma pharmacokinetics of the antibiotic (25). Studies to expand these results to patients and to establish the efficacy of DAV132 to prevent *C. difficile* infections following antibiotic treatments are under way.

MATERIALS AND METHODS

DAV131A. DAV131A is an activated charcoal-based adsorbent with a high adsorption capacity (16). It was administered to hamsters by oral gavage after mixing with 0.25% (wt/vol) Natrosol 250 hydroxyethylcellulose. Hamsters from placebo groups received Natrosol alone.

Hamster model of moxifloxacin-induced *C. difficile* infection. A previously developed hamster model of antibiotic-induced *C. difficile* infection was adapted for use with moxifloxacin (23). Male Golden Syrian hamsters (80 to 120 g) received 30 mg/kg of moxifloxacin by the subcutaneous route, at a time designated H_0 , once a day from day 1 (D_1) to day 5 (D_5). This dose was chosen as the lowest dose resulting in a 100% mortality rate in treated hamsters infected with *C. difficile* spores. It is not expected to cause any toxicity in hamsters, since the minimal lethal intravenous dose reported for mice and rats is 100 mg/kg (26).

Animals were infected orally on day 3 (D_3), 4 h after moxifloxacin administration (H_4), with 10^8 spores of the nonepidemic *C. difficile* strain UNT103-1 (VA-11, REA J strain; TcdA⁺ TcdB⁺ CdtB⁻; vancomycin MIC = 2 μ g/ml, moxifloxacin MIC = 16 μ g/ml, clindamycin MIC > 256 μ g/ml, and ceftriaxone MIC = 128 μ g/ml), obtained from Curtis Donskey, Ohio VA Medical Centre. All surviving hamsters were euthanized at day 12 (D_{12}). Animals were housed in conformity with NIH guidelines (27). All procedures were conducted at the University of North Texas Health Science Center (Fort Worth, TX, USA) in accordance with protocol 2012/13-21-A06, approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee.

Studies. Three studies were conducted in order to test the protection afforded by DAV131A from lethal moxifloxacin-induced *C. difficile* infection. Their designs are summarized in Table 1. All hamsters received moxifloxacin and were inoculated with *C. difficile* spores as described above. DAV131A was administered from D_1 to D_8 .

In study 1, we aimed at analyzing the dose-response relationship between the DAV131A daily dose and survival. To that end, 4 groups of 10 hamsters each (groups 1C, 1E, 1G, and 1I) were treated with increasing daily doses of DAV131A (200, 600, 1,200, or 1,800 mg/kg/day) administered BID 4 h before (H_{-4}) and 1 h after (H_1) moxifloxacin injection. Four groups of 10 hamsters each (groups 1B, 1D, 1F, and 1H) received the same treatment plus an additional dose of DAV131A 10 h before the first administration of moxifloxacin, i.e., at D_1 , H_{-10} . A control group receiving moxifloxacin alone (group 1A) was included.

In study 2, we compared the effects on survival of BID and TID administrations of a high dose of DAV131A (1,800 mg/kg/day). Two groups of 15 hamsters each received DAV131A at a dose of 600 mg/kg TID (at H_{-4} , i.e., 4 h before moxifloxacin administration, and at H_1 and H_6 , i.e., 1 and 6 h after moxifloxacin administration, respectively) (group 2B) or at a dose of 900 mg/kg BID (at H_{-4} and H_1) (group 2C). In addition, all these animals also received an additional initial dose of DAV131A at D_1 , H_{-10} . A control, untreated group (group 2A) was also included.

In study 3, we assessed the influence on survival of giving the first dose of DAV131A before (H_{-4}), concomitant with, or after (H_1) the first antibiotic administration. Seven groups of 10 hamsters each were included, all receiving DAV131A BID, at H_{-4} and H_1 on D_2 to D_8 but at specific timings on D_1 . Two of these groups received 600 (group 3B) and 1,200 (group 3E) mg/kg/day of DAV131A at H_{-4} and H_1 on D_1 ; two other groups also received 600 (group 3C) and 1,200 (group 3F) mg/kg/day of DAV131A, but at H_0 and H_1 on D_1 . Three groups received 600 (group 3D), 1,200 (group 3G), and 1,800 (group 3H) mg/kg/day of DAV131A, respectively, at H_2 and H_7 on D_1 . The last group (group 3A) received placebo on the same schedule as that for the last 3 groups.

Feces collection and analysis. We focused the analysis on D_3 , which bracketed *C. difficile* inoculation. Two pools of feces were collected daily from D_2 to D_4 in all studies. The first was made of all pellets emitted in the first 12 h after moxifloxacin administration (H_0 to H_{12}), and the second was made of all pellets emitted in the period between 12 and 24 h after moxifloxacin administration (H_{12} to H_{24}). As it is a natural and physiological behavior of hamsters, coprophagy was not controlled.

The fecal free moxifloxacin concentration was determined at D_3 for feces collected from H_0 to H_{12} . Fecal pools were stored at -80°C until we performed the assay. On the day of the assay, feces were weighed and homogenized in sterile saline, and debris was eliminated by centrifugation. The fecal free moxifloxacin concentration was measured by microbiological assay (with *Bacillus subtilis* ATCC 6633) after incubation at 37°C for 24 h (28), with a limit of quantification (LOQ) of 0.2 μ g/g. Missing data were imputed according to the following algorithm: (i) if fecal free moxifloxacin concentrations were available for the period from H_0 to H_{12} at D_2 and D_4 , the missing value was imputed to the arithmetic mean of these 2 values; (ii) if the concentration was known for the period from H_0 to H_{12} for D_2 or D_4 only, the missing value was imputed to this available value; and (iii) otherwise, the missing data were not imputed and the animal was excluded from analysis. Data below the LOQ were imputed to the LOQ.

Fecal counts of *C. difficile* were determined extemporaneously at D_3 on the H_{12} -to- H_{24} pool by plating serial dilutions of the samples on BBL *C. difficile* selective agar (BD). Counts were read after anaerobic incubation at 37°C for 48 h. Fecal counts below the LOQ (3.3 \log_{10} CFU/g of feces) were imputed to the

LOQ. Missing values were imputed using the counts at D_0 ($H_{1,2}$ to $H_{2,4}$), if available. Otherwise, the missing counts were not imputed.

Statistical analysis. We compared mortality rates at $D_{1,2}$ for all hamsters according to DAV131A daily dose by using the nonparametric Fisher exact test. The links between the DAV131A daily dose and (i) the fecal free moxifloxacin concentration at D_3 (H_0 to $H_{1,2}$) and (ii) the decimal logarithm of the *C. difficile* count in feces at D_3 ($H_{1,2}$ to $H_{2,4}$) were studied using the Spearman rank correlation test. Exact 95% confidence intervals of the mortality rates were computed using the binomial distribution.

We compared fecal free moxifloxacin concentrations and *C. difficile* counts according to vital status at $D_{1,2}$ by using the nonparametric Wilcoxon test. The abilities of fecal free moxifloxacin concentrations and *C. difficile* counts to predict death were assessed using the areas under the ROC curves and the 95% confidence interval, computed using 1,000 paired-bootstrap replicates (R functions roc and ci.auc).

For hamsters that received DAV131A treatment (all groups except 1A, 2A, and 3A), we compared fecal free moxifloxacin concentrations according to the administration, or not, of an additional initial dose of DAV131A at $D_{1,H_{-10}}$ by using the nonparametric Wilcoxon test.

The impact of the BID versus TID DAV131A administrations on the fecal free moxifloxacin concentration was tested in hamsters receiving a daily dose of DAV131A of 1,800 mg/kg and also receiving a dose of DAV131A at $D_{1,H_{-10}}$ (groups 1H, 2B, and 2C). The impact on fecal free moxifloxacin concentration of the timing of the first DAV131A administration (4 h before, with, or 2 h after the first moxifloxacin administration) was tested in hamsters receiving 600 or 1,200 mg/kg/day of DAV131A and not receiving DAV131A at $D_{1,H_{-10}}$ (groups 1E, 1G, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, and 3G). Analyses were performed using nonparametric Wilcoxon or Kruskal-Wallis tests, as appropriate.

Finally, in order to identify independent features of the DAV131A dosing schedule associated with the reduction of fecal free moxifloxacin concentration and to link the DAV131A dosing regimen to the mortality rate, we performed a modeling analysis of the data. Full methods and results are presented in Text S1 in the supplemental material.

Data are presented as numbers of observations (n [%]) or medians (ranges). All tests were two-sided, with a type I error value of 0.05. All analyses were performed using R software v3.2.2.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.00543-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Da Volterra, Paris, France.

Charles Burdet and Thu Thuy Nguyen performed statistical work for the Da Volterra Company through a contract with INSERM UMR 1137. Nathalie Saint-Lu and Sakina Sayah-Jeanne are employees of the Da Volterra Company. Christine Miossec is a previous employee of the Da Volterra Company. Antoine Andreumont is a scientific adviser of the Da Volterra Company within the framework of the French law on innovation and research. France Mentré and Jean de Gunzburg are consultants for the Da Volterra Company.

REFERENCES

- Leffler DA, Lamont JT. 2015. *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 372:1539–1548. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1403772>.
- Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC, Wilson LE, Winston LG, Cohen JA, Limbago BM, Fridkin SK, Gerding DN, McDonald LC. 2015. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. N Engl J Med 372:825–834. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408913>.
- Dubberke ER, Olsen MA. 2012. Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. Clin Infect Dis 55(Suppl 2):S88–S92. <https://doi.org/10.1093/cid/cis335>.
- Miller BA, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ. 2011. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 32:387–390. <https://doi.org/10.1086/659156>.
- CDC. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf. Accessed 6 July 2017.
- Dethlefsen L, Relman DA. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. Proc Natl Acad Sci U S A 108(Suppl 1):S4554–S4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>.
- Theriot CM, Young VB. 2015. Interactions between the gastrointestinal microbiome and *Clostridium difficile*. Annu Rev Microbiol 69:445–461. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104115>.
- Leonard FC, Andreumont AO, Tancrede CH. 1985. *In vivo* influence of three β -lactam antibiotics on the intestinal microflora of man. A preliminary study in gnotobiotic mice. Prog Clin Biol Res 181:279–282.
- Stiefel U, Pultz NJ, Harmoinen J, Koski P, Lindevall K, Helfand MS, Donskey CJ. 2003. Oral administration of β -lactamase preserves colonization resistance of piperacillin-treated mice. J Infect Dis 188:1605–1609. <https://doi.org/10.1086/379153>.
- Harmoinen J, Mentula S, Heikkilä M, van der Rest M, Rajala-Schultz PJ, Donskey CJ, Frias R, Koski P, Wickstrand N, Jousimies-Somer H, Westermarck E, Lindevall K. 2004. Orally administered targeted recombinant β -lactamase prevents ampicillin-induced selective pressure on the gut microbiota: a novel approach to reducing antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 48:75–79. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.75-79.2004>.
- Tarkkanen AM, Heinonen T, Jogi R, Mentula S, van der Rest ME, Donskey CJ, Kempainen T, Gurbanov K, Nord CE. 2009. P1A recombinant β -lactamase prevents emergence of antimicrobial resistance in gut microflora of healthy subjects during intravenous administration of ampicillin. Antimicrob Agents Chemother 53:2455–2462. <https://doi.org/10.1128/AAC.00853-08>.

12. Kaleko M, Bristol JA, Hubert S, Parsley T, Widmer G, Tzipori S, Subramanian P, Hasan N, Koski P, Kokai-Kun J, Sliman J, Jones A, Connelly S. 2016. Development of SYN-004, an oral β -lactamase treatment to protect the gut microbiome from antibiotic-mediated damage and prevent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 41:58–67. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.015>.
13. Kokai-Kun JF, Roberts T, Coughlin O, Sicard E, Rufange M, Fedorak R, Carter C, Adams MH, Longstreth J, Whalen H, Sliman J. 2017. The oral β -lactamase SYN-004 (ribaxamase) degrades ceftriaxone excreted into the intestine in phase 2a clinical studies. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02197-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02197-16>.
14. Pepin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V, Nguyen M, Jacob CE, Lanthier L. 2005. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 41:1254–1260. <https://doi.org/10.1086/496986>.
15. Khoder M, Tsapis N, Domergue-Dupont V, Gueutin C, Fattal E. 2010. Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads. *Eur J Pharm Sci* 41:281–288. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.06.018>.
16. Grall N, Massias L, Nguyen TT, Sayah-Jeanne S, Ducrot N, Chachaty E, de Gunzburg J, Andremont A. 2013. Oral DAV131, a charcoal-based adsorbent, inhibits intestinal colonization by β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in cefotaxime-treated mice. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5423–5425. <https://doi.org/10.1128/AAC.00039-13>.
17. Price AB, Larson HE, Crow J. 1979. Morphology of experimental antibiotic-associated enterocolitis in the hamster: a model for human pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea. *Gut* 20:467–475. <https://doi.org/10.1136/gut.20.6.467>.
18. Swanson RN, Hardy DJ, Shipkowitz NL, Hanson CW, Ramer NC, Fernandes PB, Clement JJ. 1991. *In vitro* and *in vivo* evaluation of tiamulin B and C against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1108–1111. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.6.1108>.
19. Babcock GJ, Broering TJ, Hernandez HJ, Mandell RB, Donahue K, Boatright N, Stack AM, Lowy I, Graziano R, Molrine D, Ambrosino DM, Thomas WD, Jr. 2006. Human monoclonal antibodies directed against toxins A and B prevent *Clostridium difficile*-induced mortality in hamsters. *Infect Immun* 74:6339–6347. <https://doi.org/10.1128/IAI.00982-06>.
20. Barker RH, Jr, Dagher R, Davidson DM, Marquis JK. 2006. Review article: tolevamer, a novel toxin-binding polymer: overview of preclinical pharmacology and physicochemical properties. *Aliment Pharmacol Ther* 24:1525–1534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03157.x>.
21. Burdet C, Nguyen TT, Saint-Lu N, Sayah-Jeanne S, Weiss W, Pulse M, Andremont A, Mentré F, de Gunzburg J. 2016. IDWeek 2016, New Orleans, LA, 26 to 30 October 2016, poster 2252.
22. Kurtz CB, Cannon EP, Brezzani A, Pitruzzello M, Dinardo C, Rinard E, Acheson DW, Fitzpatrick R, Kelly P, Shackett K, Papoulis AT, Goddard PJ, Barker RH, Jr, Palace GP, Klinger JD. 2001. GT160-246, a toxin binding polymer for treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2340–2347. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2340-2347.2001>.
23. Phillips ST, Nagaro K, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. 2011. Susceptibility of hamsters to infection by historic and epidemic BI *Clostridium difficile* strains during daily administration of three fluoroquinolones. *Anaerobe* 17:166–169. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.015>.
24. Burkhardt O, Borner K, Stass H, Beyer G, Allewelt M, Nord CE, Lode H. 2002. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of oral moxifloxacin and clarithromycin, and concentrations in serum, saliva and faeces. *Scand J Infect Dis* 34:898–903. <https://doi.org/10.1080/0036554021000026963>.
25. de Gunzburg J, Ducher A, Modess C, Wegner D, Oswald S, Dressman J, Augustin V, Feger C, Andremont A, Weitschies W, Siegmund W. 2015. Targeted adsorption of molecules in the colon with the novel adsorbent-based medicinal product, DAV132: a proof of concept study in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 55:10–16. <https://doi.org/10.1002/jcph.359>.
26. FDA. 2008. Avelox label. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021085s039,021277s033lbl.pdf. Accessed 6 July 2017.
27. National Research Council. 2011. Guide for the care and use of laboratory animals, 8th ed. National Academies Press, Washington, DC.
28. Kampougeris G, Antoniadou A, Kavouklis E, Chryssouli Z, Giamarellou H. 2005. Penetration of moxifloxacin into the human aqueous humour after oral administration. *Br J Ophthalmol* 89:628–631. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.050054>.

Supplementary Text 1.

Modeling analysis

In order to identify independent features of DAV131A dosing schedule associated to the reduction of fecal free moxifloxacin concentration and to link the DAV131A dosing regimen administered to the mortality rate, we performed a modeling analysis of the data.

Methods

Handling of data from outlier animals

We excluded from modeling the hamster from the group DAV131A 200 mg/kg/day which exhibited an outlier concentration of 463.4 µg/g, being 8 times higher than the median concentration in the control group.

The hamster for which fecal free moxifloxacin concentration was below the limit of quantification was excluded from the modeling analysis.

Mathematical model for the link between DAV131A daily dose and fecal free moxifloxacin concentration

The link between DAV131A daily dose and fecal free moxifloxacin concentration was analyzed using nonlinear regression. First, a basic model without covariate was fitted to observed concentrations. The predicted fecal free concentration of moxifloxacin $c_{pred,i}$ in the hamster i after administration of a DAV131A daily dose $Dose_i$ was described by a full sigmoid I_{max} model:

$$c_{pred,i} = C_0 \times \left(1 - \frac{Dose_i^\gamma}{D_{50}^\gamma + Dose_i^\gamma}\right)$$

where the 3 parameters to be estimated are (i) C_0 , the mean fecal free concentration of moxifloxacin in the absence of treatment by DAV131A, (ii) D_{50} , the daily dose of DAV131A that allow for 50% of the maximal effect of DAV131A and (iii) γ , the sigmoidicity coefficient. In this full I_{max} model, we supposed that DAV131A would adsorb 100% of fecal free moxifloxacin residuals for a very large dose. This

hypothesis is indeed realistic as DAV131A is based on an activated charcoal. The observed fecal concentration of free moxifloxacin $c_{obs,i}$ in the hamster i can be written as:

$$c_{obs,i} = c_{pred,i} + \varepsilon_i$$

where the residual error ε_i is supposed to have a normal distribution with a mean of 0 and a variance of $(b \cdot c_{pred,i})^2$ in the case of a proportional error model, or $(a + b \times c_{pred,i})^2$ in the case of a combined error model. Parameters estimates were obtained by maximum likelihood using generalized least squares (R function *gnls*). We compared the models with and without sigmoidicity coefficient ($\gamma=1$) using the Bayesian Information Criterion (BIC, the lower the better). Proportional and combined error models were compared using BIC.

We then tested the effect of several covariates. The effect of each covariate j is introduced in the model above by transforming D_{50} as $D_{50} \times (\sum_k (\theta_{j,k} \times C_{j,k}) + 1)$, where $\theta_{j,k}$ is the effect on D_{50} of the k -th modality of the covariate j and $C_{j,k}$ is a dummy variable for the covariate j . The effect of the following covariates was studied: DAV131A intake 10 hours before the first administration of moxifloxacin (no/yes, ref=no), number of daily DAV131A intake (BID/TID, ref=BID) and DAV131A timing schedule (before/ together / after moxifloxacin administration, ref=before). Interaction between DAV131A administration 10 hours before the first administration of moxifloxacin (no/yes) and the number of daily DAV131A administrations (BID/TID) was also explored using the following composite covariate: no DAV131A treatment 10 hours before the first administration of moxifloxacin / DAV131A treatment 10 hours before the first administration of moxifloxacin and BID intake / DAV131A treatment 10 hours before the first administration of moxifloxacin and TID intake. Reference value of this composite covariate was no DAV131A treatment 10 hours before the first administration of moxifloxacin. In the univariate analyses, we performed likelihood ratio test (LRT) for each covariate. The final model was chosen from the covariates with a p-value < 0.2 in the univariate analyses, using backward selection based on the LRT with a significant threshold of 0.05.

Mathematical model for the link between fecal free moxifloxacin concentration and death

For the analysis of the probability of death at D₁₂, we performed a binary logistic regression of the probability of death according to the observed fecal free moxifloxacin concentrations. The probability of death p_i for the subject i was linked to the fecal concentration $c_{obs,i}$ using the model:

$$\text{logit}(p_i) = \alpha + \beta \times (c_{obs,i})$$

where α is the logit of the probability of death when fecal free moxifloxacin concentration equals 0, and β is the slope of the logit – concentration relationship.

Parameters were estimated by maximum likelihood using iteratively reweighted least squares (R function *glm*).

Joint model and predictions

We then developed the joint model using the fecal concentration $c_{pred,i}$ predicted by the final full sigmoid I_{max} model with covariates. In the joint model, statistical significance of the covariates was tested using the likelihood ratio test (LRT). Parameters of the joint model were estimated by maximum likelihood, using a simulated annealing algorithm (R function *optim*). The R code is available upon request to the first author (charles.burdet@inserm.fr). Initial estimates used were those estimated in the separate modeling. Standard errors of estimates were obtained from the inverse of the observed Fisher information matrix obtained from second derivatives of the log-likelihood. The 95% prediction intervals of the basic and final models were computed using the delta method.

The final model was used in order to predict the fecal free moxifloxacin concentration and the DAV131A daily dose needed to obtain various rates of mortality: 50%, 10%, 5% and 1%. Their 95% confidence intervals were computed using the delta method.

Model evaluation

The dose – concentration model was evaluated using standard goodness-of-fit plots: observed vs predicted values, standardized residuals vs predicted concentrations and standardized residuals vs observed DAV131A daily doses.

The logistic model was evaluated using the probability of death observed for the predicted concentration values in hamsters and their 95% confidence interval (CI) computed using the binomial distribution. The calibration of the model was evaluated using the Hosmer-Lemeshow test. Discrimination was evaluated using the area under the ROC curve and its 95% confidence interval computed using 1000 paired-bootstrap replicates (R functions *roc* and *ci.auc*). The discriminative abilities of the logistic model adjusted with observed and predicted concentrations were evaluated using the area under the ROC curve. They were compared using 1000 paired-bootstrap replicates [1].

Results

Data from 210 hamsters were available for modeling.

Model for the link between DAV131A daily dose and fecal free moxifloxacin concentration

The evolution of fecal free moxifloxacin concentration according to DAV131A daily dose was well described by a full sigmoid I_{\max} model. The best residual error was a combined model. In the basic model without covariate, C_0 was estimated to 60.0 $\mu\text{g/g}$ (relative standard error RSE=7.8%), and the D_{50} of DAV131A was estimated to 407.9 mg/kg/day (RSE=11.6%).

The administration of an additional initial dose of DAV131A at $D_{1H_{-10}}$ decreased the D_{50} by 30% ($p < 10^{-10}$), and DAV131A TID administration lead to a 20% decrease of the D_{50} when compared to BID administration ($p=0.0009$). The effect was still significant when studying the interaction between DAV131A intake at $D_{1H_{-10}}$ and the number of DAV131A intakes combined in a composite covariate. However, after backward selection, the only covariate that was significantly associated with D_{50} was the administration of an additional initial dose of DAV131A at $D_{1H_{-10}}$. This covariate was thus kept for the joint model.

Model for the link between fecal free moxifloxacin concentration and death

The logistic model adequately described the relationship between fecal free moxifloxacin concentration and mortality. Intercept was estimated to -5.5 (RSE=14.6%), while the slope was estimated to 0.2g/ μg (RSE=16.0%). The model calibration was satisfactory ($p=0.9$ for the Hosmer-Lemeshow test), as well as its discrimination (AUC of the ROC curve 0.97, 95%CI=0.95-0.99).

Joint model

Results of the joint model are presented in the Table 1 and Figure 1 below. In the joint model, the association between DAV131A administration at D_{1H-10} and the D_{50} parameter remained significant ($p < 10^{-8}$). The additive part or the residual error model was however poorly estimated, and a proportional model for the residual error was used in the joint model. Goodness-of-fit plots are presented in Figure 2 below. In hamsters not treated or treated by DAV131A at D_{1H-10} , D_{50} was estimated to 405.3 mg/kg/day (95%CI=318.2-492.5) and 239.7 mg/kg/day (95%CI=179.1-300.3) respectively. The discrimination of the logistic model of the fecal free moxifloxacin concentration and the mortality was better when using the predicted concentration instead of the observed concentration (areas under the ROC curves, 0.99, 95%CI=0.98-0.99 vs 0.97, 95%CI=0.95-0.99, $p=0.02$).

Table 1. Parameter estimates and their relative standard errors (RSE, %) and 95% confidence interval in the final joint model of the link between DAV131A daily dose, fecal free moxifloxacin concentration and the probability of death in the 210 hamsters included in the modeling analysis. C_0 is the mean fecal free moxifloxacin concentration in the absence of DAV131A treatment, D_{50} is the DAV131A daily dose reducing the mortality to 50%, $\theta_{D_{1H-10}}$ is the effect on D_{50} of the administration of one dose of DAV131A 10 hours before the beginning of moxifloxacin treatment, γ is the sigmoidicity coefficient and b is the proportional residual error for the full I_{max} model. α (intercept) and β (slope) are the parameters of the logistic model.

Parameter	Parameter estimate	RSE (%)	95% confidence interval	p-value (LRT)
DAV131A daily dose – fecal free moxifloxacin concentration model				
C_0 ($\mu\text{g/g}$)	58.0	7.2	49.8 – 66.3	-
D_{50} (mg/kg/day)	405.3	11.0	318.2 – 492.5	-
$\theta_{D_{1H-10}}$	-0.4	7.8	-0.5 – -0.3	$p < 10^{-8}$
γ	1.6	6.6	1.4 – 1.8	-
b	0.62	6.8	-	-
Fecal free moxifloxacin concentration – probability of death model				
α	-6.9	18.5	-9.4 – -4.4	-
β (g/ μg)	0.3	23.8	0.2 – 0.4	-

Figure 1. Predicted relationships between DAV131A daily dose and fecal free moxifloxacin concentration (top, left), and fecal free moxifloxacin concentration and the mortality rate (top, right). The evolution of the mortality rate and DAV131A daily dose derived from these 2 models

is presented in the bottom panel. Models and data are represented according to treatment by DAV131A 10 hours before the first administration of moxifloxacin (green) or not (orange). In the top left panel, triangles, dots and squares represent the observed concentrations in studies 1, 2 and 3, respectively. In the top right panel, points and vertical colored lines represent the mortality rate observed for the predicted fecal free concentration of moxifloxacin and their 95% confidence interval. In the bottom panel, points and vertical colored lines represent the mortality rate observed for corresponding DAV131A daily dose and their 95% confidence interval. Full lines represent the model prediction, and shaded areas the 95% prediction intervals.

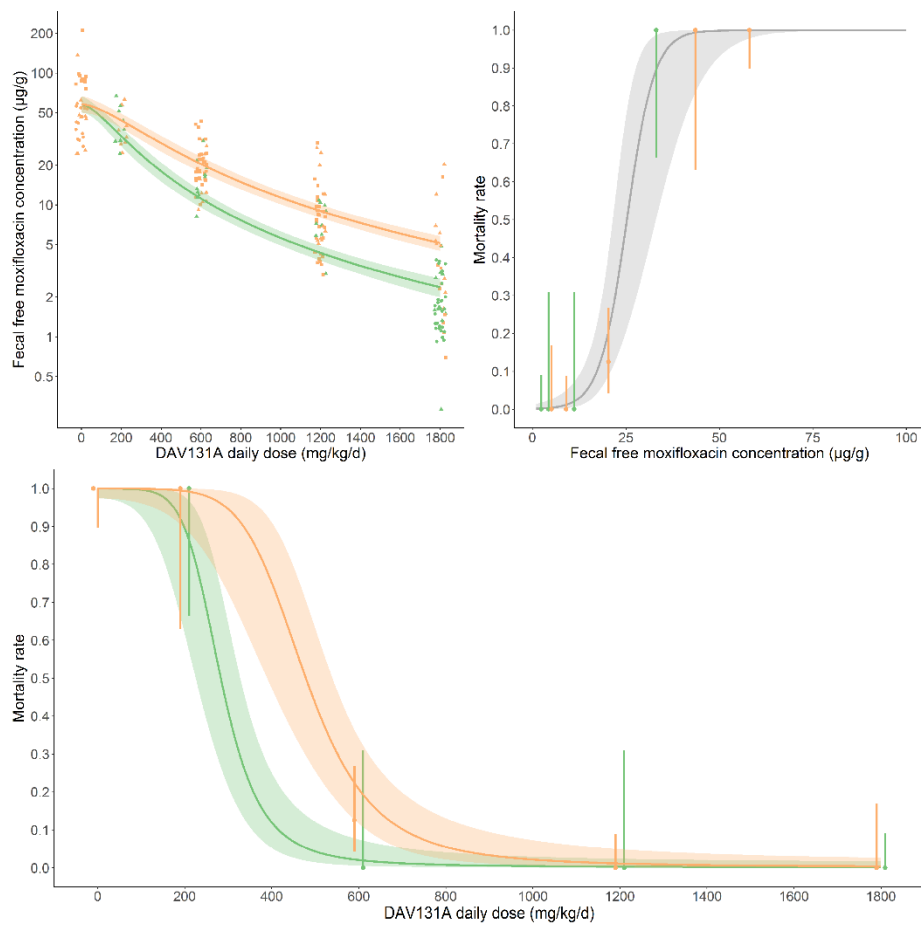
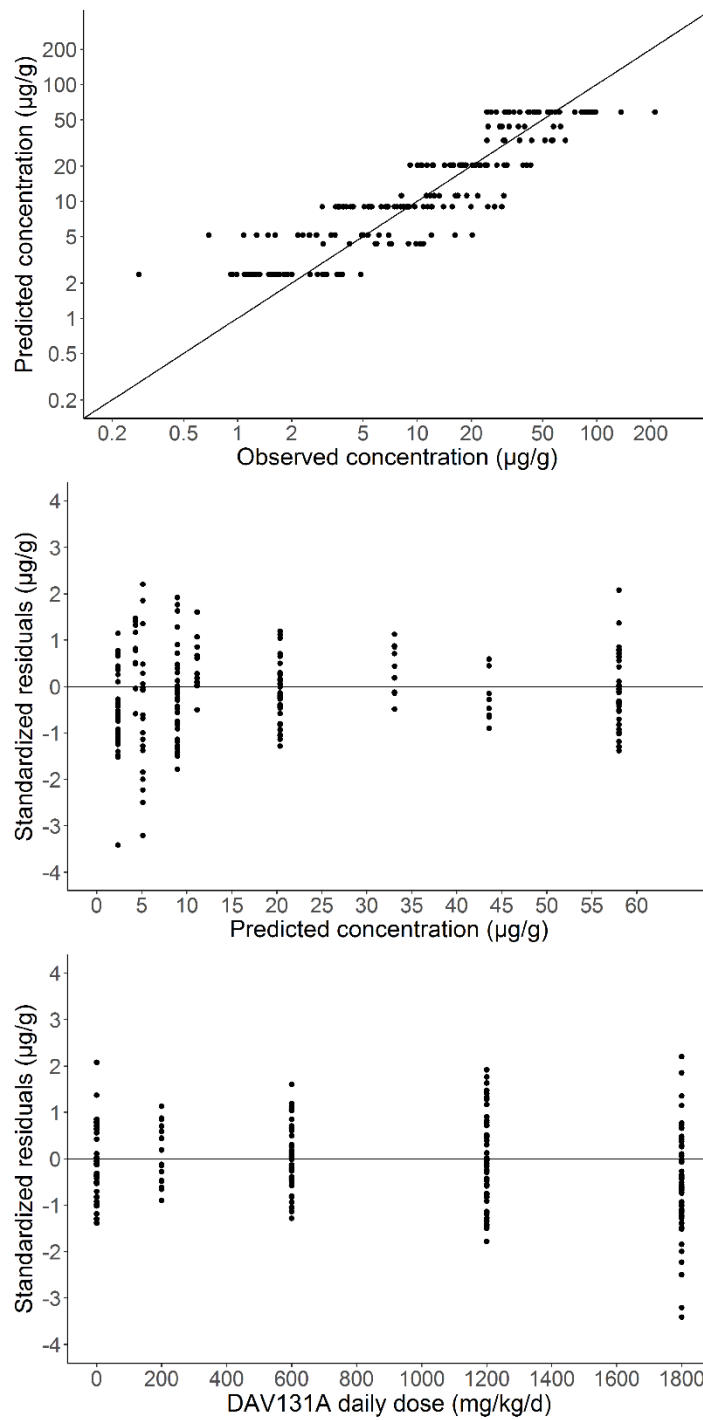


Figure 2. Diagnostic plots of the DAV131A daily dose – fecal free moxifloxacin concentration model drawn from the final model with covariate: Predicted *versus* observed fecal concentration of free moxifloxacin (top),

standardized residuals *versus* predicted fecal concentration of free moxifloxacin (middle), standardized residuals *versus* DAV131A daily dose (bottom).



Our modeling approach enabled to forecast that reducing fecal free moxifloxacin concentration to 17.2 µg/g (13.8-20.7) was sufficient to reduce the mortality rate to 10%. The estimated DAV131A dose needed to achieve this mortality rate was 702.6 mg/kg/day (596.4-808.8). Results for other mortality rates are presented in Table 2 below.

Table 2. Fecal free moxifloxacin concentration and DAV131A daily doses (and their 95% confidence intervals) needed to decrease the mortality rate to 50%, 10%, 5% and 1% in the hamster model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* infection.

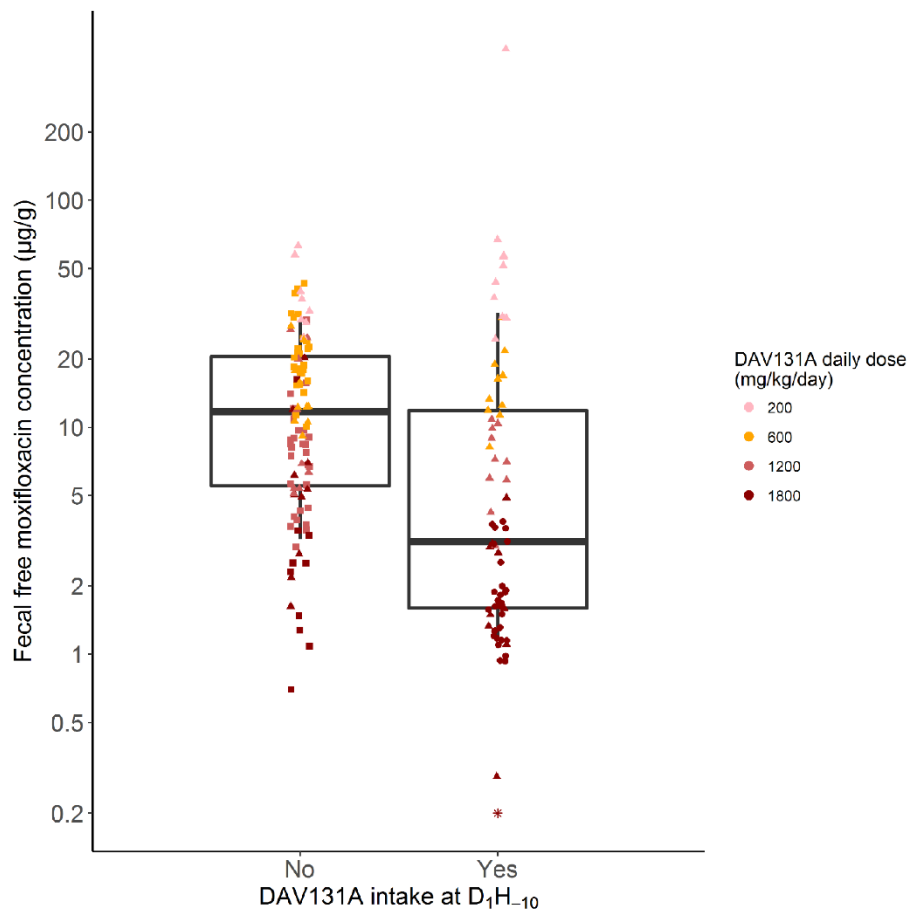
Mortality rate	Fecal free moxifloxacin concentration	DAV131A doses needed
50%	25.3 µg/g (20.5-30.1)	478.5 mg/kg/day (410.5-546.5)
10%	17.2 µg/g (13.8-20.7)	702.6 mg/kg/day (596.4-808.8)
5%	14.5 µg/g (10.7-18.4)	817.5 mg/kg/day (646.5-988.5)
1%	8.5 µg/g (2.8-14.2)	1251.4 mg/kg/day (628.2-1874.6)

Bibliography

1. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: An Open-Source Package for R and S+ to Analyze and Compare Roc Curves. BMC Bioinformatics **2011**; 12:77.

Supplementary Figure S1.

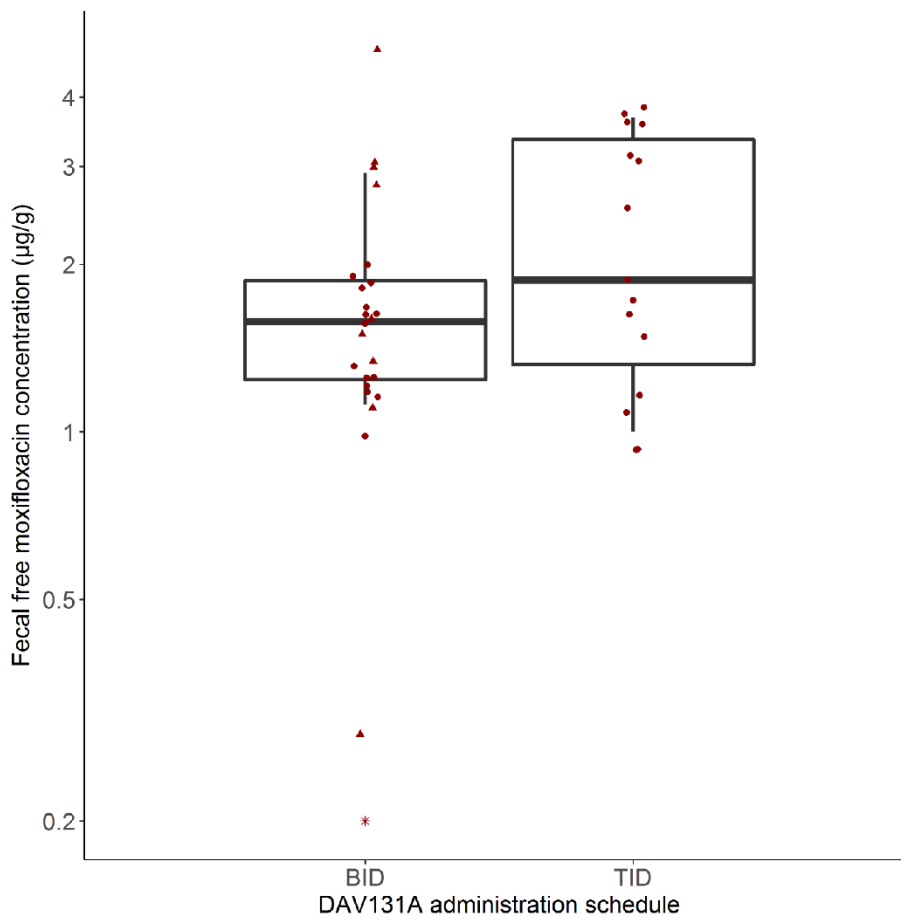
Boxplots of the fecal free moxifloxacin concentrations measured at D₃ in the 178 hamsters treated with 200-1800 mg/kg/day DAV131A that had received or not an additional initial dose of DAV131A 10 hours before the first administration of moxifloxacin. Triangles, dots and squares represent the observed concentrations in studies 1, 2 and 3, respectively. Whiskers represent 10th and 90th percentiles. Red symbol represents data below the limit of quantification.



Supplementary Figure S2.

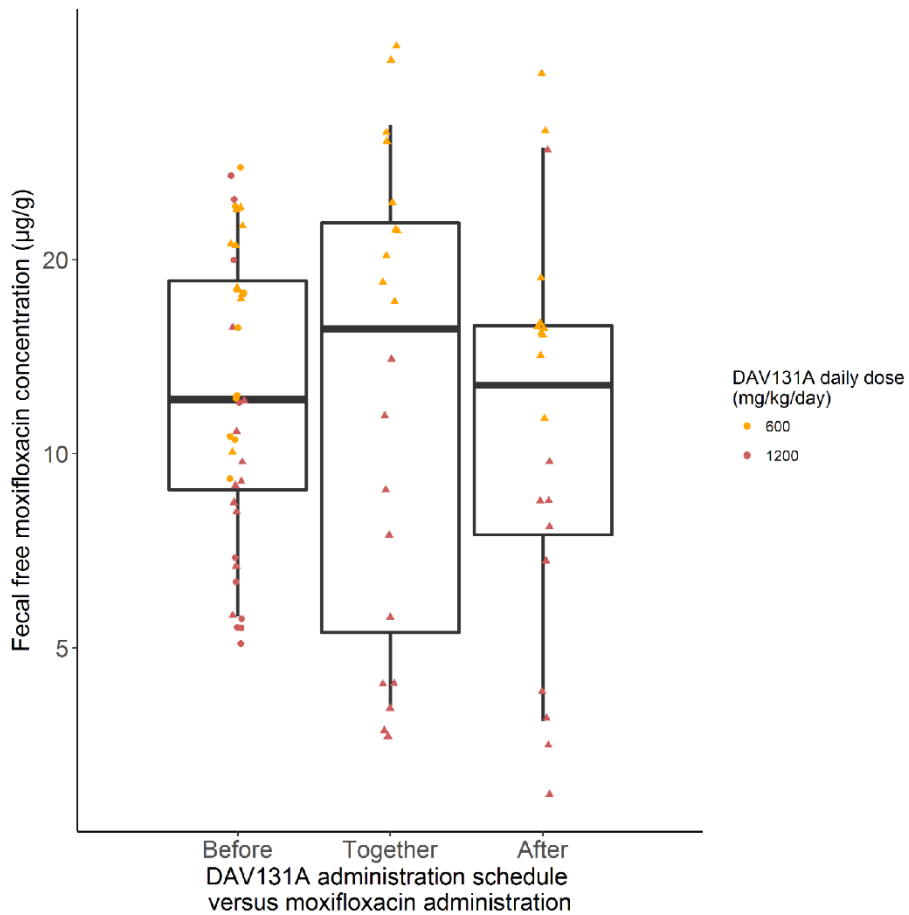
Boxplots of the fecal free moxifloxacin concentrations measured at D₃ according to the number of DAV131A daily administrations, in the 40 hamsters treated with DAV131A 1800 mg/kg/day who received an additional initial dose of DAV131A 10 hours before the first administration of moxifloxacin. Triangles, dots and squares represent the observed concentrations in studies 1, 2 and 3, respectively. Whiskers represent 10th and 90th percentiles. The star represents data below the limit of quantification.

BID, *bis in die*, TID, *ter in die*.



Supplementary Figure S3.

Boxplots of the fecal free moxifloxacin concentrations measured at D₃ in the 80 hamsters treated with DAV131A daily doses of 600 or 1200 mg/kg/day (no administration 10 hours before the first administration of moxifloxacin), according to the schedule of DAV131A administration. Triangles, dots and squares represent the observed concentrations in studies 1, 2 and 3, respectively. Whiskers represent 10th and 90th percentiles. "Before", administration at H₋₄ before moxifloxacin and H₁ after moxifloxacin administration; "Together", administration at H₀ and H₅ after moxifloxacin administration; "After", administration at H₂ and H₇ after moxifloxacin administration.



2. Préservation de la diversité bactérienne et protection contre la mortalité

2.1. Résumé

Dans le premier travail, nous avons pu mettre en évidence le lien entre la réduction des concentrations fécales d'antibiotique et la réduction de la mortalité liée à l'infection dans un modèle animal d'infection à *Clostridium difficile*. Dans ce second travail, nous avons poursuivi l'étude du lien entre l'administration d'antibiotiques et la mortalité dans le modèle hamster d'infection à *Clostridium difficile* induite par les antibiotiques, en analysant l'effet de la moxifloxacine et celui de la clindamycine sur la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal. Nous avons également quantifié le lien entre l'intensité de la dysbiose induite par ces deux antibiotiques et la mortalité, afin de compléter le travail présenté dans le chapitre précédent.

Pour cela, nous avons conduit deux études ayant un design très similaire, une avec chacun des antibiotiques étudiés. Au total, 80 animaux ont été inclus dans l'étude sur la moxifloxacine, et 70 animaux ont été inclus dans l'étude sur la clindamycine. Dans chaque étude, un groupe contrôle de 10 animaux non traités par antibiotique a été constitué. Plusieurs indices de diversité bactérienne ont été calculés : pour la diversité α (au sein d'un échantillon), nous avons déterminé le nombre de taxons bactériens observés, l'indice de Shannon et l'indice de Chao 1 et calculé, pour chaque animal, la variation de l'indice de diversité entre J0 et J3. Pour la diversité β (entre deux échantillons), nous avons calculé les distances UniFrac (pondérées et non pondérées) ainsi que l'indice de dissimilarité de Bray Curtis pour chaque animal entre les échantillons recueillis à J0 et à J3.

De même que pour le premier travail, pour chacune des deux études nous avons mis en évidence une relation inverse entre la dose de DAV131A administrée et la proportion de décès ($p < 10^{-11}$ pour l'étude moxifloxacine, et $p < 10^{-10}$ pour l'étude clindamycine), et une différence significative entre les concentrations d'antibiotique libres dans les selles à J3 chez les hamsters pour lesquels l'infection était fatale et celles mesurées chez les hamsters survivants ($p < 10^{-3}$ pour l'étude moxifloxacine, et $p < 10^{-6}$ pour l'étude clindamycine).

Dans les groupes traités par antibiotique seul, la variation de l'indice de Shannon entre le début du traitement et 3 jours après le début du traitement était de -1.7 (-3.0 ; -1.0) dans l'étude moxifloxacine, et -3.9 (-4.3 ; -2.6) dans l'étude clindamycine. Dans les deux études, il existait une relation croissante entre la concentration d'antibiotique libre dans les selles et la perte de diversité. Cette relation était significative pour tous les indices de diversité analysés. L'intensité de la dysbiose était significativement différente entre les hamsters morts et les hamsters survivants à J16. Par exemple, la variation médiane (min ; max) de l'indice de Shannon entre J0 et J3 était de -1.7 (-3.0 ; -1.0) chez les hamsters morts à J16 et de -1.0 (-1.9 ; -0.1) chez les hamsters survivants ($p < 10^{-4}$) dans l'étude moxifloxacine. Dans l'étude

clindamycine, la variation médiane (min ; max) de l'indice de Shannon entre J0 et J3 était de -2.2 (-4.3 ; -0.4) chez les hamsters morts à J16 et de -1.1 (-2.6 ; 0.0) chez les hamsters survivants ($p < 10^{-7}$).

Afin d'analyser les capacités des différents indices de diversité à prédire la mortalité, nous avons calculé l'aire sous la courbe ROC (AUROC) de chaque indice. Ces AUROC étaient supérieures à 0.8 pour tous les indices dans les 2 études, attestant de très bonnes capacités prédictives. La variation de l'indice de Shannon présentait pour les 2 antibiotiques la meilleure capacité prédictive parmi les indices de diversité α , tandis que la distance UniFrac non pondérée présentait les meilleures capacités prédictives parmi les indices de diversité β .

Nous avons ensuite poolé les résultats obtenus avec les deux antibiotiques et quantifié le lien entre l'intensité de la dysbiose, mesurée soit par la variation de l'indice de Shannon soit par la distance UniFrac, et la probabilité de décès à l'aide d'une régression logistique. L'AUROC de l'indice de Shannon était estimée à 0.89 (IC95%, 0.82 ; 0.95) et l'AUROC de la distance UniFrac non pondérée était estimée à 0.95 (IC95%, 0.90 ; 0.98). La différence entre ces deux AUROC n'était pas significative ($p=0.10$). Le modèle logistique nous a permis d'estimer qu'une petite variation de diversité, telle que la perte de 0.7 unités de Shannon (IC95%, 0.4 ; 1.1) entre J0 et J3 ou une distance UniFrac non pondérée de 0.51 (IC95%, 0.47 ; 0.55) entre les échantillons J0 et J3 était associée à une mortalité de 5% chez les animaux.

Ce travail a permis de mettre en évidence les liens entre les concentrations d'antibiotiques dans les selles et la perte de diversité bactérienne, et entre l'intensité de la dysbiose et le risque de décès dans un modèle animal d'infection à *Clostridium difficile*. Nous avons observé que tous les indices de diversité étudiés ont de bonnes capacités prédictives de la mortalité, l'indice de Shannon et la distance UniFrac non pondérée semblant avoir les meilleures capacités prédictives. Nous avons également pu quantifier ce lien, et prédire qu'une faible perte de diversité était associée à une mortalité non négligeable des animaux. Par ailleurs, nous avons montré que l'administration de DAV131A, en réduisant les concentrations d'antibiotique libre dans les selles de manière dose dépendante, permettait une réduction de la dysbiose induite par deux antibiotiques de deux classes différentes, et une réduction de la mortalité.

L'ensemble de ce travail a été soumis pour publication dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

1 2.2. Article 2

2 **Title**

3 Antibiotic-induced dysbiosis predicts mortality in an animal model of *Clostridium difficile* infection

4 **Authors**

5 Charles Burdet (1,2), Sakina Sayah-Jeanne (3), Thu Thuy Nguyen (1), Perrine Hugon (3), Frédérique
6 Sablier-Gallis (3), Nathalie Saint-Lu (3), Tanguy Corbel (3), Stéphanie Ferreira (4), Mark Pulse (5),
7 William Weiss (5), Antoine Andremont (1), France Mentré* (1,2), Jean de Gunzburg* (3).

8 (1) INSERM & Paris Diderot University, IAME, UMR 1137, Paris, France

9 (2) Department of Epidemiology, Biostatistic and Clinical Research, Bichat Hospital, AP-HP, Paris,
10 France

11 (3) Da Volterra, Paris, France

12 (4) GenoScreen, Lille, France

13 (5) UNT Health Science Center, Fort Worth, TX 76107, USA

14 (6) Laboratory of Bacteriology, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

15 *These authors contributed equally to the work

16 **Corresponding author**

17 Jean de Gunzburg

18 Address: Da Volterra, Le Dorian Bât B1, 172 rue de Charonne, 75011 Paris, France

19 Mail: gunzburg@davolterra.com

20 Phone number: +44 7917 863 207

21 **Author contributions**

22 SSJ, FSG, NSL, TC, AA and JG designed the research.

23 MP, WW and FSG performed the research. SF performed the metagenomic analysis.

24 CB, TTN and FM performed the statistical analysis of the data.

25 CB, SSJ, FM, AA and JG wrote the paper. All authors agreed on the final version of the manuscript.

26 **Competing interests**

27 Perrine Hugon, Frédérique Sablier-Gallis, Nathalie Saint-Lu, Tanguy Corbel and Sakina Sayah-Jeanne
28 are employees of the Da Volterra Company. Antoine Andremont, Charles Burdet, Jean de Gunzburg
29 and France Mentré are consultants for the Da Volterra Company. Thu Thuy Nguyen performed
30 statistical work for the Da Volterra Company through a contract with INSERM UMR 1137.

31 **Funding**

32 This work was supported by Da Volterra, Paris, France.

33 **Keywords**

34 antibiotics, dysbiosis, *C. difficile* infection, hamster animal model, mortality, prevention

35 **Availability of data and materials**

36 The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author
37 on reasonable request.

38 **Ethics approval**

39 Animals were housed in conformity with NIH guidelines. All procedures were conducted at the
40 University of North Texas Health Science Center in Fort Worth (Texas, USA) in accordance with Protocol
41 IACUC-2016-0015 approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee.

42 **Consent to participate**

43 Not applicable

44 **Consent for publication**

45 Not applicable

46

47 **Abstract**

48 Background

49 Antibiotic disruption of the intestinal microbiota favors colonization by *Clostridium difficile*. Using a
50 charcoal-based adsorbent to decrease intestinal antibiotic concentrations, we studied the relationship
51 between antibiotic concentrations in feces and the intensity of dysbiosis, and quantified the link
52 between this intensity and mortality.

53 Methods

54 We administered either moxifloxacin (n=70) or clindamycin (n=60) to hamsters by subcutaneous
55 injection from day 1 (D₁) to D₅, and challenged them with a *C. difficile* toxigenic strain at D₃. Hamsters
56 received various doses of a charcoal-based adsorbent, DAV131A, to modulate intestinal antibiotic
57 concentrations. Gut dysbiosis was evaluated at D₀ and D₃ using diversity indices determined from 16S
58 rRNA gene profiling. Survival was monitored until D₁₆. We analyzed the relationship between fecal
59 antibiotic concentrations and dysbiosis at the time of *C. difficile* challenge and studied their capacity
60 to predict subsequent death of the animals.

61 Results

62 Increasing doses of DAV131A reduced fecal concentrations of both antibiotics, lowered dysbiosis and
63 increased survival from 0% to 100%. Mortality was related to the level of dysbiosis ($p < 10^{-5}$ for the
64 change of Shannon index in moxifloxacin-treated animals and $p < 10^{-9}$ in clindamycin-treated animals).
65 The Shannon diversity index and unweighted UniFrac distance best predicted death, with areas under
66 the ROC curve of 0.89 [95%CI, 0.82;0.95] and 0.95 [0.90;0.98], respectively.

67 Conclusions

68 Altogether, moxifloxacin and clindamycin disrupted the diversity of the intestinal microbiota with a
69 dependency to the DAV131A dose; mortality after *C. difficile* challenge was related to the intensity of
70 dysbiosis in a similar manner with the two antibiotics.

71

72 **Background**

73 Antibiotics disrupt the structure and composition of the intestinal microbiota, and alter metabolic
74 processes occurring in the gut with possible acute and long-term consequences [1-5]. Short-term
75 effects include diarrhea in 5-25% of antibiotic-treated patients, and antibiotics are the main risk factor
76 of *C. difficile* infection [6], which causes a wide range of symptoms from mild diarrhea to toxic
77 megacolon with an annual mortality estimated to 29,000 deaths in the United States [7, 8]. The
78 lincosamide antibiotic clindamycin, as well as fluoroquinolones are among the main antibiotic classes
79 associated with *C. difficile* infection [9].

80 The burden of *C. difficile* infection increases [10], and *C. difficile* is considered by the US CDC as an
81 urgent threat [11]. *C. difficile* pathophysiology is related to the perturbation of the intestinal
82 microbiota and its metabolism, which allows *C. difficile* spores to germinate and colonize the gut, and
83 cytotoxic toxins to be released. Various animal models have been developed to delineate the
84 pathophysiology of *C. difficile* infection [12]; including the golden Syrian hamster model [13]. In this
85 model, hamsters treated with antibiotics and colonized by *C. difficile* are highly susceptible to lethal
86 infection, and the degree of susceptibility to develop infection varies between classes of antibiotics
87 [14, 15].

88 There is however no precise and quantitative analysis of the relationship between antibiotics effect on
89 the global bacterial diversity within the intestinal microbiota and the development of severe *C. difficile*
90 infection. Yet diversity is the first descriptor of the structure of a community and is believed to be a
91 major determinant of its dynamics. The analysis of complex bacterial communities was made possible
92 by the development of efficient sequencing technologies applied to 16S rRNA genes [16]. These genes
93 are found in all bacterial species and contain regions which are highly conserved and others which are
94 highly variable in sequence and can be used as molecular fingerprints. Several metrics are available for
95 measuring diversity in bacterial communities. Alpha-diversity refers to within-sample diversity and is
96 usually analyzed using the number (richness) and the distribution (evenness) of bacterial taxa observed
97 within a single population, e.g., the Shannon diversity index, number of observed operational

98 taxonomic units (OTUs) and the Chao1 index [17, 18]. Beta-diversity, which refers to diversity between
99 samples, measures the distance between pairs of samples, e.g., UniFrac distances based on bacterial
100 taxonomy and Bray-Curtis dissimilarity index [19, 20].
101 However whether the intensity of the dysbiosis, as it can be reflected by the variations of these global
102 indices is quantitatively related to the occurrence of *C. difficile* infection has not be explored so far.
103 This is important for a better understanding of the pathophysiology of *C. difficile* infection and to
104 determine whether various degrees of dysbiosis are associated with various degrees of risk of *C.*
105 *difficile* infection. Here we explored this relationship in an animal model of *C. difficile* infection in
106 hamsters. We had previously showed that DAV131A, a charcoal-based adsorbent with the same
107 principle of action than the DAV132 product which has recently proven to be highly effective to reduce
108 fecal antibiotic concentrations and dysbiosis in human volunteers treated with moxifloxacin [21],
109 reduced mortality through a decrease of fecal antibiotic concentrations in a hamster model of lethal
110 moxifloxacin-induced *C. difficile* colitis [22]. We induced various degrees of dysbiosis by treating
111 hamsters either with clindamycin or moxifloxacin, which have different antibacterial spectra but are
112 both highly associated with the occurrence of *C. difficile* infection, and we modulated intestinal
113 antibiotic concentrations by using various doses of DAV131A.

114 **Results**

115 In order to further analyze the pathophysiology of severe *C. difficile* colitis, we treated hamsters with
116 either moxifloxacin (total number of 70 animals) or clindamycin (total of 60 animals) for 5 days in 2
117 separate studies with similar designs (see Figure 1). Some groups received various doses of DAV131A
118 given orally *bis in die* (bid) concomitantly with the antibiotic and for an additional 3 days after
119 (corresponding to a total of 8 days). All hamsters were challenged with 10^4 spores of a toxigenic *C.*
120 *difficile* strain on the 3rd day of antibiotic treatment. We analyzed the quantitative relationship
121 between antibiotic-induced dysbiosis at the time of the *C. difficile* challenge and the occurrence of
122 subsequent death from infection.

123 Among antibiotic-treated animals, 10 (12.5%) died in the moxifloxacin study, and 28 (40.6%) in the
124 clindamycin study. One hamster from one of the control groups died during the acclimation period,
125 but none did after the beginning of antibiotic treatment. Significant differences in mortality rates were
126 observed between groups which received various doses of DAV131A in addition to the antibiotic ($p < 10^{-11}$
127 in the moxifloxacin study and $p < 10^{-10}$ in the clindamycin study). In both studies, all hamsters treated
128 with antibiotic + DAV131A placebo died. In the moxifloxacin study, all hamsters receiving 200 mg/kg
129 DAV131A bid and greater survived, whereas in the clindamycin study, there was a dose-dependent
130 reduction of mortality from 90% at 300 mg/kg DAV131 bid to 100% survival reached at 750 mg/kg
131 DAV131 bid and above. Full results are presented in Table 1 and Figure 2.

132 Fecal concentration of active antibiotics, as measured by a microbiological assay, decreased as
133 expected with increasing doses of DAV131A ($p < 10^{-9}$ in the moxifloxacin study and $p < 10^{-4}$ in the
134 clindamycin study). These concentrations were significantly lower in hamsters which survived than in
135 those which died during the study ($p = 0.00025$ in the moxifloxacin study and $p < 10^{-6}$ in the clindamycin
136 study, see Table 2).

137 The structure of the bacterial intestinal microbiota was studied by 16S rRNA gene profiling using
138 Illumina sequencing technology. Several α - (within sample) and β - (between samples) diversity metrics
139 were computed for investigating the individual-specific change of diversity between the time of
140 antibiotic initiation and the time of *C. difficile* inoculation. The loss of diversity between the beginning
141 of antibiotic treatment and *C. difficile* inoculation was lower in DAV131A-treated hamsters than in
142 those treated with antibiotic and DAV131A placebo (Table 1 and Supplementary Table 1). Indeed, loss
143 of diversity increased with increasing concentrations of active antibiotic in feces, attesting of a direct
144 relationship between antibiotic exposure of the microbiota and the extent of dysbiosis (Spearman $r = -$
145 0.25, $p = 0.043$ for the change of Shannon index between D_0 and D_3 and $r = 0.71$, $p < 10^{-10}$ for unweighted
146 UniFrac distance between D_0 and D_3 in the moxifloxacin study, and $r = -0.49$, $p < 10^{-4}$ for the change of
147 Shannon index between D_0 and D_3 and $r = 0.57$, $p < 10^{-5}$ for unweighted UniFrac distance between D_0 and
148 D_3 in the clindamycin study, see Supplementary Figure 1 and in Supplementary Table 2).

149 We also compared the changes in diversity within the intestinal microbiota between D_0 and D_3
150 according to the vital status at D_{16} . Diversity at the time of *C. difficile* challenge was significantly less
151 affected in hamsters which survived (Table 2 and Figure 3). In the moxifloxacin study, the median (min;
152 max) change of the Shannon index was -1.7 (-3.0; -1.0) in hamsters which died by D_{16} , versus -1.0 (-1.9;
153 -0.1) in those which survived ($p < 10^{-4}$). In the clindamycin study, the median (min; max) change of the
154 Shannon index was -2.2 (-4.3; -0.4) in hamsters which died by D_{16} , versus -1.1 (-2.6; 0.0) in those which
155 survived ($p < 10^{-7}$). Interestingly, the median change of Shannon index in hamsters which died was
156 rather similar for the 2 antibiotics, in spite of their different spectra of activity and mode of action. In
157 order to further assess the ability of diversity indices to predict death by D_{16} , we computed for each
158 diversity index the area under the Receiver Operating Curve (AUROC), which can be interpreted as the
159 probability that the index correctly ranks 2 randomly chosen animals. AUROCs were above 0.8 for all
160 diversity indices studied (Table 2), attesting that they are highly predictive of the outcome [23]. Each
161 index also exhibited a similar predictability of death for both antibiotics. Changes in the Shannon index
162 at the time of challenge had the best predictability of death by D_{16} among α -diversity indices (AUROC
163 0.91 [95%CI, 0.80; 0.98] for moxifloxacin and 0.88 [0.78; 0.96] for clindamycin), whereas unweighted
164 UniFrac was the most predictive β -diversity index (AUROC 0.95 [0.90; 0.99] for moxifloxacin and 0.94
165 [0.88; 0.99] for clindamycin). These two indices were further studied after pooling data from the two
166 different antibiotic treatments. Overall, data from 130 antibiotic-treated animals were available,
167 among which 38 died by D_{16} (29.2%). Logistic models of mortality by D_{16} for both diversity indices are
168 presented in Figure 4. The AUROC of the Shannon index change was 0.89 [0.82; 0.95], and that of the
169 unweighted UniFrac distance was 0.95 [0.90; 0.98] (see Supplementary Figure 2), thus also indicative
170 of their high predictive value. The difference between the 2 AUROCs was not significant ($p=0.10$).
171 As these two indices were highly predictive of mortality, we further studied them by determining their
172 optimal cut-off value best discriminating between death and survival by D_{16} using the Youden index.
173 The value of the Shannon index change best discriminating between death and survival at D_{16} was -1.7
174 [-1.8; -1.2] (Supplementary Figure 3). The probability of observing a loss of diversity higher than -1.7 in

175 hamsters which would die by D_{16} (sensitivity) was 0.71 [0.63; 0.95] and the probability of observing a
176 loss of diversity lower than -1.7 in hamster which survived at D_{16} (specificity) was 0.96 [0.76; 0.99]. The
177 best cut-off value of the unweighted UniFrac distance was 0.61 [0.58; 0.64] (Supplementary Figure 3).
178 Associated sensitivity and specificity were 0.87 [95%CI, 0.79; 1.00] and 0.88 [0.72; 0.97], respectively.
179 These values of sensitivity and specificity further illustrate the high predictability of these two diversity
180 indices for the occurrence of the death of hamsters in these experiments.
181 Finally, in order to quantify the relationship between the loss of diversity and mortality, and to
182 determine the maximal change of diversity required to limit the mortality rate to predefined values,
183 we developed a logistic model of the probability of death according to the diversity observed in the
184 intestinal microbiota. The model showed that small losses of diversity were sufficient to allow the
185 development of severe colitis and death in a substantial number of animals. For instance, a reduction
186 of the Shannon index between D_0 and D_3 by as little as 0.7 [95%CI, 0.4; 1.1] predicted to result in the
187 death of 5% of the animals. The same mortality rate was predicted by an unweighted UniFrac distance
188 of 0.51 [0.47; 0.55] between D_0 and D_3 . Results for other mortality rates are presented in Table 3.

189 **Discussion**

190 Our main result was the evidence of an association between the probability of hamster death and the
191 antibiotic-induced loss of diversity of the intestinal microbiota at the time of *C. difficile* inoculation.
192 Seemingly such a quantitative relationship had never been described. In this animal model, antibiotics
193 perturb the structure and function of the intestinal microbiota, allowing the germination and growth
194 of *C. difficile* spores, and the production of cytotoxic toxins leading to death of the animals [12]. The
195 protection provided by DAV131A through lowering the fecal concentration of active antibiotic,
196 previously shown for moxifloxacin [22] was here extended to clindamycin, an antibiotic from a
197 different class with a very different mode of action and spectrum of activity.
198 Our observations showed a clear relation between the loss of intestinal microbiota diversity and the
199 development of *C. difficile* associated death in this model. Both α - and β -diversity indices studied had
200 high predictive capacities for the ability of *C. difficile* spores to generate a lethal infection, the change

201 of Shannon index between the beginning of antibiotic treatment and the time of *C. difficile* inoculation
202 (for α -diversity) and the unweighted UniFrac distance (for β -diversity) appearing as the most predictive
203 metrics. A link between the reduction of intestinal microbiota diversity after treatment with the
204 glycylycine antibiotic tigecycline has previously been reported in mice [24] but the precise
205 quantitative relationship was not analyzed. In humans, the occurrence of *C. difficile* infection has been
206 associated with a reduced diversity within the intestinal microbiota [25, 26]. Here, we extend these
207 observations to hamsters treated with either of two very different antibiotics moxifloxacin and
208 clindamycin. We showed using various metrics, that individual-specific loss of diversity within the
209 intestinal microbiota induced by antibiotics prior to *C. difficile* inoculation was highly predictive of the
210 animals' susceptibility to *C. difficile* infection, thus providing further insight into *C. difficile*
211 pathophysiology. Furthermore, we were able to quantify this link, with even a small loss of diversity
212 significantly increasing the risk of mortality. Indeed, a 0.7 reduction of the Shannon diversity index was
213 associated with a 5% risk of death.

214 Furthermore, we observed that the loss of diversity was correlated to the concentration of active
215 antibiotic in the fecal content. By adsorbing antibiotic residues reaching the colon after subcutaneous
216 administration, DAV131A protected the microbiota against antibiotic-induced dysbiosis and reduced
217 mortality in a dose dependent-manner. This approach appears to be promising as it might be extended
218 to most classes of antibiotics, in addition to the two tested here, due to the wide adsorbing capacities
219 of the product [21]. Transposition to humans is currently ongoing. In a phase 1 clinical trial, DAV132,
220 the human counterpart of DAV131A, was shown to reduce by more than 99% the fecal exposure to
221 moxifloxacin in healthy volunteers, while the plasma concentration of the antibiotic remained
222 unaffected; in subjects co-treated by moxifloxacin and DAV132, the diversity of the microbiota was
223 protected from moxifloxacin-induced disruption [21]. Further developments of this strategy to protect
224 patients from the deleterious consequences of antibiotic treatments on the microbiota are currently
225 ongoing.

226 **Material and Methods**

227 Hamster model of antibiotic-induced *C. difficile* infection

228 A previously developed hamster model of antibiotic-induced *C. difficile* infection was adapted to
229 moxifloxacin (a fluoroquinolone antibiotic) and clindamycin (a lincosamide antibiotic) [27]. After an 8-
230 day acclimation period, male Golden Syrian hamsters (80-120 grams) received antibiotic by
231 subcutaneous injection at a time designated as H₀, once a day from day 1 (D₁) to day 5 (D₅).
232 Administered doses were 30 mg/kg for moxifloxacin and 5 mg/kg for clindamycin. These doses were
233 chosen as the lowest dose resulting in a 100% mortality rate in treated hamsters infected with *C.*
234 *difficile* spores.

235 Animals were infected orally on day 3 (D₃), 4 hours after antibiotic administration (H₄), with 10⁴ spores
236 of the non-epidemic *C. difficile* strain UNT103-1 (VA-11, REA J strain), TcdA+, TcdB+, cdtB-, vancomycin
237 MIC = 2 µg/mL, moxifloxacin MIC = 16 µg/mL, clindamycin MIC > 256 µg/mL, ceftriaxone MIC = 128
238 µg/mL, obtained from Dr. Curtis Donskey, Ohio VA Medical Centre.

239 Vital status of the animals was evaluated daily until the end of the study at D16. Animals judged in a
240 moribund state were euthanized. All surviving hamsters were euthanized at D16.

241 Ethics statement

242 Animals were housed in conformity with NIH guidelines [28]. All procedures were conducted at the
243 University of North Texas Health Science Center in Fort Worth (Texas, USA) in accordance with Protocol
244 IACUC-2016-0015 approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee.

245 DAV131A

246 DAV131A is an activated charcoal-based adsorbent with high adsorption capacity [29]. It was
247 administered to hamsters by oral gavage after mixing with 0.25% w/v Natrosol® 250
248 Hydroxyethylcellulose. Hamsters from placebo groups received Natrosol® alone.

249 Study design

250 Two studies with rather similar design were performed each with one antibiotic, moxifloxacin or
251 clindamycin, in order to assess the protection provided by DAV131A against lethal antibiotic-induced

252 *C. difficile* infection. DAV31A was administered *bis in die* (bid) to hamsters for 8 days, at H0 and H5 on
253 D1, then at H-4 and H1 from D2 to D8.

254 In the moxifloxacin study, 70 animals were treated with moxifloxacin and 10 animals were left
255 untreated. Groups of 10 or 20 antibiotic-treated animals were constituted according to the DAV131A
256 unit dose administered: DAV131A placebo (MXF/0, n=10), 200 mg/kg (MXF/200, n=20), 300 mg/kg
257 (MXF/300, n=20), 600 mg/kg (MXF/600, n=10) or 900 mg/kg (MXF/900, n=10). The control group was
258 not treated by antibiotic and received DAV131A placebo.

259 In the clindamycin study, 60 animals were treated with clindamycin and 10 were left untreated. Groups
260 of 10 antibiotic-treated animals were constituted according to the DAV131A unit dose administered:
261 DAV131A placebo (CLI/0, n=10), 300 mg/kg (CLI/300, n=10), 450 mg/kg (CLI/450, n=10), 600 mg/kg
262 (CLI/600, n=10), 750 mg/kg (CLI/750, n=10) or 900 mg/kg (CLI/900, n=10). The control group was not
263 treated by antibiotic and received DAV131A placebo.

264 Sample collection

265 For each animal, 2 fecal samples were collected, at D0 and D3. On D0, the fecal sample comprised
266 pellets emitted in the 12 hours preceding the first antibiotic administration. On D3, samples were
267 constituted by pellets emitted in the 12 hours following the third antibiotic administration; this
268 surrounds the time at which animals were challenged by gavage with *C. difficile* spores (at 4h after
269 antibiotic administration). Coprophagy of hamsters was not controlled, as this is a natural behavior in
270 rodents. Fecal samples were stored at -80°C until further analysis.

271 Measure of antibiotic concentrations

272 Fecal concentrations of active antibiotic were determined on fecal samples collected at D0 and D3 by
273 a microbiological bioassay. On the day of the assay, feces were weighted, homogenized in sterile saline,
274 and debris were eliminated by centrifugation. Fecal active moxifloxacin concentrations were measured
275 using *B. subtilis* ATCC 6633 after incubation at 37°C for 24 hours [30]. Fecal concentrations of active
276 clindamycin were measured using *M. luteus* ATCC 9341 after incubation at 37°C for 24 hours [31]. Data
277 below the limit of quantification were imputed to 0.

278 16S rRNA gene bacterial community profiling

279 Microbial DNA was extracted using an extraction protocol optimized at GenoScreen, partially based on
280 commercially available extraction kits (QIAamp DNA stool Kit, Qiagen, Germany) with the addition of
281 chemical and mechanical lysis steps.

282 The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was then amplified using an optimized and standardized
283 amplicon-library preparation protocol (Metabio®[®], GenoScreen, Lille, France). Positive (Artificial
284 Bacteria Community comprising 17 different bacteria, ABCv2) and negative (sterile water) controls
285 were also included. Briefly, PCR reactions were performed using 5 ng of genomic DNA and in-house
286 fusion barcoded primers (final concentrations of 0.2 µM), with an annealing temperature of 50°C for
287 30 cycles. PCR products were purified using Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter,
288 Brea, CA, USA), quantified according to GenoScreen's protocol, and mixed in an equimolar amount.
289 Sequencing was performed using 250-bp paired-end sequencing chemistry on the Illumina MiSeq
290 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at GenoScreen.

291 Raw paired-end reads were then demultiplexed per sample and subjected to the following process: (1)
292 search and removal of both forward and reverse primer using CutAdapt, with no mismatches allowed
293 in the primers sequences; (2) quality-filtering using the PRINSEQ-lite PERL script [32], by truncating
294 bases at the 3' end with Phred quality score <30; (3) paired-end read assembly using FLASH [33], with
295 a minimum overlap of 30 bases and >97% overlap identity.

296 Taxonomic and diversity analysis were performed using the Metabio Online v2.0 pipeline
297 (GenoScreen, Lille, France) which is partially based on the QIIME software v1.9.1 [34]. Following the
298 steps of pre-processing, chimera sequences were detected and eliminated (in-house method based on
299 the use of Usearch 6.1). Then, clustering of similar sequences (97% identity threshold for an affiliation
300 at the genus level on the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene) was performed with Uclust v1.2.22q
301 [35] through an open-reference OTU picking process and complete-linkage method, finally creating
302 groups of sequences or "Operational Taxonomic Units" (OTUs). An OTU cleaning step corresponding
303 to the elimination of singletons was performed. For each OTU, the most abundant sequence was

304 considered as the reference sequence and taxonomically compared to the Greengenes database,
305 release 13_8 (www.greengenes.gov) by the RDP classifier method v2.2 [36].

306 Various diversity indices were computed using QIIME [34]. α -diversity metrics included the Shannon
307 diversity index, the number of observed OTUs and the Chao1 index. In order to study the evolution of
308 the bacterial diversity after the beginning of antibiotic treatment, we computed for each animal the
309 difference between the values of these indices at D_3 and D_0 . For β -diversity metrics, we computed the
310 unweighted and weighted UniFrac distances, as well as Bray-Curtis dissimilarity for each animal
311 between the samples collected at D_3 and D_0 .

312 Statistical analysis

313 For each study, we compared mortality rates at D_{16} and diversity indices across groups using
314 nonparametric Fisher exact or Kruskal-Wallis tests, as appropriate. Fecal active antibiotic
315 concentrations were compared according to DAV131A unit dose in antibiotic-treated hamsters using
316 the Kruskal-Wallis test. In case of significant difference, post-hoc comparisons of each of the
317 antibiotic-treated groups to the control group were performed using non parametric Fisher exact or
318 Wilcoxon test with Benjamini-Hochberg's correction for multiple testing. The correlations between
319 active moxifloxacin or clindamycin fecal concentrations and diversity indices were studied using the
320 Spearman rank correlation coefficient among antibiotic-treated hamsters.

321 We then compared for each study the fecal active antibiotic concentrations or diversity indices at D_3
322 according to the vital status at D_{16} in antibiotic-treated hamsters, using the non-parametric Wilcoxon
323 test. The predictability of death by D_{16} of the fecal active antibiotic concentration and of each studied
324 diversity index was evaluated using the area under the Receiving Operator Curve (ROC) curve (AUROC)
325 and its 95% confidence interval, computed using 2000 paired-bootstrap replicates. In the context of
326 the present work, the AUROC can be interpreted as the probability that the diversity index will
327 correctly rank 2 randomly chosen animals, 1 which would die by D_{16} , and 1 which would survive [37].

328 In order to further analyze the link between microbial diversity and mortality by D_{16} , we pooled the
329 data of the 2 studies and performed a logistic regression of mortality by D_{16} according to diversity

330 index in all antibiotic-treated hamsters. Diversity indices studied were those with the best predictive
331 capacity among α - and β -diversity indices. Predictability was estimated using the AUROC and its 95%
332 confidence interval. AUROCs of the 2 indices were compared using 2000 paired-bootstrap replicates.
333 The best cut-off value for discriminating between hamsters which died and which survived at D_{16} was
334 determined as the value allowing the maximization of both sensitivity and specificity, using the Youden
335 index [38] and its 95% confidence interval. In the frame of the present study, sensitivity represents the
336 probability of change of diversity between D_0 and D_3 being higher than a cut-off value in hamsters who
337 will die by D_{16} , and specificity is the probability of the change of diversity being lower than a cut-off
338 value in hamsters who will survive until D_{16} . The Youden index is computed as sensitivity + specificity
339 – 1, and ranges between -1 and 1. A logistic model was then used to determine the diversity index
340 values required to reduce mortality to various rates ranging from 1% to 10%.

341 Data are presented as number of observations n (%) or median (min; max). All tests were 2-sided with
342 a type-I error of 0.05. All analyses were performed using R software v3.2.2.

343

344 **Bibliography**

- 345 1. Dethlefsen L, Relman DA: Incomplete recovery and individualized responses of the human distal
346 gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of*
347 *Sciences of the United States of America*, 2011, 108 Suppl 1:4554-4561.
- 348 2. Lichtman JS, Ferreyra JA, Ng KM, Smits SA, Sonnenburg JL, Elias JE: Host-Microbiota Interactions
349 in the Pathogenesis of Antibiotic-Associated Diseases. *Cell Reports* 2016, 14:1049-1061.
- 350 3. Perez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, Otto W, Rojo D,
351 Bargiela R, von Bergen M, et al: Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-
352 omic approach. *Gut* 2013, 62:1591-1601.
- 353 4. Theriot CM, Bowman AA, Young VB: Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter
354 Secondary Bile Acid Production and Allow for *Clostridium difficile* Spore Germination and
355 Outgrowth in the Large Intestine. *mSphere* 2016, 1.
- 356 5. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK: Long-term impacts of antibiotic exposure on the
357 human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010, 156:3216-3223.
- 358 6. Bergogne-Berezin E: Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. *International*
359 *Journal of Antimicrobial Agents* 2000, 16:521-526.
- 360 7. Theriot CM, Young VB: Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium*
361 *difficile*. *Annual Review of Microbiology* 2015, 69:445-461.
- 362 8. Dubberke ER, Olsen MA: Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. *Clinical*
363 *Infectious Diseases* 2012, 55 Suppl 2:S88-92.
- 364 9. Slimings C, Riley TV: Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of
365 systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014, 69:881-891.
- 366 10. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek
367 JI, Phipps EC, et al: Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *The New England*
368 *Journal of Medicine* 2015, 372:825-834.
- 369 11. Biggest Threats [https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html]

- 370 12. Best EL, Freeman J, Wilcox MH: Models for the study of *Clostridium difficile* infection. *Gut*
371 *Microbes* 2012, 3:145-167.
- 372 13. Wilson KH, Silva J, Fekety FR: Suppression of *Clostridium difficile* by normal hamster cecal flora
373 and prevention of antibiotic-associated cecitis. *Infection and Immunity* 1981, 34:626-628.
- 374 14. Larson HE, Borriello SP: Quantitative study of antibiotic-induced susceptibility to *Clostridium*
375 *difficile* enterococitis in hamsters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990, 34:1348-1353.
- 376 15. Elmer GW, Vega R, Mohutsky MA, McFarland LV: Variable time of onset of *Clostridium difficile*
377 disease initiated by antimicrobial treatment in hamsters. *Microbial Ecology in Health and Disease*
378 1999, 11:163-168.
- 379 16. Metzker ML: Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010, 11:31-46.
- 380 17. Shannon C: A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 1948,
381 27:623-656.
- 382 18. Chao A: Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal*
383 *of Statistics* 1984, 11:265-270.
- 384 19. Lozupone C, Knight R: UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities.
385 *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71:8228-8235.
- 386 20. Bray J, Curtis J: An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological*
387 *Monographs* 1957, 27:325-349.
- 388 21. de Gunzburg J, Ghozlane A, Ducher A, Le Chatelier E, Duval X, Ruppe E, Armand-Lefevre L, Sablier-
389 Gallis F, Burdet C, Alavoine L, et al: Protection of the human gut microbiome from antibiotics. *The*
390 *Journal of Infectious Diseases* 2017.
- 391 22. Burdet C, Sayah-Jeanne S, Nguyen TT, Miossec C, Saint-Lu N, Pulse M, Weiss W, Andremont A,
392 Mentre F, de Gunzburg J: Protection of Hamsters from Mortality by Reducing Fecal Moxifloxacin
393 Concentration with DAV131A in a Model of Moxifloxacin-Induced *Clostridium difficile* Colitis.
394 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017, 61.
- 395 23. Hosmer D, Lemeshow S: *Applied Logistic Regression*. USA; 2000.

- 396 24. Bassis CM, Theriot CM, Young VB: Alteration of the murine gastrointestinal microbiota by
397 tigeicycline leads to increased susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Antimicrobial Agents*
398 *and Chemotherapy* 2014, 58:2767-2774.
- 399 25. Schubert AM, Rogers MA, Ring C, Mogle J, Petrosino JP, Young VB, Aronoff DM, Schloss PD:
400 Microbiome data distinguish patients with *Clostridium difficile* infection and non-*C. difficile*-
401 associated diarrhea from healthy controls. *MBio* 2014, 5:e01021-01014.
- 402 26. Zhang L, Dong D, Jiang C, Li Z, Wang X, Peng Y: Insight into alteration of gut microbiota in
403 *Clostridium difficile* infection and asymptomatic *C. difficile* colonization. *Anaerobe* 2015, 34:1-7.
- 404 27. Phillips ST, Nagaro K, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN: Susceptibility of hamsters to infection by
405 historic and epidemic BI *Clostridium difficile* strains during daily administration of three
406 fluoroquinolones. *Anaerobe* 2011, 17:166-169.
- 407 28. National Research Council: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The National
408 Academy Press, Washington D.C., USA. 2011.
- 409 29. Grall N, Massias L, Nguyen TT, Sayah-Jeanne S, Ducrot N, Chachaty E, de Gunzburg J, Andremont
410 A: Oral DAV131, a charcoal-based adsorbent, inhibits intestinal colonization by beta-lactam-
411 resistant *Klebsiella pneumoniae* in cefotaxime-treated mice. *Antimicrobial Agents and*
412 *Chemotherapy* 2013, 57:5423-5425.
- 413 30. Kampougeris G, Antoniadou A, Kavouklis E, Chryssouli Z, Giamarellou H: Penetration of
414 moxifloxacin into the human aqueous humour after oral administration. *The British Journal of*
415 *Ophthalmology* 2005, 89:628-631.
- 416 31. Courvalin O, Leclercq R, Rice L: *Antibiogram*. ASM Press; 2010.
- 417 32. Schmieder R, Edwards R: Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.
418 *Bioinformatics* 2011, 27:863-864.
- 419 33. Magoc T, Salzberg SL: FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome
420 assemblies. *Bioinformatics* 2011, 27:2957-2963.

- 421 34. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG,
422 Goodrich JK, Gordon JI, et al: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing
423 data. *Nature Methods* 2010, 7:335-336.
- 424 35. Edgar RC: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010,
425 26:2460-2461.
- 426 36. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR: Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA
427 sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 2007,
428 73:5261-5267.
- 429 37. Fawcett T: An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 2006, 27:861-874.
- 430 38. Youden WJ: Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950, 3:32-35.

431 **Tables**

432 **Table 1.** Mortality rates, fecal concentrations of active antibiotic at D3, change of Shannon index
 433 between D0 and D3 and unweighted UniFrac distances between D0 and D3 according to treatment
 434 groups in the moxifloxacin and clindamycin studies. Data are presented as n (%) or median (min; max)
 435 as appropriate. q-values refer to the comparison of the corresponding treatment group with the
 436 antibiotic + DAV131A placebo treatment group (MXF/0 or CLI/0), after Benjamini-Hochberg correction.
 437 The p-values for the comparison of all treatment groups using Fisher exact or Kruskal-Wallis tests are
 438 reported in the "All groups" line. In the analysis of concentrations, only antibiotic-treated groups were
 439 included.

Treatment group	n	Mortality	q-value	Concentration (µg/g)	q-value	Shannon index change	q-value	Unweighted UniFrac	q-value
Moxifloxacin study									
controls	10	0 (0)	-	-	-	-0.1 (-0.6; 2.3)	-	0.28 (0.24; 0.69)	-
MXF/0	10	10 (100)	-	110.0 (70.5; 172.7)	-	-1.7 (-3.0; -1.0)	-	0.61 (0.56; 0.76)	-
MXF/200	20	0 (0)	<10 ⁻⁷	94.6 (43.0; 162.1)	0.14	-1 (-1.9; 0.1)	0.00065	0.56 (0.49; 0.65)	0.00075
MXF/300	20	0 (0)	<10 ⁻⁷	57.2 (20.2; 107.4)	<10 ⁻⁴	-1 (-1.5; -0.2)	0.00026	0.51 (0.45; 0.57)	<10 ⁻⁶
MXF/600	10	0 (0)	<10 ⁻⁴	4.2 (1.1; 20.3)	<10 ⁻⁴	-0.8 (-1.3; -0.3)	0.00023	0.45 (0.42; 0.56)	<10 ⁻⁴
MXF/900	10	0 (0)	<10 ⁻⁴	0.0 (0.0; 1.3)	0.00033	-0.8 (-1.6; -0.2)	0.0022	0.41 (0.37; 0.51)	<10 ⁻⁴
All groups	80	10 (12.5)	<10 ⁻¹¹	59.4 (0.0; 172.7)	<10 ⁻⁹	-1 (-3; 2.3)	<10 ⁻⁵	0.51 (0.24; 0.76)	<10 ⁻⁹
Clindamycin study									
controls	9	0 (0)	-	-	-	0.0 (-0.3; 0.5)	-	0.31 (0.27; 0.38)	-
CLI/0	10	10 (100)	-	10.1 (0.0; 37.8)	-	-3.9 (-4.3; -2.6)	-	0.77 (0.72; 0.84)	-
CLI/300	10	9 (90)	>0.99	4.2 (0.0; 14.2)	0.061	-2.1 (-2.6; -1.5)	<10 ⁻⁴	0.69 (0.62; 0.74)	<10 ⁻⁴
CLI/450	10	6 (60)	0.11	0.0 (0.0; 6.5)	0.0041	-1.4 (-2.5; -1.0)	<10 ⁻⁴	0.66 (0.63; 0.71)	<10 ⁻⁴
CLI/600	10	3 (30)	0.0052	0.0 (0.0; 30.0)	0.024	-1.1 (-1.6; -0.4)	<10 ⁻⁴	0.61 (0.55; 0.65)	<10 ⁻⁴
CLI/750	10	0 (0)	<10 ⁻⁴	0.0 (0.0; 0.0)	0.0019	-0.8 (-1.4; 0.0)	<10 ⁻⁴	0.57 (0.55; 0.61)	<10 ⁻⁴
CLI/900	10	0 (0)	<10 ⁻⁴	0.0 (0.0; 0.0)	0.0019	-0.9 (-1.5; 0.7)	<10 ⁻⁴	0.57 (0.49; 0.63)	<10 ⁻⁴
All groups	69	28 (40.6)	<10 ⁻¹⁰	0.0 (0.0; 37.8)	<10 ⁻⁴	-1.1 (-4.3; 0.5)	<10 ⁻⁹	0.62 (0.27; 0.84)	<10 ⁻¹⁰

440

441 **Table 2.** Median (min; max) values of active antibiotic concentration and change of α - (Shannon index,
 442 number of OTUs and Chao1 index) and β - (unweighted and weighted UniFrac distances, and Bray-
 443 Curtis dissimilarity) diversity indices between D_0 and D_3 according to vital status at D_{16} in antibiotic-
 444 treated groups for each study, and their respective area under the ROC curve (AUROC) for predicting
 445 occurrence of death by D_{16} . P-values refer to non-parametric Wilcoxon test.

	Died	Survived	p-value	AUROC [95% CI]
	N=10	N=60		
Moxifloxacin study				
Concentration	110.0 (70.5; 172.7)	52.9 (0.0; 162.1)	0.00025	0.87 [0.76; 0.95]
α-diversity				
Change of Shannon index	-1.7 (-3.0; -1.0)	-1.0 (-1.9; 0.1)	$<10^{-4}$	0.91 [0.80; 0.98]
Change of Number of OTUs	-135.9 (-207.3; -52.2)	-72.9 (-201.0; 74.5)	0.001	0.83 [0.67; 0.95]
Change of Chao1 index	-137.9 (-213.4; -46.2)	-75.5 (-229.3; 83.5)	0.002	0.81 [0.64; 0.93]
β-diversity				
Unweighted UniFrac	0.61 (0.56; 0.76)	0.51 (0.37; 0.65)	$<10^{-5}$	0.95 [0.90; 0.99]
Weighted UniFrac	0.33 (0.24; 0.48)	0.26 (0.13; 0.57)	0.02	0.73 [0.58; 0.87]
Bray-Curtis dissimilarity	0.78 (0.63; 0.86)	0.60 (0.31; 0.87)	$<10^{-4}$	0.91 [0.81; 0.99]
Clindamycin study	N=28	N=32		
Concentration	5.0 (0.0; 37.8)	0.0 (0.0; 4.4)	$<10^{-6}$	0.81 [0.72; 0.91]
α-diversity				
Change of Shannon index	-2.2 (-4.3; -0.4)	-1.1 (-2.6; 0.0)	$<10^{-6}$	0.88 [0.78; 0.96]
Change of Number of OTUs	-223.9 (-344.6; -75.8)	-106.8 (-202.2; -22.0)	$<10^{-5}$	0.86 [0.75; 0.95]
Change of Chao1 index	-227.7 (-358.2; -73.8)	-110.0 (-209.0; -22.7)	$<10^{-6}$	0.86 [0.76; 0.95]
β-diversity				
Unweighted UniFrac	0.71 (0.59; 0.84)	0.60 (0.49; 0.68)	$<10^{-10}$	0.94 [0.88; 0.99]
Weighted UniFrac	0.42 (0.24; 0.62)	0.30 (0.24; 0.59)	$<10^{-6}$	0.87 [0.76; 0.96]
Bray-Curtis dissimilarity	0.86 (0.71; 0.98)	0.70 (0.61; 0.87)	$<10^{-9}$	0.92 [0.84; 0.97]

446

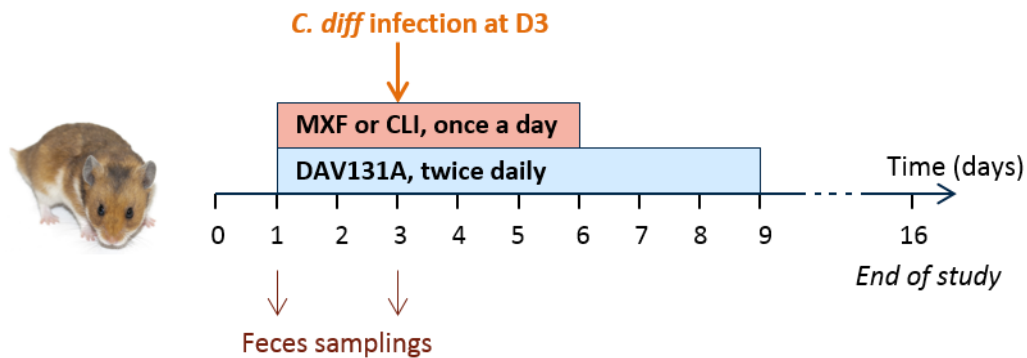
447 **Table 3.** Estimated change of Shannon index and unweighted UniFrac distances between D_0 and D_3
 448 (and their 95% confidence intervals) needed to decrease the mortality rate to 50%, 10%, 5% and 1% in
 449 the hamster model of moxifloxacin-induced *Clostridium difficile* infection.

Mortality rate	Change of Shannon index	unweighted UniFrac distance
10%	-1.0 [-1.2; -0.8]	0.58 [0.55; 0.60]
5%	-0.7 [-1.1; -0.4]	0.55 [0.53; 0.58]
1%	-0.2 [-0.7; 0.3]	0.51 [0.47; 0.55]

450

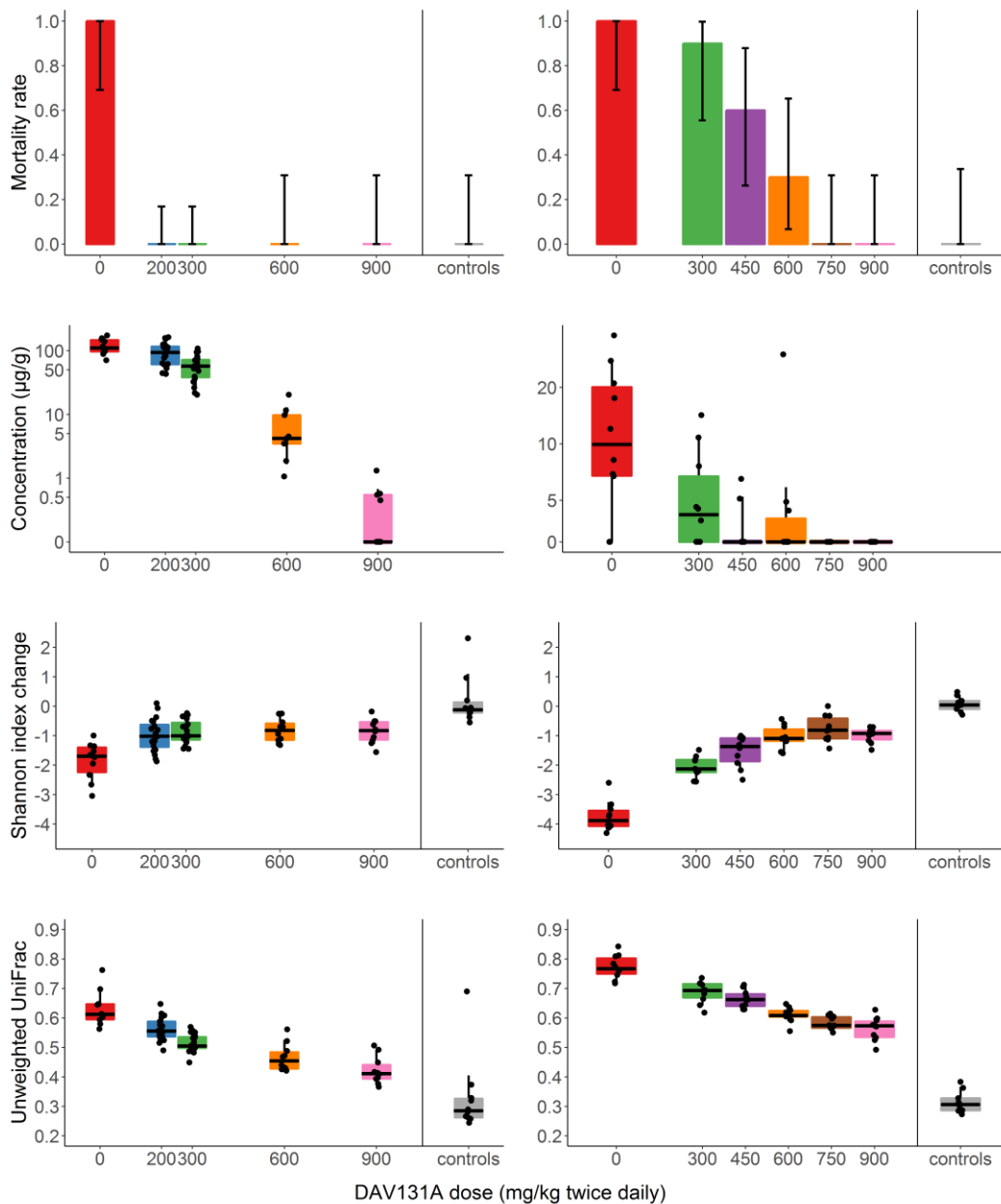
451 **Figures**

452 **Figure 1.** Experimental design of the studies. Male Syrian Golden hamsters were treated with
453 moxifloxacin (MXF, n=70) or clindamycin (CLI, n=60) once a day (OAD) by the subcutaneous route for
454 5 days and received various doses of DAV131A *bis in die* (BID) by the oral route for 8 days, that would
455 result in the exposition of the microbiota to various antibiotic concentrations and different bacterial
456 environment. Toxigenic strain of *C. difficile* UNT103-1 was inoculated at D3. Fecal samples were
457 obtained just before the beginning of treatment, and at the 3rd treatment day. Microbiota analysis was
458 performed by 16S rRNA gene sequencing on both samples, and fecal concentration of active antibiotic
459 was determined at D3 by microbiological assay. Survival was monitored up to D16.



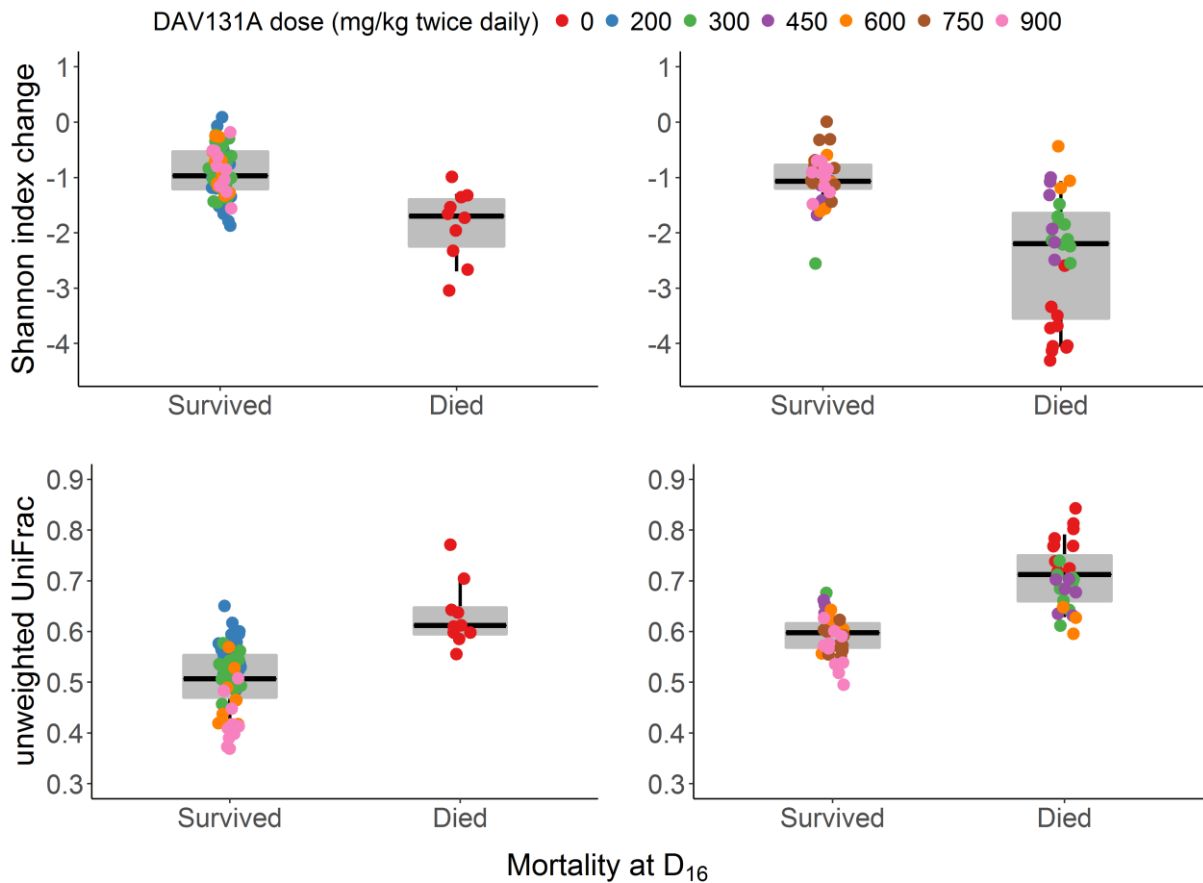
460

461 **Figure 2.** Mortality rate, fecal concentration of active antibiotic, change of Shannon index and
 462 unweighted UniFrac distance between D_0 and D_3 according to treatment group in the moxifloxacin (left
 463 panel) and clindamycin (right panel) studies. Barplots of the mortality rates are presented with their
 464 95% binomial confidence intervals. For concentrations, Shannon index and unweighted UniFrac
 465 distances, the boxes present the 25th and 75th percentiles and the horizontal black bar report the
 466 median value, while whiskers report 5th and 95th percentiles.



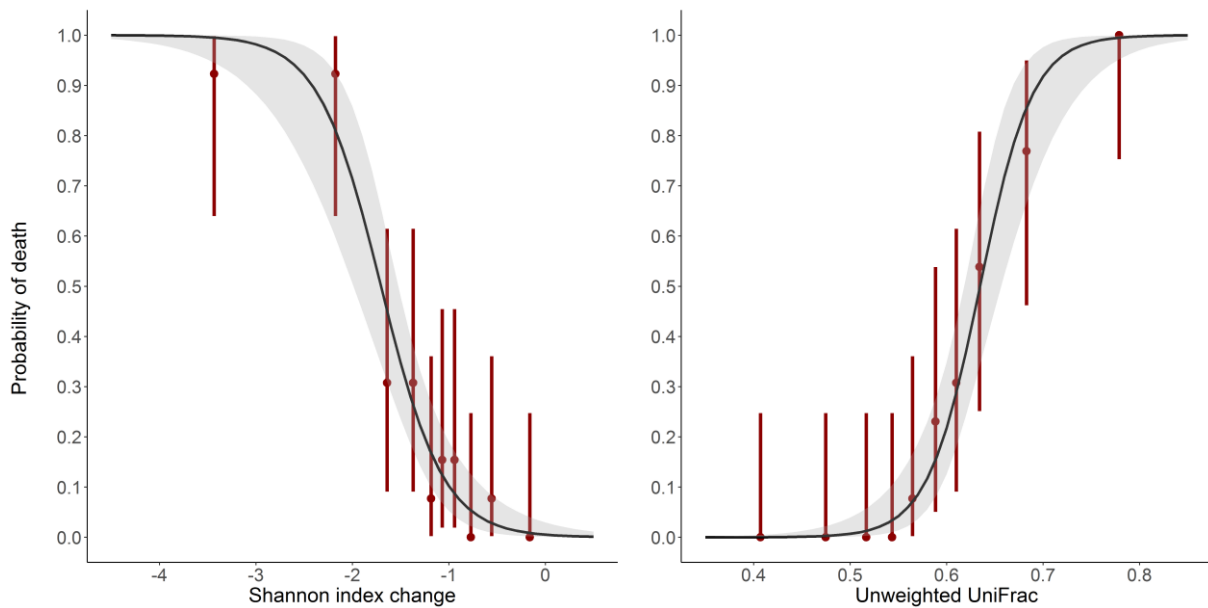
467

468 **Figure 3.** Change of Shannon index (top panel) and unweighted UniFrac distance (bottom panel)
 469 between D₀ and D₃ according to the occurrence of death by D₁₆ in the moxifloxacin (left panel) or
 470 clindamycin (right panel) study. The boxes present the 25th and 75th percentiles and the horizontal
 471 black bar report the median value, while whiskers report 5th and 95th percentiles.



472

473 **Figure 4.** Logistic models of mortality according to the change of Shannon index (left panel, $p < 10^{-15}$)
 474 and unweighted UniFrac distance (right panel, $p < 10^{-15}$) between D_0 and D_3 after pooling data from
 475 antibiotic-treated animals in the moxifloxacin and clindamycin studies. Red bars represent the
 476 mortality rates and their 95% confidence intervals of deciles of the observed diversity indices. The
 477 shaded area present the 95% confidence interval of the predicted probability of death.



478

479 **Supplementary Material**480 Supplementary Tables

481 **Supplementary Table 1.** Change of number of OTUs, change of Chao1 index, Bray-Curtis dissimilarity
 482 and weighted UniFrac distances between D₀ and D₃ according to treatment groups in the moxifloxacin
 483 and clindamycin studies. q-values refer to the comparison of the corresponding treatment group with
 484 the antibiotic + DAV131A placebo treatment group, after Benjamini-Hochberg correction. The p-values
 485 for the comparison of all treatment groups are reported in the “All groups” line. In the analysis of
 486 concentrations, only antibiotic-treated groups were included. Data are presented as n (%) or median
 487 (min; max) as appropriate.

Treatment group	n	Change of number of OTUs	q-value	Change of Chao-1 index	q-value	Bray-Curtis dissimilarity	q-value	Weighted UniFrac distance	q-value
Moxifloxacin									
controls	10	-5.75 (-97.6; 183.5)	-	-4.1 (-107.0; 190.1)	-	0.34 (0.28; 0.88)	-	0.14 (0.08; 0.48)	-
MXF/0	10	-135.85 (-207.3; -52.2)	-	-137.9 (-213.4; -46.2)	-	0.78 (0.63; 0.86)	-	0.33 (0.24; 0.48)	-
MXF/200	20	-89.75 (-201; 74.5)	0.044	-99.7 (-229.3; 83.5)	0.091	0.70 (0.57; 0.87)	0.0062	0.31 (0.20; 0.57)	0.53
MXF/300	20	-65.15 (-131.8; 63.8)	0.0036	-70.7 (-140.1; 75.0)	0.0025	0.56 (0.35; 0.72)	<10 ⁻⁴	0.24 (0.14; 0.40)	0.011
MXF/600	10	-65.5 (-129.1; -2.1)	0.0069	-66.6 (-141.0; -0.8)	0.0078	0.57 (0.41; 0.72)	0.00017	0.25 (0.15; 0.38)	0.1
MXF/900	10	-58.05 (-131.5; -7.4)	0.0056	-53.2 (-147.3; 6.0)	0.0091	0.47 (0.31; 0.67)	<10 ⁻⁴	0.22 (0.13; 0.36)	0.011
All groups	80	-72.9 (-207.3; 183.5)	<10 ⁻⁴	-75.5 (-229.3; 190.1)	<10 ⁻⁴	0.61 (0.28; 0.88)	<10 ⁻⁸	0.26 (0.08; 0.57)	0.00028
Clindamycin									
controls	9	24.7 (-2.1; 62.9)	-	27.1 (-3.0; 71.9)	-	0.38 (0.24; 0.45)	-	0.15 (0.09; 0.24)	-
CLI/0	10	-270.1 (-344.6; -220.0)	-	-274.0; -358.2; -218.7)	-	0.96 (0.87; 0.98)	-	0.60 (0.41; 0.62)	-
CLI/300	10	-195.5 (-242.6; -129.1)	0.00073	-201.3 (-252.7; -127.8)	0.0029	0.86 (0.71; 0.88)	<10 ⁻⁴	0.41 (0.36; 0.59)	0.00073
CLI/450	10	-137.1; -227.7; -87.3)	<10 ⁻⁴	-137.6 (-236.7; -90.0)	<10 ⁻⁴	0.83 (0.80; 0.85)	<10 ⁻⁴	0.40 (0.35; 0.45)	0.00016
CLI/600	10	-99.6 (-186.7; -33.6)	<10 ⁻⁴	-102.6 (-191.6; -34.3)	<10 ⁻⁴	0.76 (0.66; 0.79)	<10 ⁻⁴	0.30 (0.24; 0.35)	<10 ⁻⁴
CLI/750	10	-96.1 (-159.1; -22.0)	<10 ⁻⁴	-98.1 (-170.6; -22.7)	<10 ⁻⁴	0.70 (0.63; 0.74)	<10 ⁻⁴	0.28 (0.26; 0.39)	<10 ⁻⁴
CLI/900	10	-107.8 (159.5; -35.1)	<10 ⁻⁴	-116.1 (-163.3; -38.7)	<10 ⁻⁴	0.67 (0.61; 0.75)	<10 ⁻⁴	0.30 (0.24; 0.34)	<10 ⁻⁴
All groups	69	-129.1 (-344.6; 62.9)	<10 ⁻⁸	-132.8 (-358.2; 71.9)	<10 ⁻⁸	0.75 (0.24; 0.98)	<10 ⁻¹⁰	0.34 (0.09; 0.62)	<10 ⁻⁹

488

489 **Supplementary Table 2.** Spearman rank correlation coefficient between the fecal concentration of
 490 active antibiotic and the change of number of OTUs, the change of Chao1 index, the Bray-Curtis
 491 dissimilarity or the weighted UniFrac distances between D_0 and D_3 , in antibiotic-treated hamsters of
 492 the 2 studies. p-values are presented for the comparison of the Spearman rank correlation coefficient
 493 to 0.

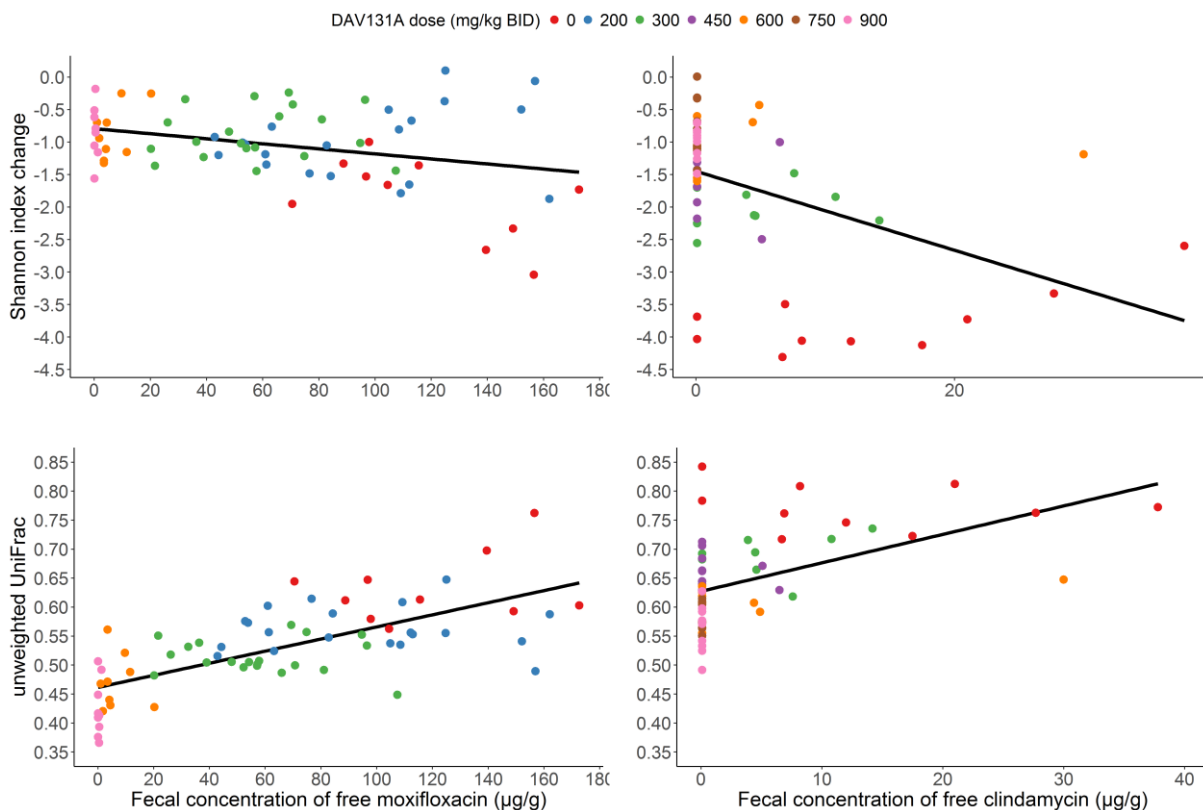
Antibiotic	n	Change of number of OTUs	Change of Chao-1 index	Bray-Curtis dissimilarity	Weighted UniFrac distance
Moxifloxacin	70	-0.24 (p=0.052)	-0.25 (p=0.043)	0.65 (p<10 ⁻⁸)	0.46 (p<10 ⁻⁴)
Clindamycin	60	-0.45 (p=0.00035)	-0.43 (p=0.00053)	0.53 (p<10 ⁻⁴)	0.46 (p=0.00018)

494

495 Supplementary Figures

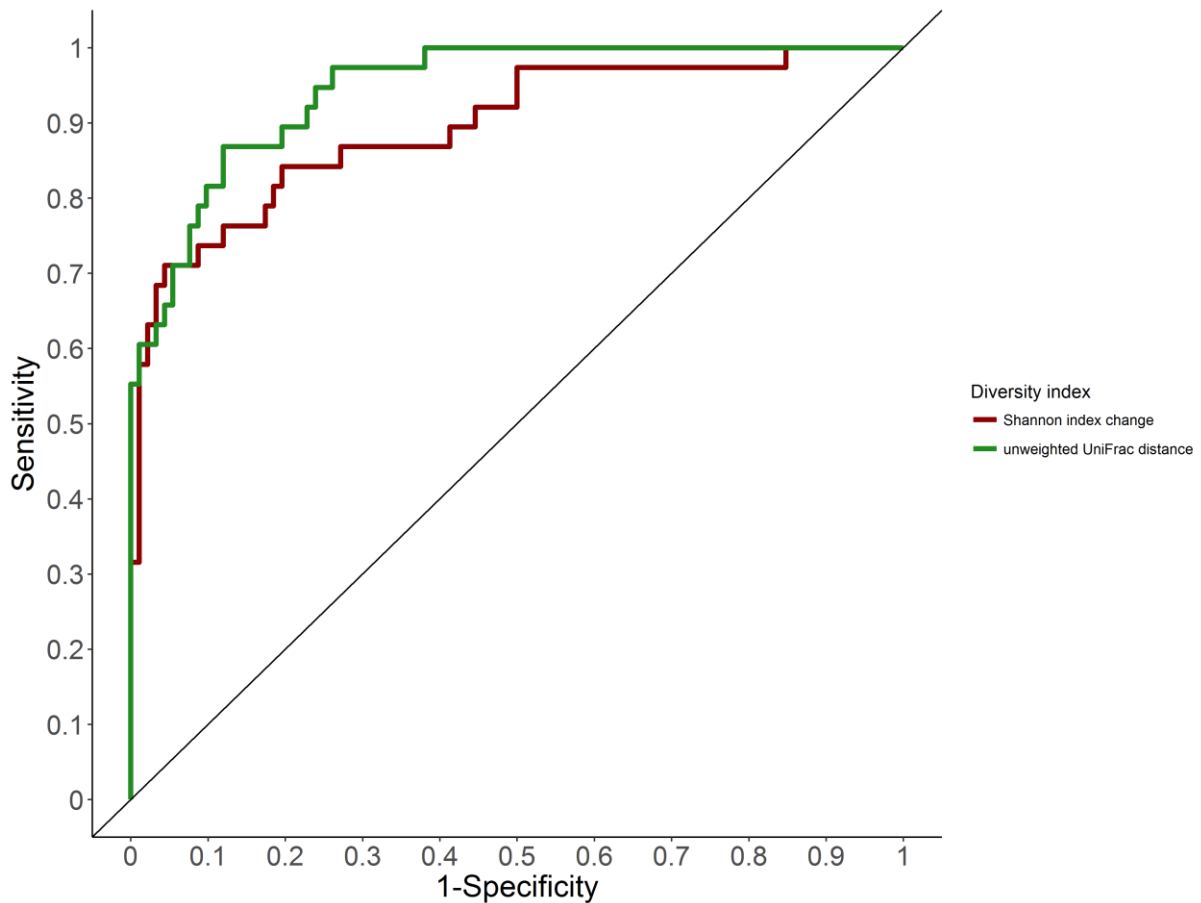
496 **Supplementary Figure 1.** Scatterplot of the evolution of the change of Shannon index (top panel) and
497 unweighted UniFrac distance (bottom panel) between D_0 and D_3 according to fecal concentration at
498 D_3 of active moxifloxacin (left) or clindamycin (right). Spearman rank correlation coefficients were -
499 0.25 ($p=0.043$) and 0.71 ($p<10^{-10}$) between the concentration of active moxifloxacin and the change of
500 Shannon index or the unweighted UniFrac distance, respectively. Correlation coefficients between the
501 concentration of active clindamycin and the change of Shannon index or the unweighted UniFrac
502 distance were -0.49 ($p<10^{-4}$) and 0.57 ($p<10^{-5}$), respectively. Black lines correspond to the linear
503 regressions of the diversity index according to the fecal concentration of antibiotic, estimated using
504 the least squares method.

505



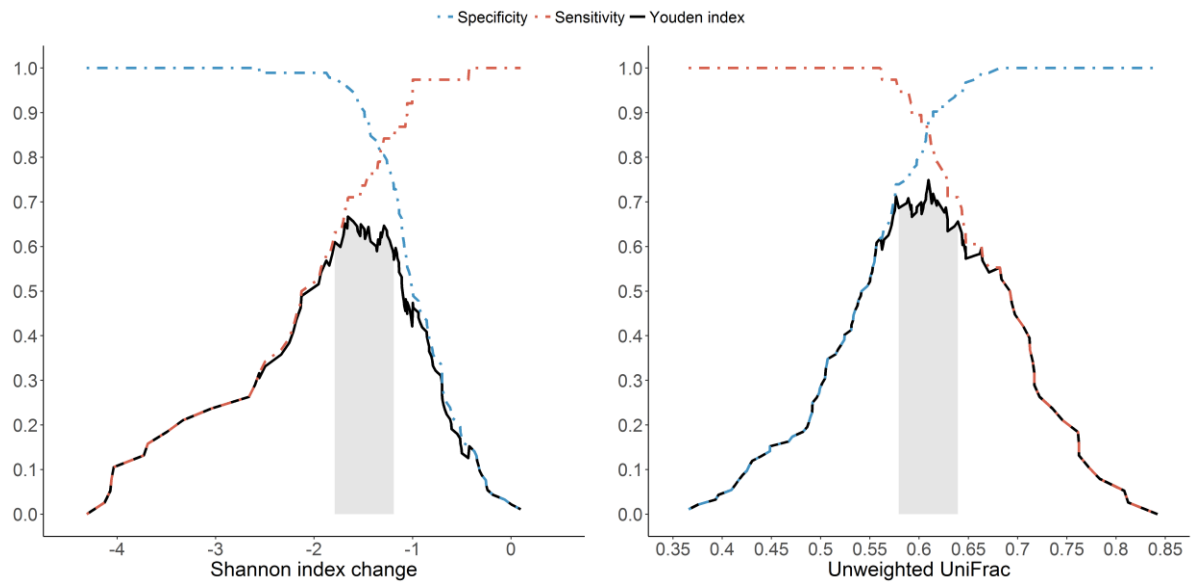
506

507 **Supplementary Figure 2.** Receiving operator curves for the change of Shannon index (red curve) and
508 unweighted UniFrac distance (green curve) between D_0 and D_3 after pooling data from antibiotic-
509 treated animals in the moxifloxacin and clindamycin studies. AUROC for the normalized Shannon index
510 was 0.89 [95%CI, 0.82; 0.95] and AUROC for the unweighted UniFrac distance was 0.95 [95%CI, 0.90;
511 0.98].



512

513 **Supplementary Figure 3.** Evolution of sensitivity, specificity and Youden index of the normalized
 514 change of Shannon index and unweighted UniFrac distance between D_0 and D_3 for prediction of death
 515 by D_{16} according to observed values of both diversity index, after pooling data from antibiotic-treated
 516 animals in the moxifloxacin and clindamycin studies. The grey shaded areas represent the 95%
 517 confidence intervals of the best cut-off values of both indices.



518

Chapitre 3. Exposition fécale, diversité et résistance bactériennes : analyses chez le volontaire sain

La dysbiose induite par l'administration d'antibiotiques est donc associée, au moins chez l'animal, à la sévérité de l'infection à *Clostridium difficile*, et ce selon une relation croissante. Un certain nombre de données publiées rendent compte de l'association chez l'homme entre la perturbation du microbiote intestinal et la survenue d'une infection à *Clostridium difficile*.

Afin de poursuivre les travaux existants concernant l'effet des antibiotiques sur le microbiote intestinal chez l'homme, et compte tenu de la nécessité de redéfinir l'impact que les antibiotiques exercent à l'aide des outils actuellement disponibles en bactériologie, nous avons exploité les données de deux essais cliniques randomisés ouverts, conduits en groupes parallèles. Dans ces essais, les sujets éligibles étaient des volontaires sains ayant un transit intestinal considéré normal, non exposés aux antibiotiques et non hospitalisés dans les mois précédant l'inclusion. Les études conduites chez le volontaire sain, et non chez des patients recevant une antibiothérapie dans le cadre du soin, s'éloigne de la pratique habituelle en recherche clinique. Cependant, afin de conclure sur l'effet propre des antibiotiques sur le microbiote intestinal, il est impératif que les sujets n'aient pas été exposés aux antibiotiques dans les mois qui précèdent l'administration du traitement, afin d'éviter les biais liés à l'effet d'une antibiothérapie préalable récente sur le microbiote intestinal.

Dans l'essai DAV132-CL-1002 « *Impact de l'administration de DAV132 7.5g trois fois par jour pendant 7 jours sur les concentrations fécales de moxifloxacine 400mg administrée oralement pendant 5 jours chez des volontaires sains* », nous avons analysé l'effet de la moxifloxacine sur le microbiote intestinal. La moxifloxacine était administrée pendant 5 jours par voie orale, à la dose de 400 mg par jour en une prise quotidienne. Cette dose est celle habituellement administrée en pratique clinique.

Dans l'essai Cérémi, « *Impact du choix des Céphalosporines de 3ème génération sur l'Émergence de la Résistance dans le Microbiote Intestinal* », nous avons comparé l'impact de la ceftriaxone et du céfotaxime sur le microbiote intestinal. Les deux antibiotiques ont été administrés par voie intraveineuse, au cours d'une perfusion de 30 minutes, pendant 3 jours. La ceftriaxone était administrée à la dose de 1 gramme par jour, et le céfotaxime était administré à la dose de 1 gramme toutes les 8 heures. Ces schémas posologiques sont ceux utilisés couramment en pratique clinique pour la majorité des infections non graves.

Ces deux essais ont été conduits au Centre d'Investigation Clinique de l'hôpital Bichat. Leur investigateur principal était le Pr Xavier Duval, et la responsable de la méthodologie était le Pr France Mentré.

1. Co-évolution de l'exposition aux antibiotiques et de la diversité bactérienne

1.1. Résumé

L'objectif principal de l'essai DAV132-CL-1002 était d'évaluer l'influence de l'administration de DAV132 sur les concentrations fécales de moxifloxacine libre entre le début du traitement et 16 jours après le début du traitement. DAV132 est un adsorbant à base de charbon actif, homologue du DAV131A utilisé dans le chapitre précédent, conçu pour être spécifiquement libéré au niveau de l'iléon terminal et du colon chez l'homme.

Dans cet essai, 44 volontaires sains ont été randomisés dans 4 groupes de traitement (moxifloxacine seule, n=14 ; moxifloxacine + DAV132, n=14 ; DAV132 seul, n=8 ; contrôle, n=8). DAV132 a été administré à la dose de 7.5 g toutes les 12 heures, pendant 8 jours. Plusieurs échantillons de plasma ont été recueillis à J1 et J5 pour la mesure des concentrations plasmatiques de moxifloxacine totale, et plusieurs échantillons de selles ont été recueillis entre J-15 et J37 pour la mesure de la concentration fécale de moxifloxacine libre et l'analyse métagénomique du microbiote intestinal. Les résultats de l'essai ont été récemment publiés (176). Brièvement, l'administration de DAV132 entraînait une réduction de 99% de l'exposition fécale à la moxifloxacine, sans impact sur les concentrations plasmatiques. Chez les sujets traités par moxifloxacine + DAV132, la richesse et la composition du microbiote intestinal étaient préservés de l'effet délétère de la moxifloxacine.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons exploité une partie des données de l'essai DAV132-CL-1002 pour développer un modèle mathématique semi-mécanistique permettant de décrire la coévolution de l'exposition plasmatique et de l'exposition fécale à la moxifloxacine, et de la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal. Les paramètres ont été estimés par modélisation non linéaire à effets mixtes à l'aide de l'algorithme SAEM, implémenté dans le logiciel MONOLIX. Les échantillons fécaux recueillis au screening, juste avant le début du traitement antibiotique, à J3, J6, J9, J16 et J37 ont été analysés par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S, et deux indices de diversité α ont été analysés : l'indice de diversité de Shannon, et le nombre observé de taxons bactériens.

Nous avons développé un modèle de la coévolution des concentrations plasmatiques et fécales de moxifloxacine (voir la section 4.1.1 du chapitre 1). Les concentrations plasmatiques de moxifloxacine totale étaient bien décrites par un modèle à 2 compartiments, avec des compartiments de transit pour modéliser le délai entre l'administration de la moxifloxacine et l'apparition de concentrations plasmatiques détectables. Les concentrations fécales de moxifloxacine libre ont été modélisées à l'aide de compartiments de transit entre le plasma et les fèces, avec une réabsorption de la moxifloxacine du compartiment fécal vers le compartiment plasmatique. La concentration fécale médiane (min ;

max) de moxifloxacine libre variait de 56.9 µg/g (21.7 ; 95.4) 24 heures après la première administration d'antibiotique à 130.4 µg/g (79.2 ; 250.6) au 5^{ème} jour de traitement. La demi-vie d'élimination de la moxifloxacine dans le compartiment fécal était 1.0 jour (0.76 ; 1.49).

Nous avons ensuite utilisé les paramètres pharmacocinétiques individuels estimés à partir du modèle pharmacocinétique final pour déduire les profils individuels de concentrations fécales au cours du temps. En supposant une réduction concentration-dépendante de la diversité dans le microbiote intestinal, nous avons utilisé un modèle de turnover pour décrire l'effet de la moxifloxacine sur la diversité et l'évolution des deux indices de diversité étudié (voir la section 4.1.2 du chapitre 1). L'évolution des deux indices de diversité était bien décrite par un modèle E_{max} , dans lequel les concentrations de moxifloxacine augmentent l'élimination de l'indice. Le meilleur modèle était un modèle dans lequel l' EC_{50} était identique pour les deux indices. Ce paramètre a été estimé à 0.1 µg/g (IC95%, 0.01 ; 2). La réduction maximale médiane (min ; max) de l'indice de Shannon était de 1.2 unités (0.8 ; 1.3), et celle du nombre de taxons était de 77 taxons (47 ; 100). Le délai médian pour que l'indice de Shannon retrouve 95% de sa valeur initiale était de 16.3 jours (8.7 ; 25.3), tandis que celui nécessaire pour le nombre de taxons était de 21.3 jours (13.3 ; 30.4).

Ce travail méthodologique a permis de montrer que l'évolution au cours du temps d'indices synthétiques de diversité au sein du microbiote peut être décrite de façon adéquate à l'aide de modèles mathématiques et de l'utilisation de modèles non linéaire à effets mixtes. Il s'agit là d'une analyse originale car l'évolution longitudinale de la diversité bactérienne mesurée par des méthodes de séquençage de nouvelle génération n'avait jamais été modélisée. C'est un résultat important car – outre une meilleure compréhension de l'effet des médicaments étudiés – ces modèles permettent le calcul précis de l'aire sous la courbe d'une réponse biologique en fonction du temps. Ce calcul nécessite habituellement un grand nombre d'échantillons, et l'utilisation de modèles mathématiques, par l'interpolation qu'ils permettent entre plusieurs observations, peut permettre de réduire la fréquence des prélèvements requis. Cette simplification peut s'avérer très utile notamment dans le contexte clinique, lorsque l'obtention de plusieurs échantillons par sujet est difficile ou coûteuse.

Un autre résultat important de ce travail est la mise en évidence d'une grande sensibilité du microbiote intestinal à la moxifloxacine. En effet, l' EC_{50} de la moxifloxacine a été estimée à 0.1 µg/g. Le manque de précision de cette estimation (IC95%, 0.01 ; 2) doit être mis en perspective avec les concentrations fécales très élevées de moxifloxacine observées, dès la première administration. Nous avons également pu observer que l'effet maximal de la moxifloxacine n'était pas le même sur les deux indices de diversité, suggérant que plusieurs indices de diversité doivent être étudiés simultanément pour rendre compte de l'effet global d'une intervention sur le microbiote intestinal.

Ce travail a été soumis pour publication dans *BMC Medical Research Methodology*.

1 1.2. Article 3

2 **Title**

3 Modelling the impact of antibiotic treatment on microbiome diversity over time

4 **Authors**

5 Charles Burdet (1,2), Thu Thuy Nguyen (1), Jean de Gunzburg (3), Stéphanie Ferreira (4), Annie Ducher
6 (3), Xavier Duval (1,2), Marina Varastet (3), Antoine Andremont (1), Jérémie Guedj (1), France Mentré
7 (1,2) and the DAV132-CL-1002 study group

8 (1) INSERM, IAME, UMR 1137, F-75018 Paris, France; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris,
9 France

10 (2) AP-HP, Bichat Hospital, Département d'Epidémiologie, Biostatistique et Recherche Clinique, Paris,
11 France

12 (3) Da Volterra, Paris, France

13 (4) Genoscreen, Lille, France

14 Members of the DAV132-CL-1002 study group include: Ait-Ilalne B, Alavoine L, Duval X, Ecobichon JL,
15 Ilic-Habensus E, Laparra A, Nisus ME, Ralaimazava P, Raine S, Tubiana S, Vignali V, all from the Center
16 of Clinical Investigation 1425 at Bichat hospital, Paris, France.

17 **Corresponding author**

18 Charles Burdet

19 Inserm UMR 1137 IAME

20 UFR de Médecine Bichat

21 16, rue Henri Huchard, 75018, Paris, France.

22 Tel : +33 1 57 27 75 35

23 Email : charles.burdet@inserm.fr

24 **Abstract**

25 Background

26 While the deleterious impact of antibiotic treatments on intestinal bacterial diversity has been well
27 studied, there is no quantitative description of the temporal changes in microbial diversity during and
28 after antibiotic treatment. We developed a mathematical model to characterize the impact of
29 antibiotic exposure on diversity of the intestinal microbiota.

30 Methods

31 We analysed the data of 22 healthy volunteers of a randomized clinical trial, among which 14 received
32 moxifloxacin (400 mg/day orally) from D1 to D5, and 8 did not receive any intervention and served as
33 controls. Total moxifloxacin plasma concentrations were measured at D1 and D5. Fecal samples were
34 collected before treatment and up to D37 for the measure of free moxifloxacin concentrations and
35 microbiota analysis by 16S rRNA gene profiling. Bacterial diversity was evaluated using the Shannon
36 index and the number of operational taxonomic units (OTUs). We developed a pharmacokinetic model
37 to characterize plasma and fecal concentrations over time, and a pharmacodynamic model to
38 characterize the impact of fecal moxifloxacin concentrations on bacterial diversity. Parameters were
39 estimated using nonlinear mixed-effects models.

40 Results

41 Moxifloxacin plasma concentrations were best described by a 2-compartment model with transit
42 compartments for absorption delay and linear elimination. Fecal concentrations were modeled using
43 transit compartments between plasma and feces, with reabsorption from the fecal compartment to the
44 central compartment. Fecal moxifloxacin concentrations increased the loss rate of each diversity index.
45 Baseline value of the Shannon index and number of observed OTUs were 4.75 (relative standard error,
46 r.s.e, 2%) and 163 (r.s.e 5%), respectively. Moxifloxacin had a highly variable effect on the diversity
47 indices with a median maximal reduction equal to 1.2 units (min;max, 0.8;1.3) and 77 OTUs (47;100) for
48 the Shannon index and the number of OTUs, respectively. The time needed to return to 95% of the pre-

49 treatment value was 16.3 days (8.7; 25.3) and 21.3 days (13.3; 30.4) for the Shannon index and the
50 number of OTUs, respectively.

51 Conclusions

52 This is the first mathematical model developed to characterize moxifloxacin-induced dysbiosis during
53 and after treatment. Mathematical analysis can be relevant to measure the impact of a therapeutic
54 intervention of the intestinal microbiota.

55 **Clinical Trials Registration**

56 NCT02176005

57 **Keywords**

58 moxifloxacin; intestinal microbiome; diversity; dysbiosis; metagenomics; pharmacokinetics;
59 pharmacodynamics; nonlinear mixed effect modelling

60 **Declarations**

61 Ethics approval and consent to participate

62 Subjects were included in this clinical trial after obtention of written informed consent to participate.
63 The study was carried out after authorizations from French Health Authorities and the Independent
64 Ethics Committee ("Comité de Protection des Personnes Ile-de-France IV," Paris, France) had been
65 obtained (January and February 2014, respectively).

66 Consent for publication

67 Not applicable

68 Availability of data and materials

69 The datasets used and analysed during the current study are available from the corresponding author
70 on reasonable request.

71 Competing interests

72 Annie Ducher and Marina Varastet are employees of the Da Volterra Company. Antoine Andreumont,
73 Charles Burdet, Jean de Gunzburg and France Mentré are consultants for the Da Volterra Company. Thu

74 Thuy Nguyen performed statistical work for the Da Volterra Company through a contract with INSERM
75 UMR 1137.

76 Funding

77 The randomized clinical trial was sponsored by Da Volterra (Paris) and funded in part by the European
78 Union Seventh Framework Programme (FP7-HEALTH-2011-single-stage) under grant agreement number
79 282004, EvoTAR.

80 Authors' contributions

81 JDG, AD, AA and FM designed the clinical trial.

82 AD, XD and MV performed the research. SF performed the metagenomic analysis.

83 CB, TTN, JG and FM performed the statistical analysis of the data.

84 CB, TTN, JDG, JG and FM wrote the paper. All authors agreed on the final version of the manuscript.

85 Acknowledgements

86 The authors thank the Da Volterra Company for providing the data.

87

88 **BACKGROUND**

89 The gastrointestinal tract is the location of the human body that contains the largest number and
90 greatest diversity of microbes: healthy humans harbor in their gut over 10^{14} bacterial cells from
91 hundreds of species, with large inter-individual diversity [1, 2]. A large body of data describes the role
92 of the intestinal microbiome in various host processes, including metabolic, nutritional and
93 immunological processes, although it remains challenging to identify the precise elements of the
94 microbiome that mediate these effects [3, 4]. Further, the intestinal microbiome provides an important
95 host-defense mechanism by inhibiting the growth in the intestines of potentially pathogenic
96 microorganisms (colonization resistance), either already present or exogenous [2]. A clear
97 demonstration of this phenomenon is provided by fecal microbiota transplantation, which is able to
98 restore resistance to colonization by *Clostridium difficile* [5].

99 These insights into the prominent role of the intestinal microbiome on human health have been unveiled
100 by the growing use of next generation sequencing technologies, and in particular their application to
101 16S ribosomal RNA (rRNA) gene profiling, which allowed to investigate the role in health and disease of
102 uncultivable bacteria. 16S rRNA gene profiling consists in sequencing a subset of the 9 hypervariable
103 regions of the bacterial genes encoding the 16S rRNA. The huge amount of sequences obtained can be
104 clustered into operational taxonomy units (OTUs), whose relative abundance in each sample can be
105 determined. OTUs are used for characterizing the composition of the bacterial community [6]. This
106 composition can be summarized for each sample using synthetic indices of diversity, such as the the
107 total number of observed OTUs, which characterizes its richness from an ecological perspective, or the
108 Shannon diversity index [7], which is a composite index taking into account the richness and the
109 evenness of taxa representation in the community.

110 One of the most dramatic causes of microbiome disruption, called dysbiosis, is the administration of
111 antibiotics [8-11]. This phenomenon enables colonization of the gut by resistant, opportunistic and
112 potentially pathogenic microbes [9, 12, 13]. Despite the numerous reports highlighting the role of the
113 intestinal microbiome in health maintenance and the deleterious effect of antibiotics on its equilibrium,

114 we still lack of a precise longitudinal description of intestinal microbiome perturbations during and after
115 antibiotic treatments [14].

116 One of the main difficulties in analyzing longitudinal microbiome data is the high level of both
117 interindividual and intraindividual variability. This difficulty can be in part circumvented by the use of
118 mixed effect models. By using all the information available from a dataset and building semi-mechanistic
119 mathematical models of the interaction between the treatment and the bacterial population, this
120 statistical approach allows to estimate model parameters, including interindividual variability, even in
121 the case of sparse data, as done frequently in the field of pharmacokinetics/pharmacodynamics [15].
122 This approach has been used for instance to describe the effect of antibiotic on reducing the bacterial
123 growth rate or on increasing their death rate [16-18]. Further, by using mathematical models to
124 reconstruct the full time-dependent process of bacterial dynamics, one can also calculate global metrics
125 of antibiotic pharmacokinetics and pharmacodynamics, such as the cumulated diversity in a given
126 period. In addition, these methods avoid the intensive sampling strategy required to compute precisely
127 areas under the curve, which could be very valuable as the collection of fecal samples for metagenomic
128 analysis can be challenging and expensive in a clinical setting.

129 These models cannot be directly applied to diversity indices, as the latter are synthetic indices. However,
130 the response of biomarkers following treatment administration is commonly analyzed using turnover
131 models [19]. In these semi-mechanistic models, the biomarker is assumed to be produced at a constant
132 rate and eliminated from the body with a first-order rate, and the drug modulates either its production
133 or its elimination rate.

134 Here, we propose to use this approach to characterize bacterial diversity indices obtained through
135 metagenomic analysis of the intestinal microbiome. Using longitudinal data from a clinical trial
136 performed in healthy volunteers, we developed a semi-mechanistic mathematical model of intestinal
137 microbiome diversity to characterize the dysbiosis observed during and after antibiotic treatment.

138 **METHODS**

139 **Patients**

140 We used data from the CL-1002 trial (NCT02176005), a prospective, open label, randomized clinical trial
141 conducted in 2014 at the Clinical Investigation Center of the Bichat hospital, Paris (France) (see more
142 details on the study in [20]). We here focused on 22 subjects of this trial that received moxifloxacin alone
143 (n=14) or were not treated (negative control group, n=8) and on a new fecal microbiome analysis based
144 on 16S rRNA gene profiling.

145 **Healthy volunteers and sample collection**

146 In the CL-1002 trial, human healthy volunteers over 18-year-old who had not been exposed to antibiotics
147 in the preceding 3 months were prospectively included after obtention of their informed consent.

148 Subjects in the moxifloxacin group received 400 mg of moxifloxacin by the oral route, once a day for 5
149 days (from D1 to D5). Subjects were followed up until D37.

150 Blood samples were collected on D1 (just before treatment administration and at 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 3h,
151 4h, 6h, 12h, and 24h post administration) and at the last day of treatment, *i.e.* on D5 (just before
152 treatment administration and at 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 24h, 32h, 48h, 56h, and 72h post
153 administration). Total plasma moxifloxacin concentrations were determined by reverse phase HPLC
154 coupled with fluorescence detection (limit of quantification, 0.01 µg/mL).

155 Fecal samples were collected at screening (between D-21 and D-3), just before the first administration
156 of moxifloxacin (baseline), once a day from D2 to D9, and then at D12, D16, D37. Fecal concentrations
157 of free moxifloxacin were determined on samples from baseline to D16 by tandem mass spectrometry
158 detection (limit of quantification, 0.04 µg/g).

159 **Targeted metagenomic analysis of the intestinal microbiota**

160 Fecal samples from screening, baseline, D3, D6, D9, D16 and D37 were analysed by 16S rRNA gene
161 profiling. Microbial DNA was extracted using an extraction protocol optimized at GenoScreen, partially
162 based on commercially available extraction kits (QIAamp DNA stool Kit, Qiagen, Germany) with the
163 addition of chemical and mechanical lysis steps.

164 The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was then amplified using an optimized and standardized
165 amplicon-library preparation protocol (Metabiote®, GenoScreen, Lille, France). Positive (Artificial

166 Bacteria Community comprising 17 different bacteria, ABCv2) and negative (sterile water) controls were
167 also included. Briefly, PCR reactions were performed using 5 ng of genomic DNA and in-house fusion
168 barcoded primers (final concentrations of 0.2 μ M), with an annealing temperature of 50°C for 30 cycles.
169 PCR products were purified using Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA,
170 USA), quantified according to GenoScreen's protocol, and mixed in an equimolar amount. Sequencing
171 was performed using 250-bp paired-end sequencing chemistry on the Illumina MiSeq platform (Illumina,
172 San Diego, CA, USA) at GenoScreen.

173 Raw paired-end reads were then demultiplexed per sample and subjected to the following process: (1)
174 search and removal of both forward and reverse primer using CutAdapt, with no mismatches allowed in
175 the primers sequences; (2) quality-filtering using the PRINSEQ-lite PERL script [21], by truncating bases
176 at the 3' end with Phred quality score <30; (3) paired-end read assembly using FLASH [22], with a
177 minimum overlap of 30 bases and >97% overlap identity.

178 Diversity analysis was performed using the Metabiote Online v2.0 pipeline (GenoScreen, Lille, France)
179 which is partially based on the QIIME software v1.9.1 [23]. Following the steps of pre-processing,
180 chimera sequences were detected and eliminated (in-house method based on Usearch v6.1). Then,
181 clustering of similar sequences (97% identity threshold for an affiliation at the genus level on the V3-
182 V4 regions of the 16S rRNA gene) was performed with Uclust v1.2.22q [24] through an open-reference
183 OTU picking process and complete-linkage method, finally creating groups of sequences or
184 "Operationnal Taxonomic Units" (OTUs). An OTU cleaning step corresponding to the elimination of
185 singletons was performed.

186 **Indices of bacterial diversity**

187 Diversity in each fecal sample was estimated using 2 indices of diversity, the Shannon diversity index
188 and the number of observed OTUs. The Shannon diversity index was computed as $S =$
189 $-\sum_{i=1}^n p_i \times \log(p_i)$, where p_i is the relative abundance of the OTU i and n is the number of unique
190 OTUs observed in each sample following the clustering step described above. Both indices were
191 computed using QIIME [23].

192 **Mathematical model**

193 We developed mathematical models based on ordinary differential equations in order to 1) analyze
194 the evolution of plasma and fecal concentrations of moxifloxacin, and 2) to evaluate the impact of
195 these evolutions on bacterial diversity.

196 In order to model the pharmacokinetics of total moxifloxacin in plasma, both one- and two-
197 compartment(s) models with first order absorption and first order elimination were tested. The
198 absorption delay of moxifloxacin in the central compartment was modelled using either a lagtime or
199 transit compartments [25]. We assumed an absolute bioavailability of moxifloxacin of 100% [26].

200 Moxifloxacin elimination from the central compartment was divided into an intestinal elimination and
201 an extra-intestinal elimination, both being assumed to have first order rates. Several structural models
202 with various numbers of transit compartments between plasma and feces were tested. As
203 enterohepatic recirculation had been reported for fluoroquinolones [27], we also tested several
204 models for moxifloxacin reabsorption, occurring either from one of the transit compartments between
205 plasma and feces or from the fecal compartment to the plasma compartment.

206 We modelled the effect of fecal concentrations of free moxifloxacin in reducing the bacterial diversity
207 in feces, using semi-mechanistic turnover models [19]. Applying these models to the present work, the
208 evolution of the diversity index D in the absence of the drug can be written as:

$$209 \quad \frac{dD}{dt} = R_{in} - k_{out} \times D$$

210 where R_{in} is a zero-order constant for the production of the diversity, and k_{out} is a first-order rate
211 constant for elimination of diversity. At steady state, $\frac{dD}{dt} = 0$, and thus $D_0 = \frac{R_{in}}{k_{out}}$ in the absence of
212 treatment or perturbation. The initiation of antibiotic treatment perturbs this equilibrium and can alter
213 either lead to a reduction of R_{in} (R'_{in} , equation 1) or to an increase of k_{out} (k'_{out} , equation 2):

$$214 \quad R'_{in} = \left(1 - \frac{I_{max} \times C_f}{IC_{50} + C_f}\right) \times R_{in} \text{ (equation 1)}$$

$$215 \quad k'_{out} = \left(1 + \frac{E_{max} \times C_f}{EC_{50} + C_f}\right) \times k_{out} \text{ (equation 2)}$$

216 with C_f being the fecal concentration of free moxifloxacin, I_{max} the maximal reduction of R_{in} , and
 217 IC_{50} the concentration leading to 50% of the maximal effect of moxifloxacin, E_{max} the maximal
 218 increase of k_{out} , and EC_{50} the concentration leading to 50% of the maximal effect of moxifloxacin.

219 **Statistical model**

220 Nonlinear mixed effects models were used to analyse the different markers followed over time. A
 221 nonlinear mixed effects model for multiple responses is defined as follows. Let y_i denote the vector of
 222 observations for all responses and y_{ik} the vector of observations for the k^{th} response (e.g., $k = 1$
 223 corresponds to plasma, $k = 2$ to feces, etc.) for the individual i . Let f denote the global structural
 224 model characterizing all responses, based on a system of ordinary differential equations, similar for
 225 all individuals. Then one can define $y_{ik} = f_k(\theta_i, \xi_{ik}) + \varepsilon_{ik}$, where f_k is the component of the global
 226 model f describing the k^{th} response, θ_i is the vector of individual parameters, ξ_{ik} is the vector of n_{ik}
 227 sampling times and ε_{ik} is the vector of residual errors for the k^{th} response in individual i . Each
 228 individual parameter θ_i can be decomposed as a fixed effect μ , which represents the mean value of
 229 the parameter in the population, and a random effect $b_i \sim \mathcal{N}(0, \Omega)$ where Ω accounts for the
 230 interindividual variability. Assuming an exponential random effect model, the individual parameters
 231 are modeled as: $\theta_i = \mu \times e^{b_i}$.

232 Lastly we assumed that $\varepsilon_{ik} \sim \mathcal{N}(0, \Sigma_{ik})$ where Σ_{ik} is a $n_{ik} \times n_{ik}$ -diagonal matrix with k^{th} elements
 233 equal to $(\sigma_{inter,k} + \sigma_{slope,k} \times f_k(\theta_i, \xi_{ik}))^2$, with $\sigma_{inter,k}$ being the parameter for the additive part and
 234 $\sigma_{slope,k}$ the parameter for the proportional part of the variance error model. Constant ($\sigma_{inter,k} \neq 0$,
 235 $\sigma_{slope,k} = 0$), proportional ($\sigma_{inter,k} = 0$, $\sigma_{slope,k} \neq 0$) or combined ($\sigma_{inter,k} \neq 0$, $\sigma_{slope,k} \neq 0$) variance
 236 error models were tested for each response k .

237 **Parameters estimation**

238 Estimation of population parameters was performed using the stochastic approximation expectation
 239 maximisation algorithm (SAEM) [28] with 10 Markov chains, implemented in MONOLIX v4.3.2 (Lixoft,
 240 Orsay, France, www.lixoft.eu), a software devoted to parameter estimation by maximum likelihood in
 241 nonlinear mixed effect models. This algorithm handles data below the limit of quantification [29]. It

242 was for instance used to analyse viral load data under HCV treatment or joint model in oncology [30,
243 31].

244 First, we analysed total concentrations of moxifloxacin in plasma, then both total plasma and free fecal
245 concentrations in moxifloxacin-treated subjects. Fecal weight was fixed to 200 g in all subjects. Then,
246 individual pharmacokinetic parameters were estimated as the maximum of the *a posteriori*
247 distribution, also called empirical Bayes estimates, and used to predict individual pharmacokinetic
248 profiles. We used individual predicted fecal concentrations in the analysis of the diversity indices in
249 moxifloxacin-treated subjects, and assumed the diversity indices were stable in the absence of
250 moxifloxacin treatment. The two studied diversity indices were fitted simultaneously using data from
251 moxifloxacin-treated subjects and controls, with a similar structural model for the effect of fecal
252 concentration of free moxifloxacin on the 2 indices. As both indices were related to similar physical
253 quantity, we also tested a simplified model assuming that they shared the same IC_{50} or EC_{50} .

254 For fixed effects, in case of high relative standard error (r.s.e.) (>60%), we computed the 95%
255 confidence interval of the parameter by likelihood profiling [32]. The profile likelihood function was
256 obtained by fixing the parameter of interest at different values within a chosen range, and by
257 maximizing the likelihood over the other parameters. The 95% confidence interval was deduced from
258 the asymptotic χ^2 distribution with 1 degree-of-freedom. For random effects, in case of low estimated
259 standard deviation (<0.1) and high relative standard error, parameter variability was set to 0.

260 Finally, in order to draw the evolution of plasma and fecal concentration of moxifloxacin, and of the
261 two studied diversity indices, we performed Monte Carlo simulations using the final pharmacokinetic
262 and pharmacodynamic models. We simulated 10'000 vectors of random effects using the estimated
263 distribution of the parameters and predicted the individual profiles of the Shannon index and number
264 of OTUs over time for a 5 day course of 400 mg/day of moxifloxacin.

265 **Model selection and evaluation**

266 At each step, the best model was chosen using the Bayesian information criteria (BIC), derived for each
267 model from the likelihood computed by importance sampling with 2.10^5 iterations [28]. Model

268 evaluation was conducted by investigating several goodness-of-fit plots: individual fits, plots of
269 predictions versus observations, distribution of the individual weighted residuals (IWRES) and
270 normalized prediction distribution errors (NPDE) versus time and versus model predictions, as well as
271 the visual predictive check (VPC). NPDE and VPC were generated using 500 Monte Carlo simulations.

272 **Computation of derived parameters**

273 Derived parameters were computed for each subject i treated by moxifloxacin using the individual
274 parameters.

275 Using the pharmacokinetic model, we computed the mean residence time of moxifloxacin in the
276 compartment k ($k = \{1,2\}$, with 1 is the plasma and 2 is the feces) at steady state as: $MRT_{ik} = \frac{AUMC_{ik}}{AUC_{ik}}$.

277 Let $C_{ik}(t)$ be the function depicting the evolution of the concentration of moxifloxacin over time in

278 the compartment k , then $AUMC_{ik} = \int_{t=0}^{\infty} C_{ik}(t) t dt$ is the area under the first moment curve of the

279 concentration of moxifloxacin in the compartment k over time at steady state and $AUC_{ik} =$

280 $\int_{t=0}^{\infty} C_{ik}(t) dt$ is the area under the curve of the concentration of moxifloxacin in the compartment l

281 over time at steady state. The elimination half-life from compartment k was computed as: $t_{1/2,ik} =$

282 $MRT_{ik} \times \log(2)$. The mean transit time between the plasma and fecal compartments ($MTT_{pf,i}$) was

283 computed as $MTT_{pf,i} = \sum_{l=1}^L \frac{1}{k_{t,il}}$, where $k_{t,il}$ is the first order elimination rate for the L compartments

284 identified between the plasma and the fecal compartments.

285 We determined the maximal loss of each bacterial diversity index in the intestinal microbiome after

286 the beginning of treatment (nadir) and the time for which this maximal loss was achieved (time to

287 nadir). We then determined the time at which each diversity index returned to 95% of its baseline

288 value.

289 We finally quantified the impact of moxifloxacin on diversity by computing the area under the curve

290 for each diversity index up to 42 days after the beginning of treatment ($AUC_{D,i}$). This metric takes into

291 account both the extent of the loss of diversity following moxifloxacin administration, and the duration

292 of the dysbiosis. This period was chosen because the risk of developing severe antibiotic-associated

293 diarrhea such as *Clostridium difficile* colitis has been reported to be maximal in the first few weeks
294 following antibiotic administration [33]. It was computed as:

$$295 \quad AUC_{D,i} = \int_{t=0}^{42} (D_i(t) - D_{i0}) dt$$

296 where $D_i(t)$ is the function depicting the evolution of the diversity index over time and D_{i0} is the value
297 of the diversity index at baseline for the subject i and t is in days.

298 **RESULTS**

299 Within the 22 volunteers included in the analysis, median age was 33.2 years (min; max 23.3; 59.5) and
300 8 were males (36.4%). Full characteristics of included subjects can be found in [20].

301 **Pharmacokinetic model of moxifloxacin in plasma and feces**

302 A total of 322 values of total moxifloxacin plasma concentration and 138 values of fecal concentration
303 of free moxifloxacin were collected in the 14 treated patients (see Supplementary Figure S1).
304 Moxifloxacin was still detectable in plasma 3 days after the last administration, and in feces free
305 moxifloxacin was detectable up to 10 days after the last administration.

306 Plasma concentrations were best described by a two-compartment model with first order elimination
307 and first order absorption using transit compartments to model the absorption delay (Figure 1). A
308 compartmental model including two transit compartments between plasma and feces best fitted the
309 fecal data, with enterohepatic recirculation of moxifloxacin from the fecal compartment to the plasma
310 compartment (Figure 1). The mathematical expression of the final model is presented in Supplementary
311 Text S1, and the evolution of moxifloxacin concentration in plasma and feces is presented in Figure 2
312 (panels A and B).

313 Nearly all parameters of the pharmacokinetic model could be estimated with a reasonable precision,
314 relative standard errors (r.s.e.) being below 30% for fixed effects and 40% for variabilities (Table 1).
315 Absorption related parameters (noted k_{tr} and k_a , see Figure 1) had higher relative standard errors and
316 should therefore be interpreted with caution. The model well characterized the concomitant evolution
317 of both plasma and fecal concentrations of moxifloxacin over time (Figure 3). Other goodness-of-fit plots

318 for this pharmacokinetic model were satisfactory, showing good adequacy between observations and
319 predictions, the residuals were centered to zero and did not show any trend over time or model
320 predictions (Supplementary Figure S2). The VPC did not show any model misspecification
321 (Supplementary Figure S3).

322 Moxifloxacin mean volume of distribution V was estimated to 99.6 L (r.s.e., 6%). The mean
323 extraintestinal elimination rate of moxifloxacin k_e was equal to 1.63 day⁻¹ (r.s.e., 4%), and the mean
324 intestinal elimination rate of moxifloxacin k_{ct1} was equal to 0.21 day⁻¹ (r.s.e., 10%) (Table 1).

325 Among the 14 subjects treated with moxifloxacin, the median (min; max) concentration of free
326 moxifloxacin in feces observed 24 hours after the first administration of moxifloxacin was 56.9 µg/g
327 (21.7; 95.4), and increased up to 130.4 µg/g (79.2; 250.6) on the 5th day of treatment. Median elimination
328 half-lives from the plasma and fecal compartments were 0.53 day (0.43; 0.67) and 1.0 day (0.76; 1.49),
329 respectively. The median transit time of moxifloxacin between plasma and feces was 0.59 days (0.35;
330 1.23). The median time for fecal concentrations of free moxifloxacin to be below the limit of
331 quantification (<0.04 µg/g) was 14.1 days (11.7; 19.3).

332 **Pharmacodynamic model of intestinal diversity**

333 A total of 142 samples were analysed by 16S rRNA gene profiling (90 in subjects treated by moxifloxacin
334 and 52 in controls). Individual profiles of the Shannon index and number of OTUs are presented in
335 Supplementary Figure S4. Both indices rapidly dropped after initiation of moxifloxacin treatment and
336 slowly returned towards their baseline value after treatment cessation, whereas they were stable in
337 controls. The kinetics of the 2 indices were best fitted by a model in which the elimination of bacterial
338 diversity from feces was increased by moxifloxacin using an E_{max} model and the two diversity indices
339 shared the same EC_{50} (Figure 1 and Supplementary Text S1), found equal to 0.13 µg/g of feces, with a
340 relative standard error of about 140%, and a large interindividual variability (470%, see Table 2). Due to
341 the poor precision for the estimated mean value of this parameter, we estimated its 95% confidence
342 interval by likelihood profiling: [0.01 µg/g; 2 µg/g] (Supplementary Figure S5). Other parameters of the
343 pharmacodynamic model were well estimated (Table 2). The individual fits of this model were

344 satisfactory (Figure 4), as well as the other goodness of fit plots (Supplementary Figure S6 and
345 Supplementary Figure S7). The evolution of the Shannon index and of the number of OTUs is presented
346 in Figure 2 (panels C and D).

347 At baseline, in the absence of antibiotic perturbation, the mean value S_0 of the Shannon index was equal
348 to 4.75 Shannon units (r.s.e., 2%), and the mean value OTU_0 was equal to 163 OTUs (r.s.e., 5%).
349 Interindividual variability on both indices was estimated to relatively low values (Table 2). The maximal
350 effect of moxifloxacin was a 38% (r.s.e. 14%) increase of the Shannon index elimination rate, and a 94%
351 (r.s.e., 4%) increase of the elimination rate of the number of OTUs.

352 Pharmacodynamic indices derived from the model for the 14 subjects treated by moxifloxacin are
353 presented in Table 3 and Supplementary Figure S8. A median loss of 0.6 units of Shannon index (0.3; 0.7)
354 and 26 OTUs (11; 41) was achieved at 24 hours after the beginning of treatment.

355 **DISCUSSION**

356 In the present work, we aimed to evaluate the ability of semi-mechanistic models to characterize the
357 evolution over time of synthetic indices of global bacterial diversity in the intestinal microbiome. Using
358 nonlinear mixed effects models to analyse longitudinal data in all subjects, we were able to estimate
359 mean values and interindividual variability with satisfactory precision for almost all parameters.

360 Despite the complexity of the measures done, relying on metagenomic analysis targeted to the 16S rRNA
361 gene, relatively simple mathematical models provided satisfactory description of variation in time of
362 the diversity indices within the intestinal microbiome. In our model, diversity indices were considered
363 as biomarkers, whose elimination rate are increased by antibiotic exposure in a concentration-
364 dependent manner. Such models are very appealing considering their simplicity and are widely used in
365 the field of pharmacometrics. They also allow to compute precisely the area under the curve of the
366 bacterial diversity over time, a metric which allows a global view of antibiotics impact on the microbiota
367 as it takes into account both the extent and the duration of dysbiosis. Coupled with the use of mixed-
368 effect modelling, this approach allowed to estimate the global dysbiosis of the intestinal microbiome
369 following an antibiotic treatment, even in the case of sparse data, and to better characterize

370 interindividual variabilities. This might prove to be very useful as microbiome data on multiple days are
371 usually difficult to obtain reliably in the clinical context. A limited number of samples per patient could
372 thus be sufficient to adequately describe the effect of an intervention on the microbiome and to
373 compute metrics for global dysbiosis of the microbiome over various time periods. In addition, such an
374 approach is attractive for comparing the impact of various treatment strategies by simulation.

375 The pharmacokinetic study revealed that fecal concentrations of moxifloxacin rapidly reached a high
376 plateau value, and their decrease after treatment cessation was rather slow. Indeed, we could infer
377 from the pharmacokinetic model that fecal concentrations of free moxifloxacin increased up to 56.9
378 $\mu\text{g/g}$ (21.7; 95.4) 24 hours after the first administration, and increased up to 130.4 $\mu\text{g/g}$ (79.2; 250.6)
379 on the 5th day of treatment. Fecal concentrations slowly decreased afterwards, being higher than 2
380 $\mu\text{g/g}$ up to 4.7 days (2.9; 8.4) after the last administration of moxifloxacin. This is concerning as
381 previous observations from our group suggested that the time period during which antibiotic
382 concentration decreases in feces after the end of treatment is critical for the emergence of
383 fluoroquinolone-resistant strains within the fecal flora [34]. This slow decrease may partly be explained
384 by the pronounced enteric recycling after systemic intake [27]. Interestingly, the structural model of
385 moxifloxacin plasma and fecal pharmacokinetics included a reabsorption of moxifloxacin from the fecal
386 compartment into the central compartment. This is in line with a previous study performed in patients
387 undergoing gastro-intestinal surgery who received moxifloxacin as preoperative antibioprophyllaxis
388 [35]. In this study, authors observed that moxifloxacin concentrations within the colonic mucosa were
389 higher than those measured in the small bowel mucosa, thereby providing biological support to our
390 mathematical model. This reabsorption process might explain the longlasting fecal excretion observed
391 after treatment cessation.

392 From this work, we can estimate that the intestinal microbiome is highly susceptible to moxifloxacin.
393 Initiation of treatment led to a rapid decrease of diversity within the microbiome, with a median loss of
394 0.6 units of Shannon index (0.3; 0.7) and 26 OTUs (11; 41) 24 hours after the beginning of treatment.
395 This rapid impact of moxifloxacin is related to the small value of the EC_{50} parameter. Although it could

396 not be estimated with a satisfactory precision (relative standard error of 140%), we determined that its
397 95% confidence interval was [0.01 µg/g; 2 µg/g]. This rather large range of values (1:100 ratio) should
398 be interpreted in the light of the fecal concentration of moxifloxacin obtained following treatment with
399 a clinical dose. Indeed, fecal concentration of free moxifloxacin were above the upper bound of this 95%
400 confidence interval as soon as 5 hours after the first administration of moxifloxacin, and stayed above
401 this value up to 10 days after the last administration.

402 Interestingly, the maximal effect of moxifloxacin was different on the two diversity indices. We
403 estimated a 27.5% maximal loss of the baseline value of the Shannon index, while the estimated maximal
404 loss of the number of OTUs was estimated to 47.4% of its baseline value. Both indices had different
405 times to return to 95% of their baseline values after treatment cessation: 16.3 days for the Shannon
406 index and 21.3 days for the number of OTUs. The Shannon index refers to the evenness of the bacterial
407 community within the microbiome, whereas the number of OTUs is a direct measure of its richness.
408 From this result we can infer that although being both indices of diversity, an intervention can exhibit a
409 different impact, depending on the diversity index studied. We thus believe that microbiome studies
410 should include several indices of diversity, in order to draw a complete picture of the microbiome
411 dysbiosis induced by the intervention.

412 Our work has some limitations. The main one is that only healthy subjects were included. Model
413 parameters, in particular interindividual variability of the pharmacodynamic parameters but also
414 possibly gut microbiota, could differ in clinical context. However, we aimed here at developing a
415 mathematical model relating antibiotic individual exposure and subsequent dysbiosis. We could
416 precisely estimate most parameters, thereby providing evidence that mathematical models can
417 adequately depict the time course of complex data summarized in a synthetic index. Another limitation
418 is that we could not model the evolution of each specific OTUs over time. This would be very valuable
419 for providing a deeper insight on the impact of moxifloxacin treatment on the microbiome. Such
420 analysis was prevented by the small number of subjects included in the analysis and by the high
421 correlation existing between the relative abundance of the OTUs. Furthermore, next generation

422 sequencing only provides relative abundances, whereas absolute counts of each OTUs would be
423 necessary to apply usual pharmacodynamics models of antibiotic effect. To that end, coupling data
424 from next generation sequencing together with flow cytometric counts of bacterial cells has recently
425 been proposed for obtaining quantitative data of microbiome profiling [36].

426 In spite of these limitations, we believe that we provide here a structural framework for refining
427 the impact of antibiotics on the intestinal microbiome. Diversity indices obtained through next
428 generation sequencing offer a simplified view of the dynamics of the bacterial community within the
429 microbiome, and mathematical modeling allowed to precisely estimate the global dysbiosis induced
430 by moxifloxacin. This encourages to extend these results to the clinical setting for estimating the
431 unwanted effects of drugs on the microbiome.

432 **CONCLUSION**

433 We present here the first model of the evolution of bacterial diversity within the intestinal microbiome
434 over time, following an antibiotic perturbation. We used a powerful approach that takes into account
435 both individual fecal exposure to the antibiotic resulting from plasma kinetics, and individual
436 longitudinal measurement of bacterial diversity through next generation sequencing. This approach is
437 able to circumvent the need for intensive sampling of each subject, and appears as a powerful tool for
438 estimating the global impact over time of an intervention on the intestinal microbiome.

439 **REFERENCES**

- 440 1. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in
441 the human intestine. *Cell* 2006, 124:837-848.
- 442 2. Kim S, Covington A, Pamer EG: The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and
443 enteric pathogens. *Immunological Reviews* 2017, 279:90-105.
- 444 3. Hollister EB, Gao C, Versalovic J: Compositional and functional features of the gastrointestinal
445 microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* 2014, 146:1449-1458.
- 446 4. Rosen CE, Palm NW: Functional Classification of the Gut Microbiota: The Key to Cracking the
447 Microbiota Composition Code: Functional classifications of the gut microbiota reveal previously
448 hidden contributions of indigenous gut bacteria to human health and disease. *Bioessays* 2017.
- 449 5. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ,
450 Bartelsman JF, Tijssen JG, et al: Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*.
451 *The New England Journal of Medicine* 2013, 368:407-415.
- 452 6. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann
453 R, Rossello-Mora R: Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using
454 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology* 2014, 12:635-645.
- 455 7. Shannon C: A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 1948,
456 27:623-656.
- 457 8. Andremont A, Brun-Buisson C, Struelens M: Evaluating and predicting the ecologic impact of
458 antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection* 2001, 7 Suppl 5:1-6.
- 459 9. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA: The pervasive effects of an antibiotic on the human gut
460 microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008, 6:e280.
- 461 10. Fujisaka S, Ussar S, Clish C, Devkota S, Dreyfuss JM, Sakaguchi M, Soto M, Konishi M, Softic S, Altindis
462 E, et al: Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. *Journal of Clinical*
463 *Investigation* 2016, 126:4430-4443.

- 464 11.Sullivan A, Edlund C, Nord CE: Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human
465 microflora. *The Lancet Infectious Diseases* 2001, 1:101-114.
- 466 12.de Lastours V, Fantin B: Impact of fluoroquinolones on human microbiota. Focus on the emergence
467 of antibiotic resistance. *Future Microbiology* 2015, 10:1241-1255.
- 468 13.Khanna S, Pardi DS: Clinical implications of antibiotic impact on gastrointestinal microbiota and
469 *Clostridium difficile* infection. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2016:1-8.
- 470 14.Ruppe E, Burdet C, Grall N, de Lastours V, Lescure FX, Andremont A, Armand-Lefevre L: Impact of
471 antibiotics on the intestinal microbiota needs to be re-defined to optimize antibiotic usage. *Clinical*
472 *Microbiology and Infection* 2017.
- 473 15.van der Graaf PH: CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology. *CPT: Pharmacometrics &*
474 *Systems Pharmacology* 2012, 1:e8.
- 475 16.Harigaya Y, Bulitta JB, Forrest A, Sakoulas G, Lesse AJ, Mylotte JM, Tsuji BT: Pharmacodynamics of
476 vancomycin at simulated epithelial lining fluid concentrations against methicillin-resistant
477 *Staphylococcus aureus* (MRSA): implications for dosing in MRSA pneumonia. *Antimicrobial Agents*
478 *and Chemotherapy* 2009, 53:3894-3901.
- 479 17.Mouton JW, Vinks AA, Punt NC: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of activity of
480 ceftazidime during continuous and intermittent infusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*
481 1997, 41:733-738.
- 482 18.Nguyen TT, Guedj J, Chachaty E, de Gunzburg J, Andremont A, Mentre F: Mathematical modeling
483 of bacterial kinetics to predict the impact of antibiotic colonic exposure and treatment duration on
484 the amount of resistant enterobacteria excreted. *PLoS Computational Biology* 2014, 10:e1003840.
- 485 19.Dayneka NL, Garg V, Jusko WJ: Comparison of four basic models of indirect pharmacodynamic
486 responses. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1993, 21:457-478.
- 487 20.de Gunzburg J, Ghozlane A, Ducher A, Le Chatelier E, Duval X, Ruppe E, Armand-Lefevre L, Sablier-
488 Gallis F, Burdet C, Alavoine L, et al: Protection of the Human Gut Microbiome From Antibiotics. *The*
489 *Journal of Infectious Diseases* 2018, 217:628-636.

- 490 21.Schmieder R, Edwards R: Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.
491 *Bioinformatics* 2011, 27:863-864.
- 492 22.Magoc T, Salzberg SL: FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies.
493 *Bioinformatics* 2011, 27:2957-2963.
- 494 23.Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG,
495 Goodrich JK, Gordon JI, et al: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.
496 *Nature Methods* 2010, 7:335-336.
- 497 24.Edgar RC: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010,
498 26:2460-2461.
- 499 25.Savic RM, Jonker DM, Kerbusch T, Karlsson MO: Implementation of a transit compartment model
500 for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmacokinetics and*
501 *Pharmacodynamics* 2007, 34:711-726.
- 502 26.Ballow C, Lettieri J, Agarwal V, Liu P, Stass H, Sullivan JT: Absolute bioavailability of moxifloxacin.
503 *Clinical Therapeutics* 1999, 21:513-522.
- 504 27.Stass H, Kubitzka D, Moller JG, Delesen H: Influence of activated charcoal on the pharmacokinetics
505 of moxifloxacin following intravenous and oral administration of a 400 mg single dose to healthy
506 males. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2005, 59:536-541.
- 507 28.Kuhn E, Lavielle M: Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models.
508 *Computational Statistics & Data Analysis* 2005, 49:1020-1038.
- 509 29.Samson A, Lavielle M, Mentré F: Extension of the SAEM algorithm to left-censored data in nonlinear
510 mixed-effects model: Application to HIV dynamics model. *Computational Statistics & Data Analysis*
511 2006, 51:1562-1574.
- 512 30.Laouenan C, Guedj J, Mentré F: Clinical trial simulation to evaluate power to compare the antiviral
513 effectiveness of two hepatitis C protease inhibitors using nonlinear mixed effect models: a viral
514 kinetic approach. *BMC Medical Research Methodology* 2013, 13:60.

- 515 31.Desmee S, Mentre F, Veyrat-Follet C, Sebastien B, Guedj J: Nonlinear joint models for individual
516 dynamic prediction of risk of death using Hamiltonian Monte Carlo: application to metastatic
517 prostate cancer. *BMC Medical Research Methodology* 2017, 17:105.
- 518 32.Cole SR, Chu H, Greenland S: Maximum likelihood, profile likelihood, and penalized likelihood: a
519 primer. *American Journal of Epidemiology* 2014, 179:252-260.
- 520 33.Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, Kuijper EJ: Time interval of increased risk for *Clostridium*
521 *difficile* infection after exposure to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012,
522 67:742-748.
- 523 34.Fantin B, Duval X, Massias L, Alavoine L, Chau F, Retout S, Andremont A, Mentre F: Ciprofloxacin
524 dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria. *The Journal of Infectious*
525 *Diseases* 2009, 200:390-398.
- 526 35.Wirtz M, Kleeff J, Swoboda S, Halaceli I, Geiss HK, Hoppe-Tichy T, Buchler MW, Friess H:
527 Moxifloxacin penetration into human gastrointestinal tissues. *Journal of Antimicrobial*
528 *Chemotherapy* 2004, 53:875-877.
- 529 36.Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De
530 Commer L, Darzi Y, et al: Quantitative microbiome profiling links gut community variation to
531 microbial load. *Nature* 2017, 551:507-511.

532 **Tables**

533 **Table 1.** Estimated population parameters and their relative standard errors (r.s.e) for the final
 534 pharmacokinetic model of moxifloxacin in the plasma and feces.

535 The model was fitted on the data from the 14 subjects treated by moxifloxacin. Mtt is the mean transit
 536 time between the first transit compartment to the absorption compartment; k_{tr} is the transfer rate
 537 between each compartment for the absorption delay; k_a is the absorption rate to the central
 538 compartment; V is the volume of distribution; k_e is the extraintestinal elimination rate from the
 539 central compartment; k_{12} and k_{21} are the transfer rates between the central compartment and the
 540 peripheral compartment; k_{ct1} is the elimination rate from the central compartment to the intestinal
 541 tract; k_{fc} is the transfer rate between the fecal compartment and the central compartment; k_t is the
 542 transfer rate between the intestinal transit compartments; k_f is the elimination rate from the fecal
 543 compartment; $\sigma_{slope,c}$ is the proportional component of the residual error for the plasma
 544 pharmacokinetic model; $\sigma_{inter,f}$ and $\sigma_{slope,f}$ are the additive and proportional components of the
 545 residual error for the fecal pharmacokinetic model, respectively.

Model	Parameter	Fixed effects		Standard deviation of the exponential random effects	
		Estimate	r.s.e. (%)	Estimate	r.s.e. (%)
Plasma	Mtt (day ⁻¹)	0.014	30	0.923	26
	k_{tr} (day ⁻¹)	151	52	1.66	24
	k_a (day ⁻¹)	101	47	1.6	22
	V (L)	99.6	6	0.172	27
	k_e (day ⁻¹)	1.63	4	0.108	26
	k_{12} (day ⁻¹)	0.125	11	0 (fixed)	-
	k_{21} (day ⁻¹)	1.06	<1	0 (fixed)	-
	k_{ct1} (day ⁻¹)	0.205	10	0.312	27
Fecal	k_{fc} (day ⁻¹)	0.407	18	0.524	27
	k_t (day ⁻¹)	3.46	15	0.485	23
	k_f (day ⁻¹)	1.23	16	0.572	20
Residual error	$\sigma_{slope,c}$	0.216	5		
	$\sigma_{inter,f}$ (µg/g)	0.0557	36		
	$\sigma_{slope,f}$	0.481	8		

546

547 **Table 2.** Estimated population parameters and their relative standard errors for the final
 548 pharmacodynamic model of moxifloxacin on the bacterial diversity in the intestinal microbiome.
 549 The model was fitted on the data from all subjects. S_0 is the value of the Shannon index at steady state;
 550 OTU_0 is the number of OTUs at steady state; $k_{out,S}$ the elimination rate of the Shannon index from the
 551 fecal compartment; $k_{out,OTU}$ is the elimination rate of the number of OTUs from the fecal compartment;
 552 $E_{max,S}$ is the maximal effect of moxifloxacin on the elimination rate of the Shannon index; $E_{max,OTU}$ is
 553 the maximal effect of moxifloxacin on the elimination rate of the number of OTUs, EC_{50} is the
 554 concentration of moxifloxacin leading to 50% of the maximal effect, $\sigma_{inter,S}$ is the additive component
 555 of the residual error for the pharmacodynamic model of the Shannon index; $\sigma_{inter,OTU}$ is the additive
 556 component of the residual error for the pharmacodynamic model of the number of OTUs.

Parameter	Fixed effects		Standard deviation of the exponential random effects	
	Estimate	r.s.e. (%)	Estimate	r.s.e. (%)
S_0 (Shannon unit)	4.75	2	0.0729	22
OTU_0 (OTU)	163	5	0.203	17
$k_{out,S}$ (day ⁻¹)	0.585	27	0 (fixed)	-
$k_{out,OTU}$ (day ⁻¹)	0.275	26	0 (fixed)	-
$E_{max,S}$	0.384	14	0 (fixed)	-
$E_{max,OTU}$	0.938	4	0 (fixed)	-
EC_{50} (µg/g)	0.128	137	4.74	21
$\sigma_{inter,S}$ (Shannon unit)	0.506	7		
$\sigma_{inter,OTU}$ (OTU)	23.2	7		

557

558 **Table 3.** Pharmacodynamic indices derived from the estimated individual pharmacodynamic
559 parameters.

Pharmacodynamic indices	Shannon index	Number of OTUs
Time to maximal loss (days)	7.0 (5.1; 11.4)	8.5 (5.5; 13.8)
Maximal loss (unit or number of OTUs)	1.2 (0.8; 1.3)	77 (47; 100)
Maximal loss (% of baseline value)	27.5 (17.5; 27.7)	47.4 (30.4; 48.3)
Time to return to 95% of baseline value (days)	16.3 (8.7; 25.3)	21.3 (13.3; 30;4)
AUC between day 0 and day 42 (unit.day or number of OTUs.day)	-16.7 (-28.7; -5.2)	-1084 (-2323; -378)

560

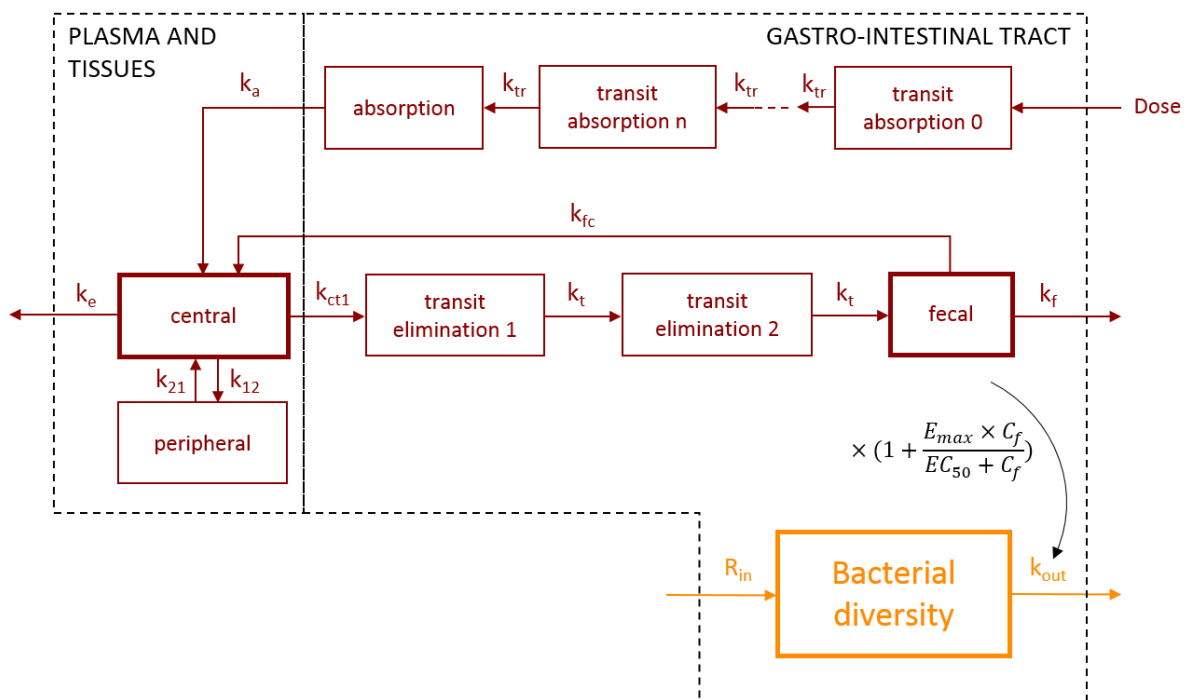
561 **Figures**

562 **Figure 1.** Final compartmental model for plasma and fecal moxifloxacin pharmacokinetics (red) and for
 563 bacterial diversity indices (orange).

564 k_{tr} is the transfer rate between each compartment for the absorption delay; k_a is the absorption rate
 565 to the central compartment; k_e is the extraintestinal elimination rate from the central compartment;
 566 k_{12} and k_{21} are the transfer rates between the central compartment and the peripheral compartment;
 567 k_{ct1} is the elimination rate from the central compartment to the intestinal tract; k_{fc} is the transfer
 568 rate between the fecal compartment and the central compartment; k_t is the transfer rate between
 569 the intestinal transit compartments; k_f is the elimination rate from the fecal compartment; R_{in} is the
 570 zero-order constant for production of the diversity index; k_{out} is the elimination rate of the diversity
 571 index from the fecal compartment.

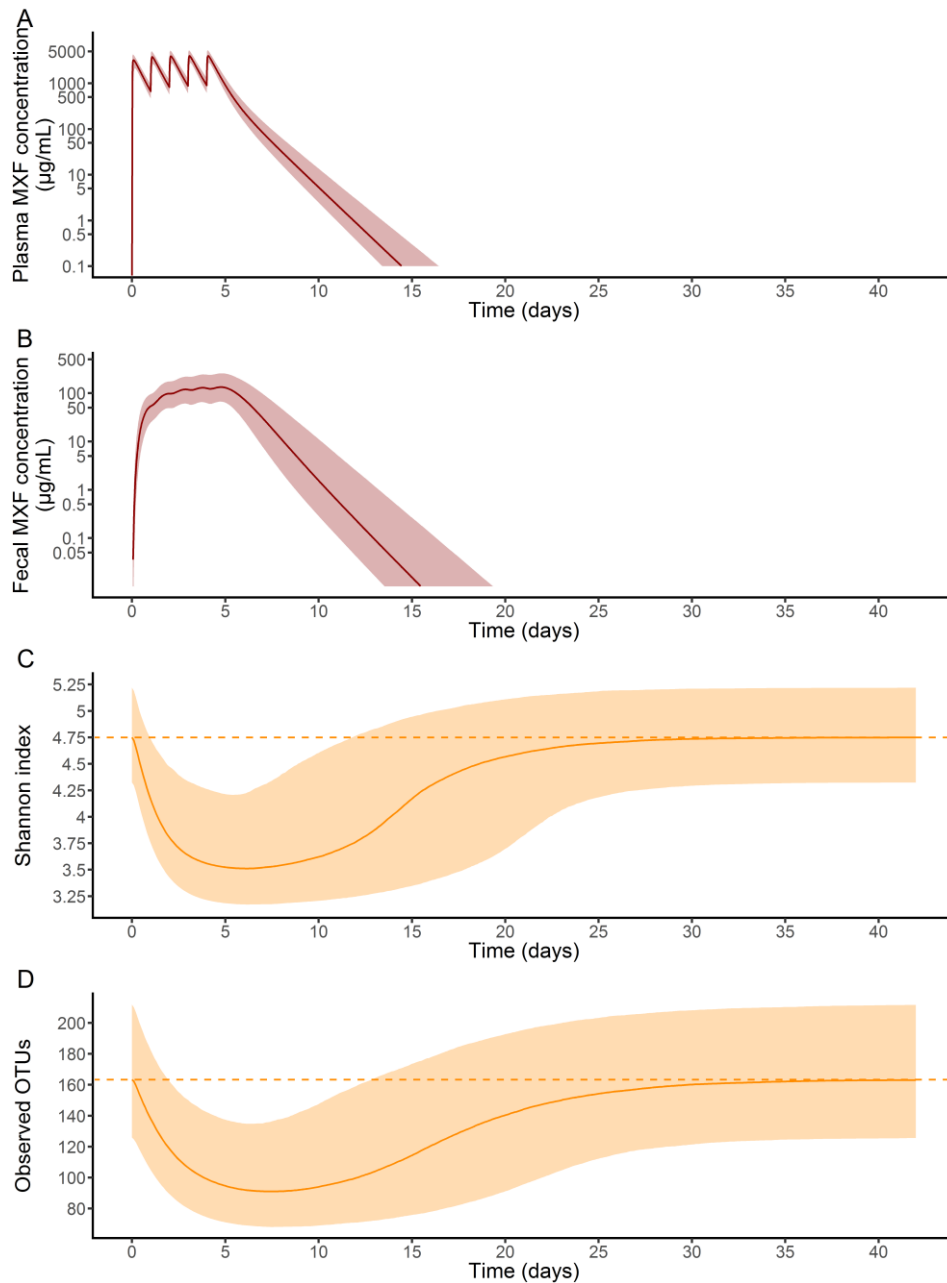
572 C_f is the concentration of free moxifloxacin in the fecal compartment; E_{max} is the maximal effect of
 573 moxifloxacin on the elimination rate of the diversity index, and EC_{50} is the concentration of
 574 moxifloxacin leading to 50% of the maximal effect.

575 Data were available for the 3 compartments with bold boxes.



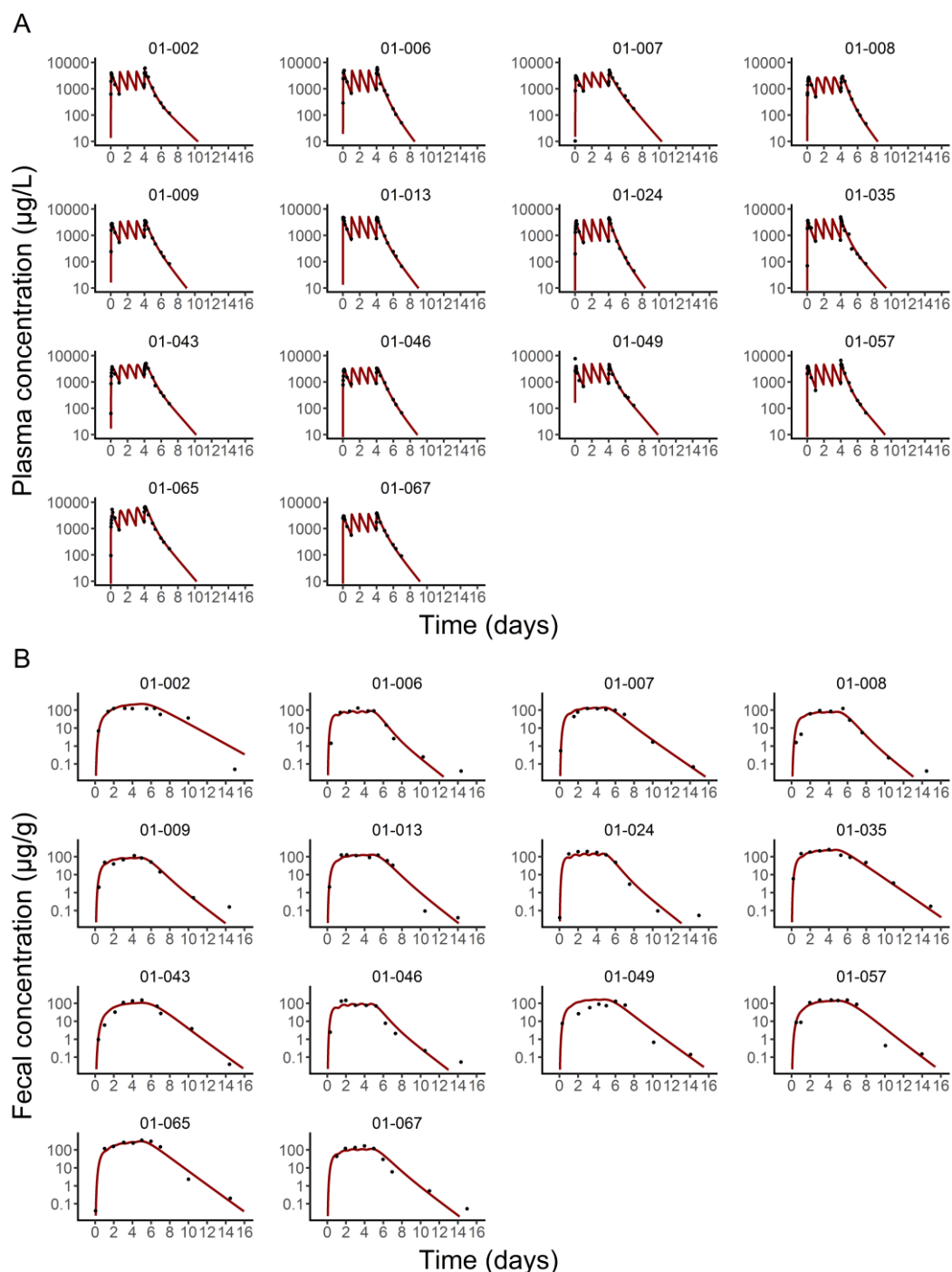
576

577 **Figure 2.** Simulated profiles of the concentration of total moxifloxacin in plasma (panel A), of free
 578 moxifloxacin in feces (panel B), of the Shannon index (panel C) and of the number of OTUs (panel D)
 579 following a course of 400 mg/day moxifloxacin for 5 days. Plain lines represent the median of 10'000
 580 simulations, whereas ribbons represent the 90% prediction intervals. In panels C and D, orange dashed
 581 lines represent the median baseline value of diversity indices without moxifloxacin treatment.



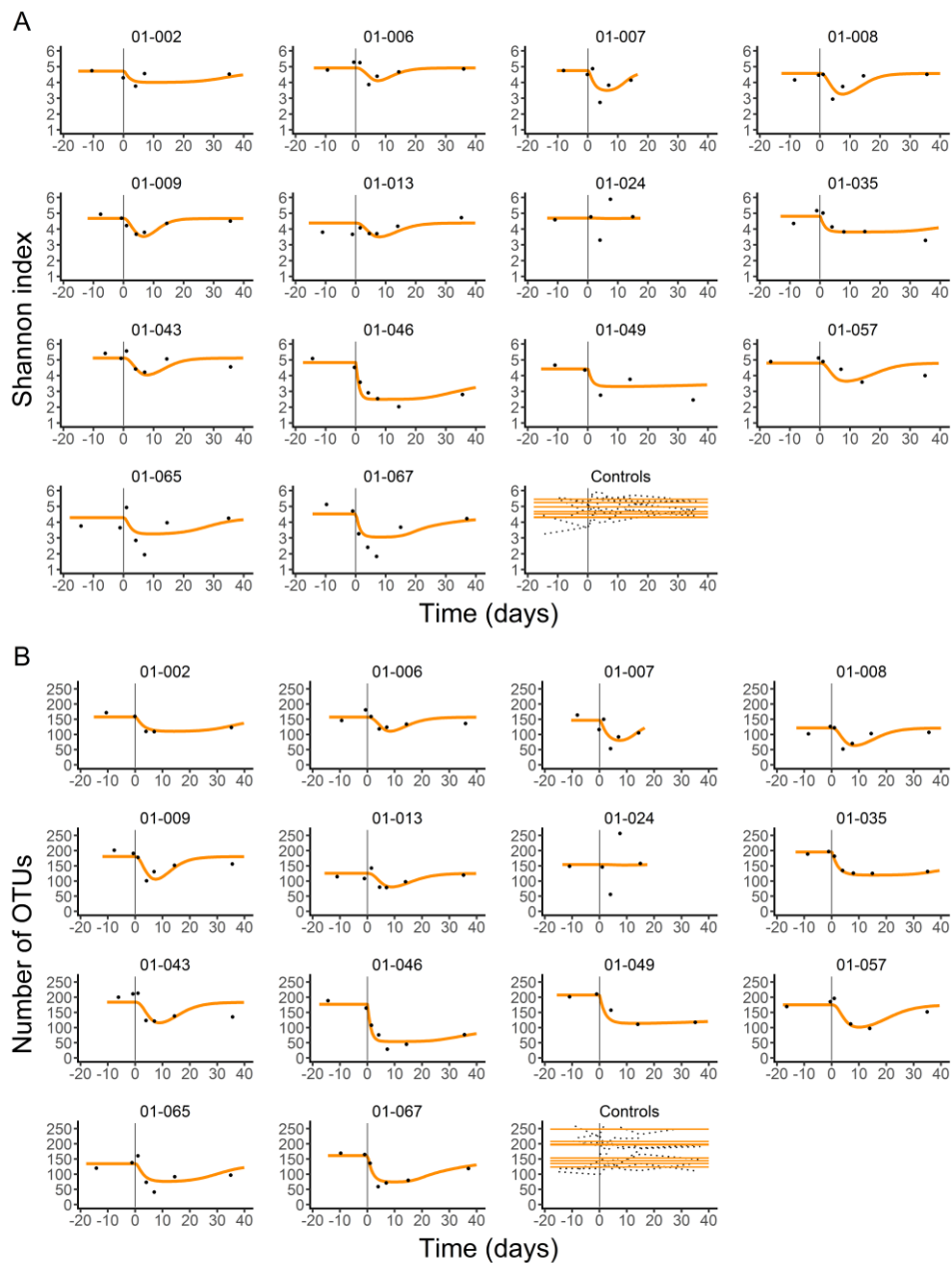
582

583 **Figure 3.** Individual fits for the plasma total (panel A) and fecal free (panel B) moxifloxacin
 584 concentrations for the final pharmacokinetic model in the 14 subjects treated by moxifloxacin. Black
 585 dots represent observed moxifloxacin concentrations. Red curves represent the individual
 586 pharmacokinetic profiles predicted by the model using estimated individual parameters.



587

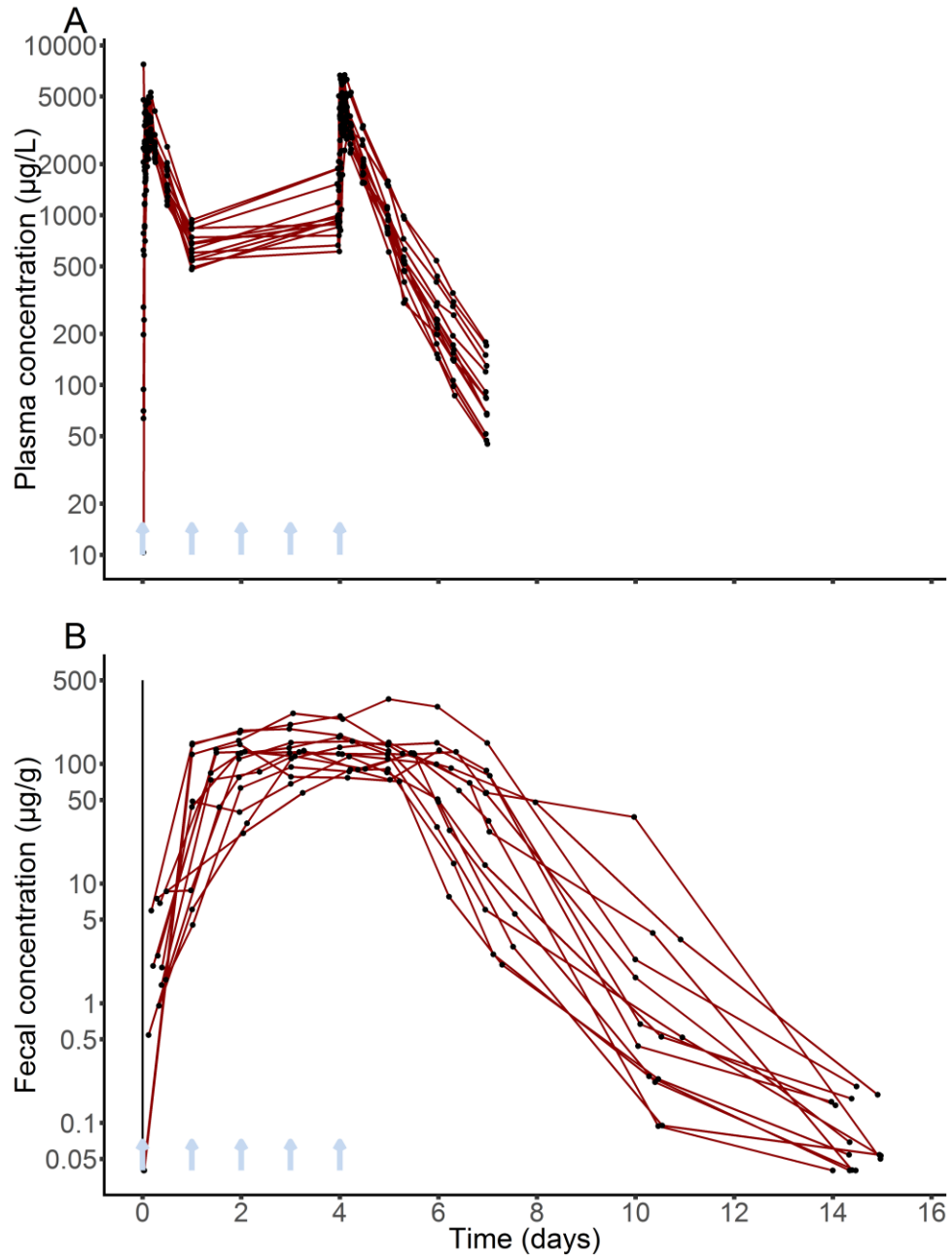
588 **Figure 4.** Individual fits for the Shannon index (panel A) and number of OTUs (panel B) for the final
 589 pharmacodynamic model. Individual plots are represented for moxifloxacin-treated subjects, whereas
 590 negative control subjects are all represented on the same plot. Black dots represent observed values
 591 of the diversity indices of moxifloxacin-treated subjects, and black dotted lines represent observed
 592 values of the diversity indices of negative control subjects. Orange curves represent the individual
 593 pharmacodynamic profiles predicted by the model using estimated individual parameters.



594

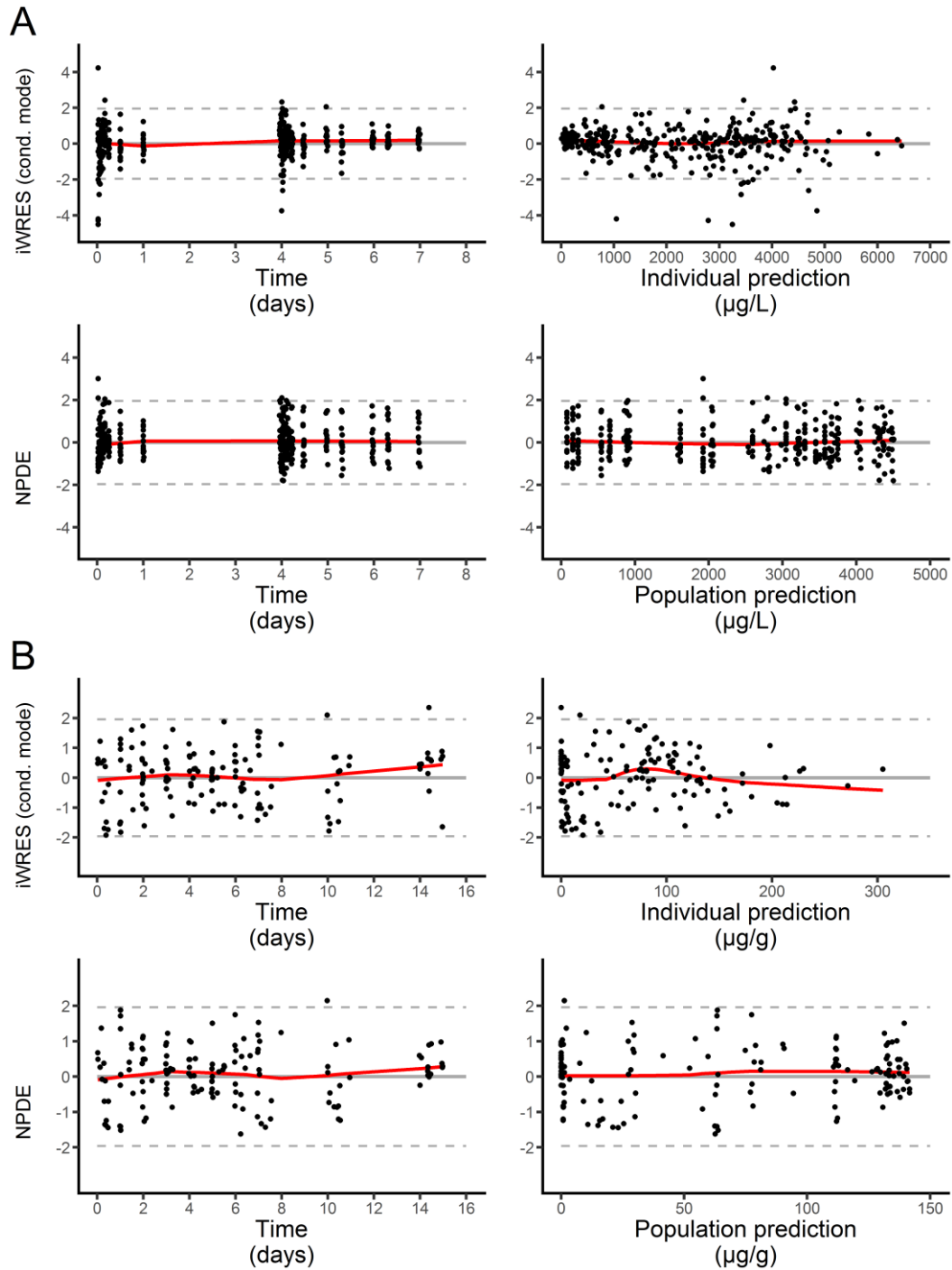
595 **Supplementary Figures**

596 **Supplementary Figure S1.** Spaghetti plot of the observed concentrations of free moxifloxacin in plasma
 597 (panel A) and feces (panel B) for the 14 subjects treated with moxifloxacin. Blue arrows represent
 598 moxifloxacin administration.



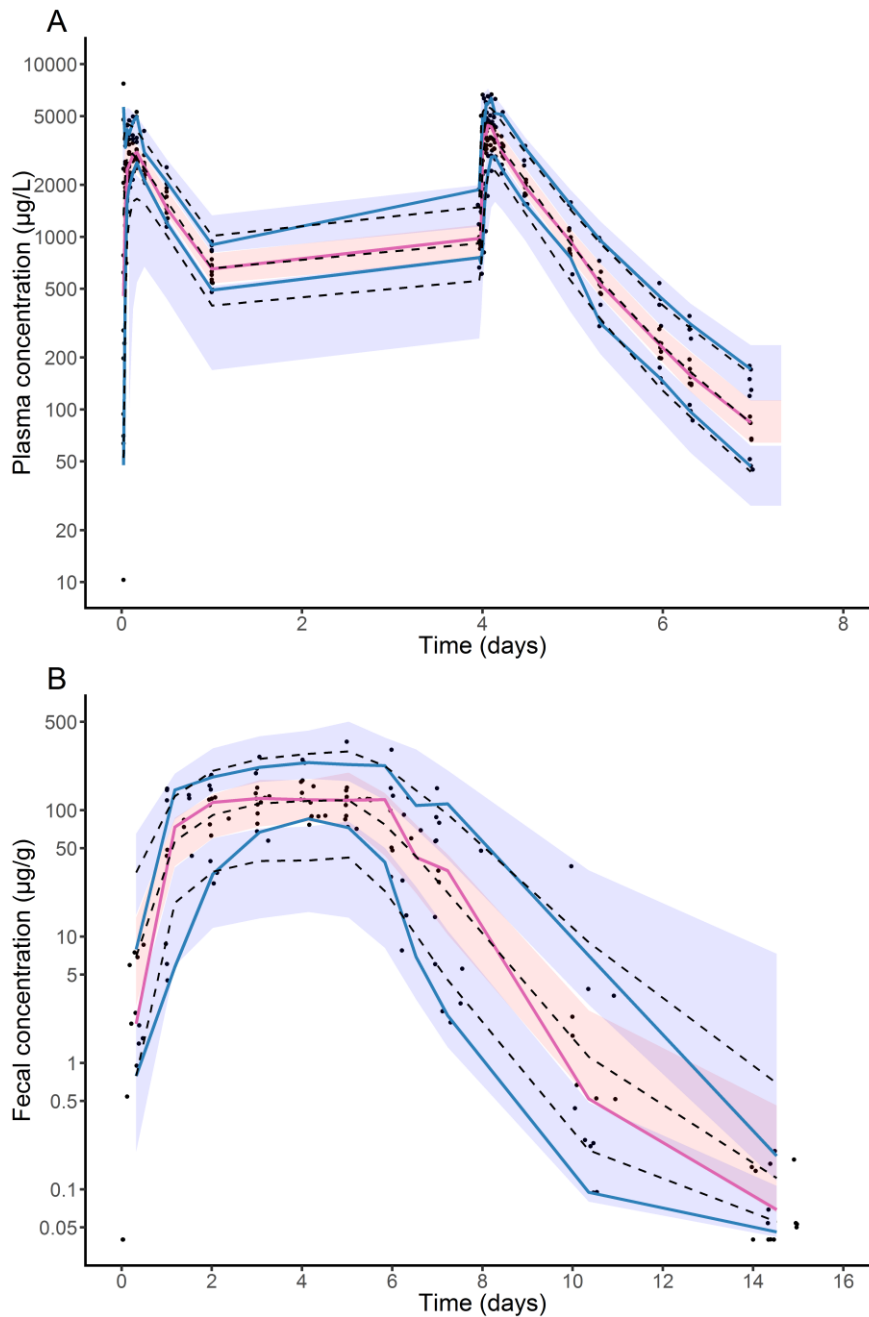
599

600 **Supplementary Figure S2.** Goodness of fit plots for the pharmacokinetic model. Plots of the individual
 601 weighted residuals (iWRES) and normalized prediction distribution errors (NPDE) over time (left) or
 602 model predictions (right) for the plasma (panel A) or fecal (panel B) concentrations. The iWRES and
 603 NPDE are shown as black points, and spline lines are also added as red curves.



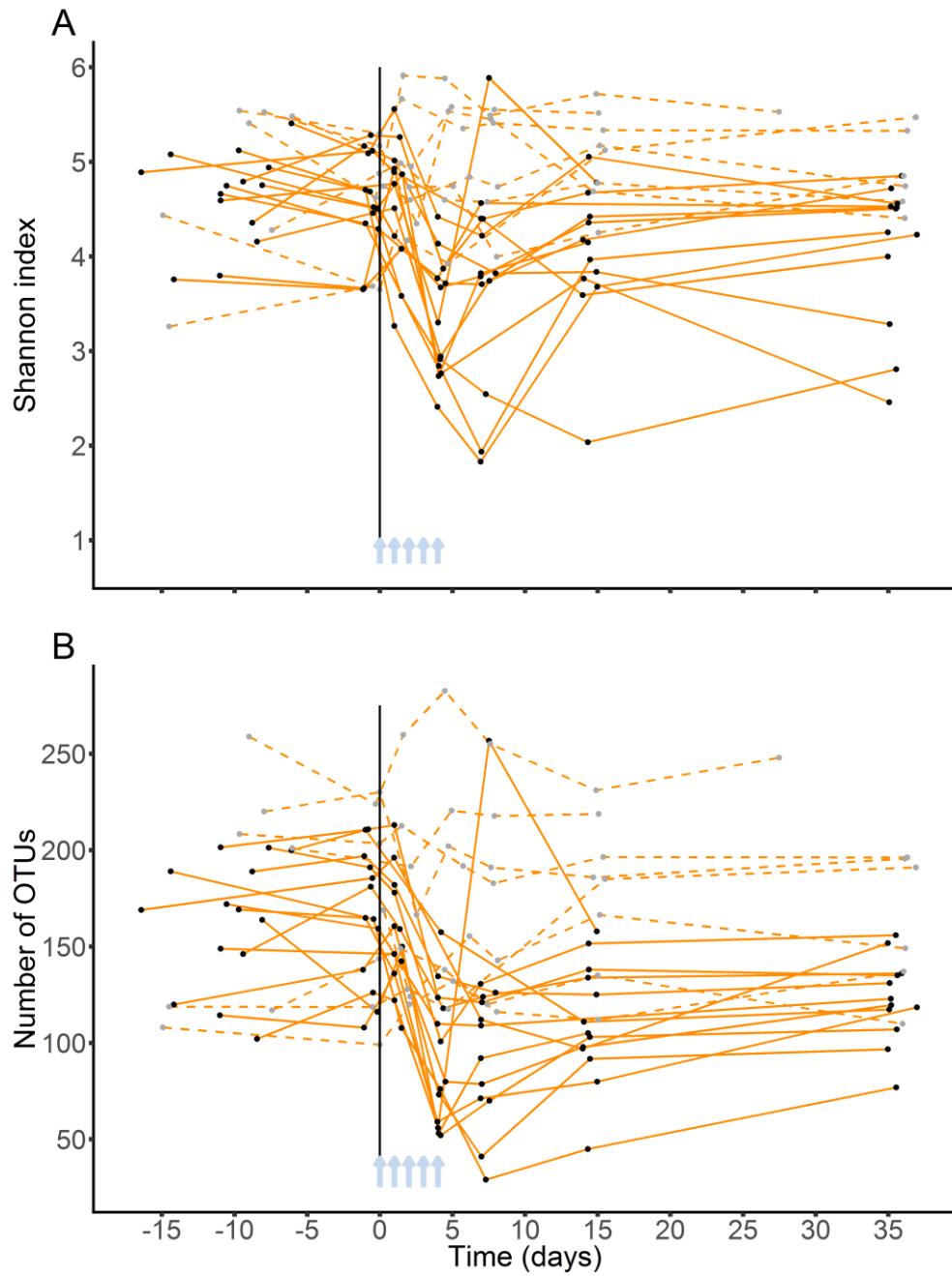
604

605 **Supplementary Figure S3.** Visual predictive checks for pharmacokinetic model. Plasma concentrations
 606 are depicted in the panel A and fecal concentrations are depicted in the panel B. The blue and red lines
 607 are the observed percentiles (10th, 50th, and 90th percentiles), the blue and red ribbons are the
 608 corresponding 95% confidence intervals. The dashed black lines are predicted percentiles. Black points
 609 are the individual observations.



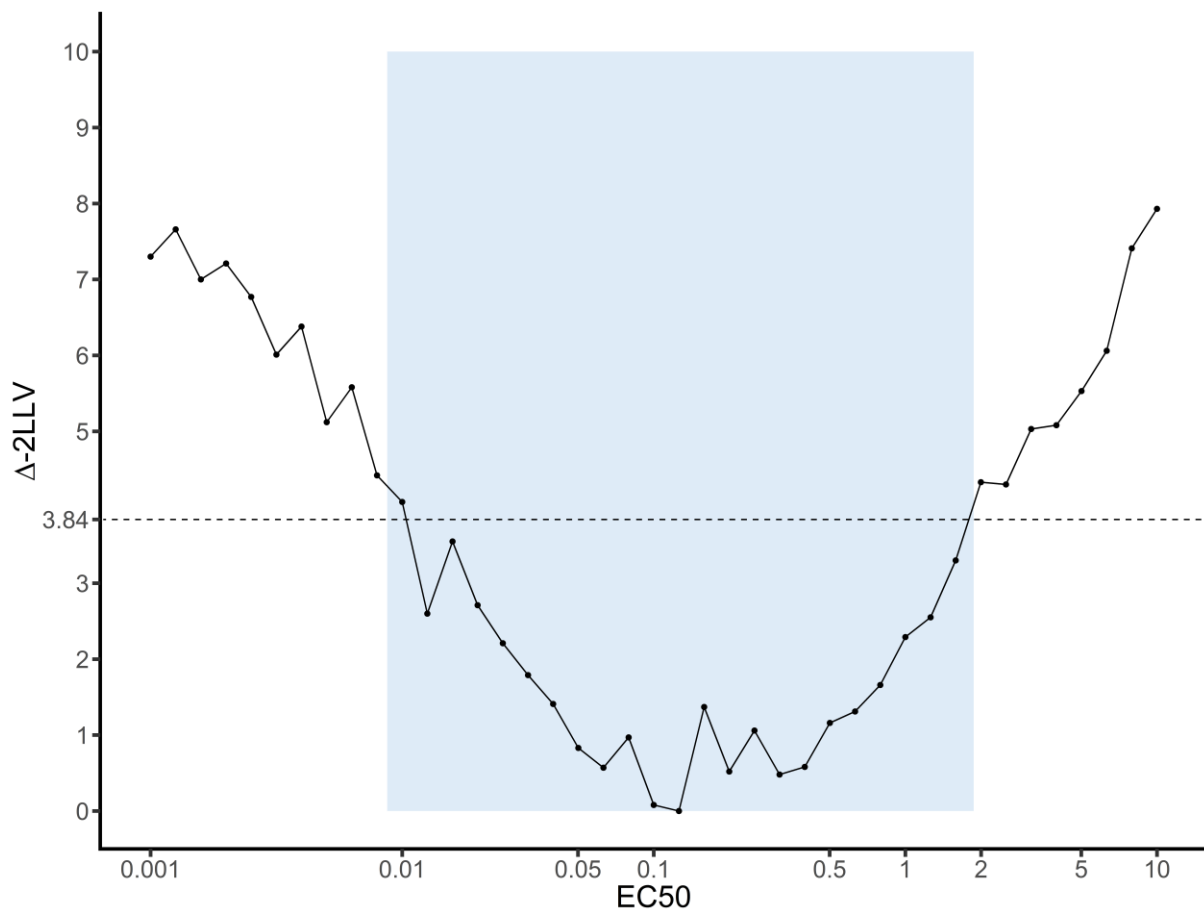
610

611 **Supplementary Figure S4.** Spaghetti plots of the bacterial diversity within the intestinal microbiome
 612 (Shannon index, panel A, and number of OTUs, panel B). Subjects treated with moxifloxacin (N=14) are
 613 represented with plain line and black points, and subjects from the negative control group (N=8) are
 614 represented with dashed lines and grey points. Blue arrows represent moxifloxacin administration.



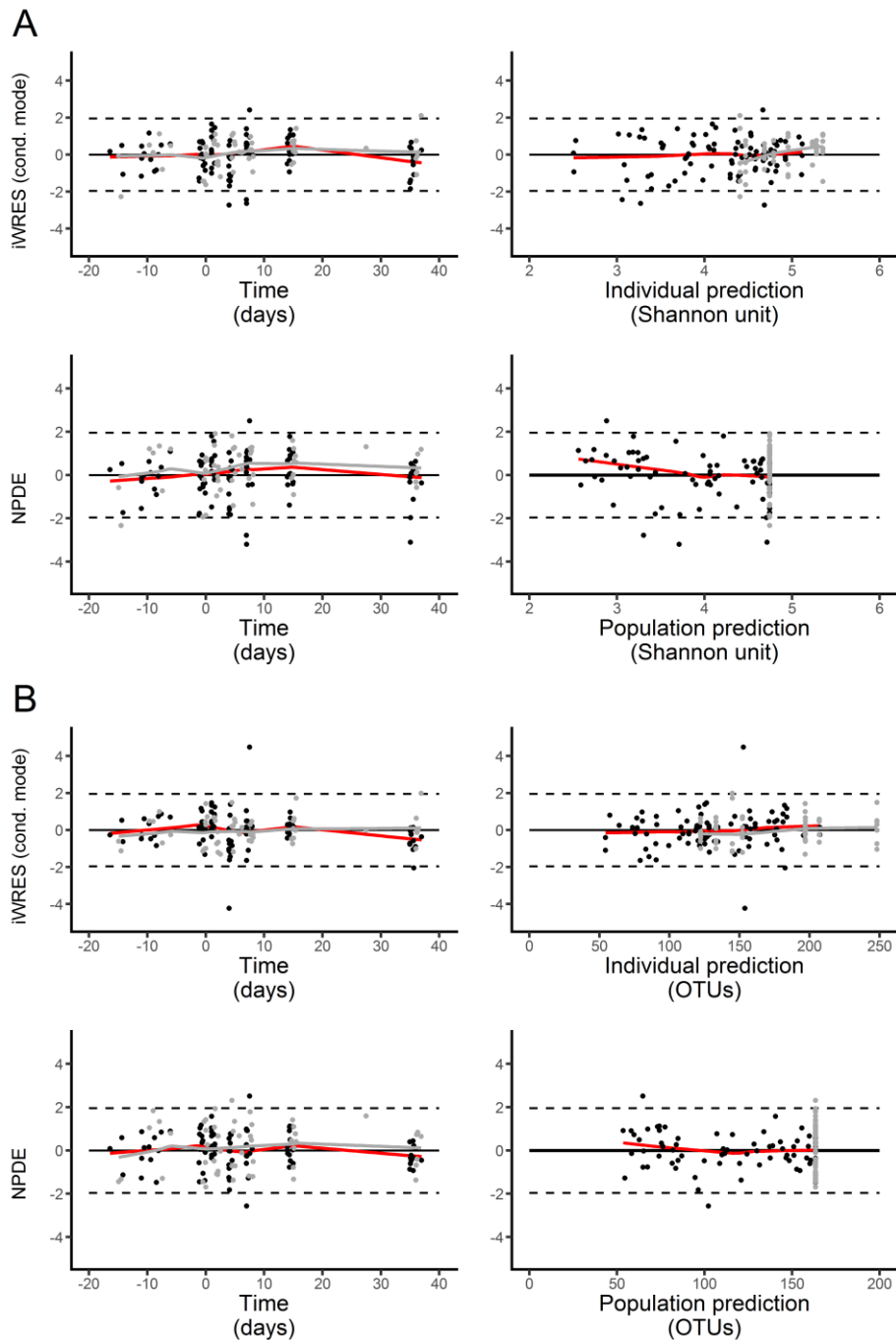
615

616 **Supplementary Figure S5.** Profile of the log-likelihood according to the value of the EC_{50} parameter.
617 The profile was obtained by fixing the EC_{50} parameter at different values ranging from 10^{-3} to 10, while
618 maximizing the likelihood over the other parameters. Horizontal dashed line represent the value for
619 which the variation of the log-likelihood from its maximum is $\frac{3.84}{2}$, where 3.84 is the 95th percentile of
620 a 1-degree of freedom χ^2 variable. The blue shaded area represent the 95% confidence interval of the
621 EC_{50} parameter computed using the Student's t-distribution.



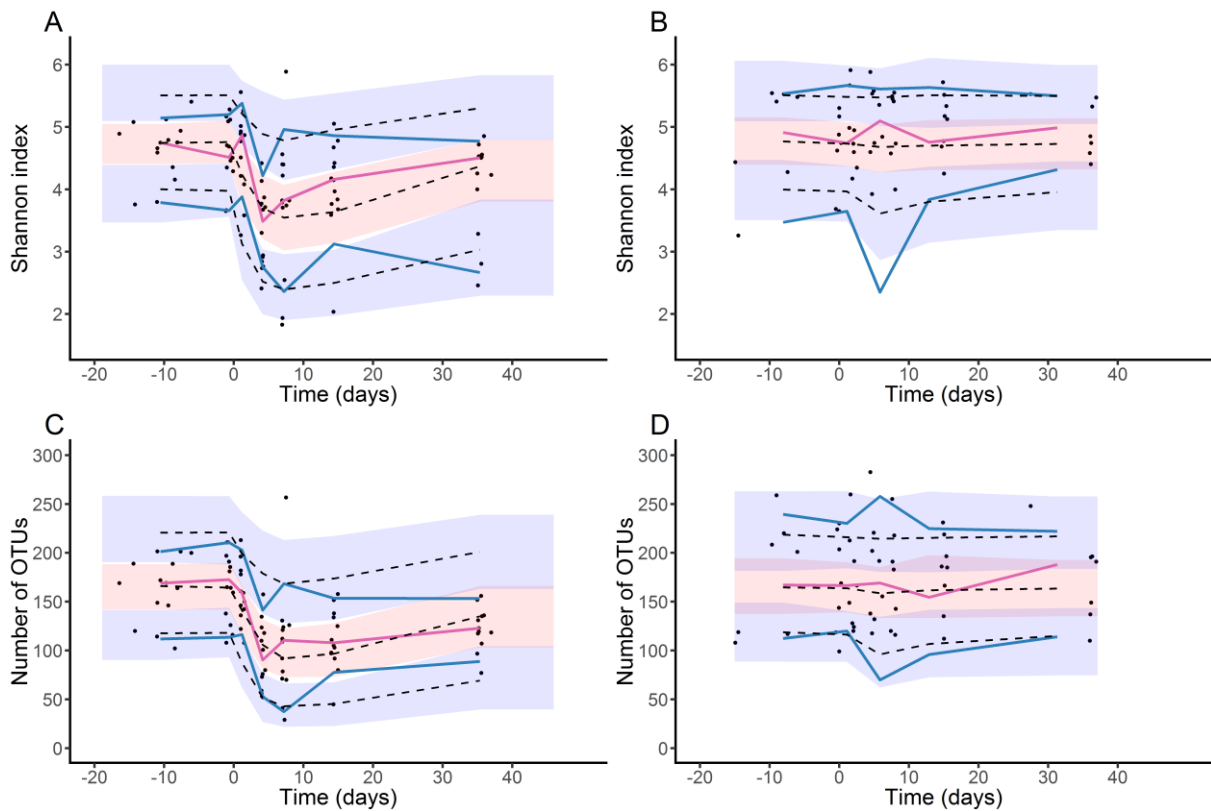
622

623 **Supplementary Figure S6.** Goodness of fit plots for the pharmacodynamic model (Shannon index,
 624 panel A, and number of OTUs, panel B). Individual weighted residuals (iWRES) and normalized
 625 prediction distribution errors (NPDE) over time (left) or model predictions (right) for moxifloxacin-
 626 treated subjects are shown as black points and spline lines are added as red curves, whereas iWRES
 627 and NPDE are shown as grey points and spline lines are added as grey curves for negative controls.



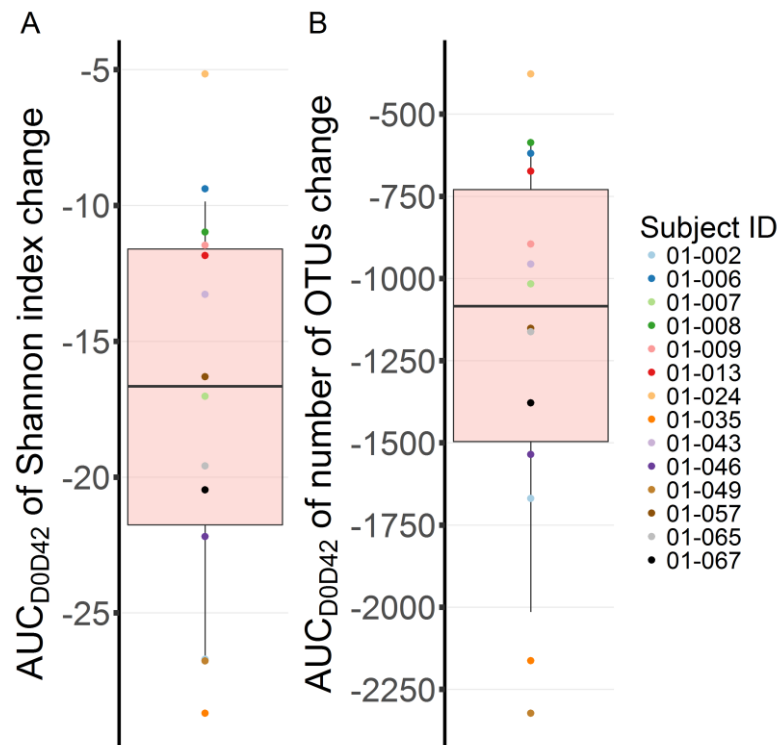
628

629 **Supplementary Figure S7.** Visual predictive checks for pharmacodynamic model. The Shannon index is
 630 depicted in the panel A (moxifloxacin-treated subjects) and panel B (untreated subjects) and the number
 631 of OTUs is depicted in the panel C (moxifloxacin-treated subjects) and panel D (untreated subjects). The
 632 blue and red lines are the observed percentiles (10th, 50th, and 90th percentiles), the blue and red ribbons
 633 are the corresponding 95% confidence intervals. The dashed black lines are predicted percentiles. Black
 634 points are the individual observations.



635

636 **Supplementary Figure S8.** Estimated impact of moxifloxacin on intestinal microbiome in the 14 subjects
 637 treated with moxifloxacin. The impact was measured as the area under the curve (AUC) of the change
 638 of the Shannon index (panel A) or number of OTUs (panel B) from baseline over time, between day 1
 639 and day 42. The AUC is a metric which allows a global view of antibiotics impact on the microbiota as it
 640 takes into account both the extent and the duration of dysbiosis



641

642 **Supplementary Text. Mathematical model**643 **Pharmacokinetic model**

644 The evolution of the amount of moxifloxacin in the various compartments is described using the
645 following system of ordinary differential equations:

$$646 \quad \frac{dA_a}{dt} = Dose \times F \times k_{tr} \times \frac{(k_{tr} \times t)^n \times e^{-k_{tr} \times t}}{n!} - k_a \times A_a$$

$$647 \quad \frac{dA_c}{dt} = k_a \times A_a + k_{fc} \times A_f + k_{21} \times A_p - (k_e + k_{ct1} + k_{12}) \times A_c$$

$$648 \quad \frac{dA_p}{dt} = k_{12} \times A_c - k_{21} \times A_p$$

$$649 \quad \frac{dA_{t1}}{dt} = k_{ct1} \times A_c - k_t \times A_{t1}$$

$$650 \quad \frac{dA_{t2}}{dt} = k_t \times A_{t1} - k_t \times A_{t2}$$

$$651 \quad \frac{dA_f}{dt} = k_t \times A_{t2} - (k_{fc} + k_f) \times A_f$$

652 where A_a is the amount of moxifloxacin in the absorption compartment; A_c is the amount of
653 moxifloxacin in the central compartment; A_p is the amount of moxifloxacin in the peripheral
654 compartment; A_{t1} is the amount of moxifloxacin in the first transit compartment between the central
655 compartment and the fecal compartment; A_{t2} is the amount of moxifloxacin in the second transit
656 compartment between the central compartment and the fecal compartment; A_f is the amount of
657 moxifloxacin in the fecal compartment. We denote n the number of compartments between the depot
658 compartment and the absorption compartment; Mtt the mean transit time from the depot
659 compartment to the absorption compartment; k_{tr} the transfer rate between each compartment for
660 the absorption delay; k_a the absorption rate to the central compartment; k_e the extraintestinal
661 elimination rate from the central compartment; k_{12} and k_{21} the transfer rates between the central
662 compartment and the peripheral compartment; k_{ct1} the elimination rate from the central
663 compartment to the intestinal tract; k_{fc} the transfer rate between the fecal compartment and the

664 central compartment; k_t the transfer rate between the intestinal transit compartments; and k_f the
 665 elimination rate from the fecal compartment;

666 The relationship between n , Mtt and k_{tr} is: $n = (Mtt \times k_{tr}) - 1$.

667 Initial conditions of these equations are: $A_{a,0} = 0$; $A_{c,0} = 0$; $A_{p,0} = 0$; $A_{t1,0} = 0$; $A_{t2,0} = 0$ and $A_{f,0} =$
 668 0.

669 The concentration of total moxifloxacin in the central compartment C_c is computed as: $C_c = \frac{A_c}{V}$, where
 670 V is the volume of distribution.

671 The concentration of free moxifloxacin in the fecal compartment C_f is computed as: $C_f = \frac{A_f}{P_f}$, where
 672 P_f is the fecal weight.

673 **Pharmacodynamic model.**

674 The evolution of the diversity indices in the fecal compartment is described using the following system
 675 of ordinary differential equations:

676
$$\frac{dS}{dt} = R_{in,S} - \left(1 + \frac{E_{max,S} \times C_f}{EC_{50} + C_f}\right) \times k_{out,S} \times S$$

677
$$\frac{dOTU}{dt} = R_{in,OTU} - \left(1 + \frac{E_{max,OTU} \times C_f}{EC_{50} + C_f}\right) \times k_{out,OTU} \times OTU$$

678 where S is the value of the Shannon index in the fecal compartment; OTU is the number of OTUs in
 679 the fecal compartment; $R_{in,S}$ is the zero-order constant for production of the Shannon index; $k_{out,S}$ is
 680 the elimination rate of the Shannon index from the fecal compartment; $R_{in,OTU}$ is the zero-order
 681 constant for production of the number of OTUs; $k_{out,OTU}$ is the elimination rate of the number of OTUs
 682 from the fecal compartment; $E_{max,S}$ is the maximal effect of moxifloxacin on the elimination rate of
 683 the Shannon index; $E_{max,OTU}$ is the maximal effect of moxifloxacin on the elimination rate of the
 684 number of OTUs, and EC_{50} is the concentration of moxifloxacin leading to 50% of the maximal effect.
 685 S_0 is the value of the Shannon index at baseline; OTU_0 is the number of OTUs at baseline.

686 Initial conditions of these equations are: $S_0 = \frac{R_{in,S}}{k_{out,S}}$ and $OTU_0 = \frac{R_{in,OTU}}{k_{out,OTU}}$.

2. Elimination biliaire et impact sur la diversité et la résistance bactériennes

2.1. Résumé

Nous avons vu en introduction que les caractéristiques pharmacocinétiques des antibiotiques pouvaient avoir une influence sur l'effet qu'exercent les antibiotiques sur le microbiote intestinal (voir la section 3.3 du chapitre 1). Notamment, l'excrétion biliaire des antibiotiques est pressentie comme facteur pouvant influencer cet impact, et nous avons vu qu'un certain nombre d'arguments de littérature appuyait cette hypothèse. Parmi les antibiotiques de la classe des céphalosporines de 3^{ème} génération, la ceftriaxone – dont l'excrétion biliaire est estimée à 50% – et le céfotaxime – dont l'excrétion biliaire n'est estimée qu'à 10% – partagent le même spectre d'activité mais leurs différences pharmacocinétiques laissent supposer un impact différent sur le microbiote. Les données actuellement publiées vont en faveur de cette différence.

Dans le cadre de travaux préparatoires de cette thèse, nous avons ainsi conçu et mené l'essai clinique Cérémi, en réponse à l'appel d'offres Contrat de Recherche Clinique 2013. Son objectif principal était de comparer l'effet de la ceftriaxone et du céfotaxime sur l'émergence d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération dans le microbiote intestinal jusqu'au 7^{ème} jour après le début du traitement. Les objectifs secondaires incluaient la comparaison de l'impact de ces deux molécules sur les comptes d'entérobactéries totales et sur les comptes de germes non commensaux du microbiote intestinal, et sur la diversité bactérienne.

Plusieurs recueils de selles étaient prévus avant (J-15, J-7, J-1) et après (J1, J2, J3, J4, J7, J10, J15, J30, J90 et J180) la première administration d'antibiotique, pour la détermination des concentrations fécales de l'antibiotique administré par méthode microbiologique et pour la détermination des comptes bactériens et fongiques par méthode phénotypique. L'analyse métagénomique a été réalisée par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S. Deux indices de diversité α ont été analysés : l'indice de diversité de Shannon, et le nombre observé de taxons bactériens.

Au total, 22 sujets ont été inclus dans l'essai (11 par groupe). A l'inclusion, 5 sujets du groupe ceftriaxone (45.5%) et 1 sujet du groupe céfotaxime (9.7%) étaient colonisés par une entérobactérie résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Nous avons calculé l'aire sous la courbe des comptes d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération entre J0 et J7, et la variation de l'aire sous la courbe des comptes d'entérobactéries totales et des comptes de germes non commensaux du tube digestif entre J0 et J7. Nous n'avons pas mis en évidence de différence pour l'analyse des critères de jugement des différents germes étudiés. Cependant, dans les deux groupes de traitement, une diminution rapide et marquée des comptes d'entérobactéries totales était

observée. Le retour à l'état initial n'était pas immédiat, et les comptes d'entérobactéries totales étaient normalisés environ 10 jours après la fin du traitement.

Nous avons également calculé l'aire sous la courbe de la variation des comptes d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération, des comptes d'entérobactéries totales et des comptes de germes non commensaux du tube digestif entre J0 et J15, et avons normalisé ces aires sous la courbe afin de tenir compte de la durée écoulée entre le début du traitement et l'émission de la selle de J15. Là encore, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les aires sous la courbe normalisées étudiées.

La valeur médiane (min ; max) observée à J0 de l'indice de diversité de Shannon était 3.9 (3.2 ; 4.3) dans le groupe ceftriaxone et 3.9 (3.0 ; 4.3) dans le groupe céfotaxime. La réduction maximale médiane de l'indice de Shannon était de 0.8 unités (0.1 ; 2.9) dans le groupe ceftriaxone, et de 1.0 unité dans le groupe céfotaxime (0.3 ; 1.7). Nous avons calculé les aires sous la courbe normalisées de la variation de l'indice de diversité de Shannon entre J0 et J30, la différence observée n'était pas statistiquement significative. De la même manière, la différence entre les aires sous la courbe normalisée de la variation du nombre observé de taxons bactériens entre J0 et J30 n'était pas significativement différente entre les deux groupes de traitement.

Les concentrations d'antibiotiques étaient indétectables pour la quasi-totalité des sujets. Dans le groupe ceftriaxone, 1 sujet avait des concentrations de ceftriaxone mesurables, sur les échantillons collectés entre J2 et J7. Les concentrations variaient entre 5.0 µg/g et 93.7 µg/g. Dans le groupe céfotaxime, 1 sujet avait une concentration de céfotaxime mesurable, sur l'échantillon obtenu à J4 (1.6 µg/g).

Les résultats de cet essai ont permis pour la première fois d'analyser et de comparer l'impact de la ceftriaxone et du céfotaxime administrés selon un schéma posologique courant en pratique clinique. Les deux antibiotiques avaient un effet marqué de réduction des comptes d'entérobactéries et de la diversité bactérienne. De façon surprenante, nous n'avons mis en évidence aucune différence d'impact entre les deux antibiotiques, ni par l'analyse phénotypique ni par l'analyse métagénomique. Cela conforte les données existantes sur le caractère superposable de leurs spectres antibactériens. Globalement, les résultats de cet essai n'ont pas permis d'étayer l'hypothèse selon laquelle la prise en compte de l'excrétion biliaire des antibiotiques pourrait permettre d'en limiter l'impact sur le microbiote intestinal.

Ce travail est en cours de rédaction pour le *Journal of Infectious Diseases*.

2.2. Article 4

Title

Impact of ceftriaxone versus cefotaxime on the intestinal microbiota: a randomized clinical trial in healthy volunteers

Authors

Charles Burdet (1, 2), Nathalie Grall (1, 3), Morgane Linard (2), Michèle Benhayoun (4), Khadija Bourabha (1), Erick Denamur (1), Antoine Bridier-Namias (1), Mélanie Maignan (1), Olivier Tenailon (1), Laurent Massias (1,5), Sarah Tubiana (4), Loubna Alavoine (4), Antoine Andremont (1), France Mentré (1, 2), Xavier Duval (1, 4) for the CEREMI group

(1) INSERM, IAME, UMR 1137, Paris, France; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

(2) Department of Epidemiology, Biostatistic and Clinical Research, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

(3) Department of Bacteriology, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

(4) Inserm Clinical Investigation Center 1425, Paris, France

(5) Laboratory of Toxicology, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

Corresponding author

Charles Burdet

Inserm UMR 1137 IAME, UFR de Médecine Bichat, 16, rue Henri Huchard, 75018, Paris, France.

Tel : +33 1 57 27 75 35

Email : charles.burdet@inserm.fr

Potential conflicts of interest

All authors reported no conflict of interest.

Funding

This clinical trial was sponsored by Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Paris, France) and funded by the Contrat de Recherche Clinique 2013 (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de la Recherche Clinique et du Développement, CRC13-179).

26 **Abstract**

27 Background

28 Ceftriaxone and cefotaxime are two third generation cephalosporins with the same antibacterial activity
29 but distinct pharmacokinetic characteristics. There is a debate whether ceftriaxone biliary elimination
30 might result in a more pronounced impact than cefotaxime on the intestinal microbiota.

31 Methods

32 We performed a prospective, monocenter, open, randomized clinical trial in 22 healthy volunteers with
33 a 3-day clinical course of either ceftriaxone (1g/24 hours) or cefotaxime (1g/8 hours) by the intravenous
34 route. We collected several fecal samples before and up to 30 days after treatment initiation, for
35 phenotypic and metagenomic analyses by 16S rRNA gene profiling, and to measure antibiotic
36 concentration by microbiological bioassay. Bacterial diversity was studied using the Shannon index and
37 the number of operational taxonomic units. Using non parametric tests, we compared between the two
38 groups the area under the curve of studied micro-organisms counts over time between day 0 and day 7
39 or day 15, and of indices of bacterial diversity between day 0 and day 30.

40 Results

41 Ceftriaxone did not exhibit a significantly different impact on the emergence of 3rd generation
42 cephalosporin resistant enterobacteria, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*
43 *aeruginosa*, *Clostridium difficile* or moulds. Although both antibiotics reduced the counts of total
44 enterobacteria, the difference was not significant. Similar results were observed for diversity indices. All
45 but 1 volunteer from each group exhibited undetectable levels of antibiotic in feces.

46 Conclusions

47 The impact of ceftriaxone and cefotaxime on the intestinal microbiota was not significantly different
48 after a 3-day course of either antibiotic. Both antibiotics had a marked impact on the bacterial diversity.
49 These results suggests the undistinct use of the 2 antibiotics in the clinical context, although further
50 studies including the resistome would be of interest.

51 **Keywords**

52 Ceftriaxone, cefotaxime, pharmacokinetics, intestinal microbiota, metagenomics

53 **Trial registration**

54 The trial was declared in the ClinicalTrials.gov (identifiant NCT02659033) and the French (ID-RCB number

55 2014-005485-30) registers

56 **INTRODUCTION**

57 The rise in bacterial resistance to antibiotics, in particular that of Gram-negative bacteria, constitutes a
58 serious threat to our medical system (1). The prevalence of bacterial strains resistant to usual β -lactam
59 antibiotics has been increasing since the 1980s (2-6). Initially restrained to nosocomial infections,
60 antibiotic resistance has spread worldwide (7), affecting treatment of community-acquired infections.
61 The major driver of this evolution is the impact that antibiotics, in particular β -lactams, exert on the
62 intestinal commensal microbiota of both humans and animals (8). Indeed, during treatment, huge loads
63 of resistant intestinal bacteria are selected and excreted, leading to carriage in the hosts and
64 dissemination of resistant strains in the environment.

65 In the same time, using the recent developments in next generation sequencing, the gut microbiome
66 has been shown to contribute to the host metabolism and to the induction of immune responses and to
67 be involved in the development of various pathological conditions, such as obesity, allergies or
68 inflammatory bowel diseases (9). In addition to cause resistance selection and dissemination, antibiotics
69 could also have profound and prolonged effects on the composition of the microbiome and on hosts
70 health maintenance (10-15). In their studies of healthy volunteers receiving 5-day courses of
71 ciprofloxacin, Dethlefsen *et al.* observed that antibiotic administration had a rapid effect in reducing the
72 bacterial diversity and in modifying the composition of the gut microbiome (13, 15). These results are a
73 strong incentive to better document the impact of antibiotics on the gut microbiome (16), and to identify
74 the drivers of its disruption.

75 A limited number of studies suggested that taking into account antibiotics pharmacokinetic
76 characteristics might help to reduce their impact on the microbiome (17, 18). The importance of the
77 elimination pathway has been highlighted by the analysis of the phenotypic effect of 4 broad spectrum
78 cephalosporins on mice intestinal microbiota (19). In their study, authors showed that the impact
79 increases with the biliary elimination of the antibiotic. Another experimental scheme is the comparison
80 of the impact of the two widely used 3rd generation cephalosporins ceftriaxone and cefotaxime. These
81 two antibiotics share their antibacterial spectrum, indications, and intravenous administration route,

82 but have different pharmacokinetics characteristics: ceftriaxone is administered once daily and has a
83 50% biliary elimination, while cefotaxime needs thrice-in-day administrations and has a 10% biliary
84 elimination. Two randomized controlled trials have been conducted so far to compare their effect on
85 the intestinal microbiota (17, 18). In both studies, female patients requiring gynaecological surgery
86 received a unique, high dose (2 grams of ceftriaxone or 2 grams of cefotaxime) antibiotic prophylactic
87 treatment. Both studies suggested a more pronounced impact of ceftriaxone on the gut microbiota
88 regarding the emergence of bacterial resistance. Similar trends were reported in ecological studies (20,
89 21). However, no study dealing with usual antibiotic regimens administered in the clinical practice is
90 available. Next generation sequencing methods were not used to investigate this question despite the
91 precise description of the microbiome they provide.

92 Here, we report the results of a prospective randomized clinical trial performed in healthy volunteers
93 receiving a clinical course of ceftriaxone or cefotaxime for 3 days, and compared antibiotic impact on
94 the gut microbiome from a phenotypic and a metagenomic perspective.

95 **METHODS**

96 **Study design**

97 We conducted a prospective, open label, randomized clinical trial from March 2016 to August 2017 in
98 adult healthy volunteers in the Centre d'Investigations Cliniques at Bichat – Claude Bernard Hospital
99 (Paris, France). All participants received oral and written information, and provided signed consent
100 before inclusion. The trial obtained approval from the Independent Ethics Committee "Île-de-France 1"
101 on 12/21/2015 (2015-oct-14028) and from the National Agency for Security of Medicinal Products on
102 07/24/2015 (150527A-41), and was conducted in respect with Good Clinical Practice and the Declaration
103 of Helsinki as last amended. It was sponsored by Assistance Publique – Hôpitaux de Paris.

104 **Subjects selection criteria**

105 Male and female healthy volunteers between 18 and 65 years old were eligible if their body mass index
106 was comprised between 18.5 and 30 kg/m², if they had a normal digestive transit and if they were
107 considered healthy by medical history, vital signs, physical examination, electrocardiogram and blood

108 laboratory results at a screening visit 16 – 26 days prior to randomization. Female in child-bearing age
109 were eligible if they had a contraceptive treatment and had a negative pregnancy test at screening.
110 Subjects with a history of hospitalization within the last 6 months or with antibiotic exposure within the
111 past 3 months were not eligible, as well as those with any history of chronic active disease including HIV,
112 HCV or HBV infection, with a history of allergy to β -lactams or who were legally protected. Subjects'
113 household should have neither active chronic disease nor have received any antibiotic treatment in the
114 preceding 15 days. They were secondary excluded if they did not provide any fecal sample before
115 randomization, or if more than 1 fecal sample was missing between day 1 and day 7 after antibiotic
116 treatment initiation.

117 **Treatments**

118 Volunteers were randomised (1:1 ratio) to receive either ceftriaxone or cefotaxime as 30-minute
119 intravenous infusions for 3 days. Ceftriaxone was administered at the dose of 1 gram every 24 hours,
120 and cefotaxime was administered at the dose of 1 gram every 8 hours. Antibiotics were administered
121 via an automatic high-precision infusion pump. Day 1 was defined as the day of the first infusion of
122 antibiotic, and H0 was the time of the beginning of the first infusion of antibiotic. We collected the actual
123 dates and times of antibiotic treatment administration.

124 **Fecal sampling and analyses**

125 A total of 11 fecal samples was obtained from each participant (between day -15 and day -11, between
126 day -8 and day -4, and at days -1, 1, 2, 3, 4, 7, 10 +/-1, 15 +/- 1 and 30 +/-3).

127 Determination of bacterial counts in feces

128 All bacteriological analysis were performed following the PROBE guidelines. Fecal samples were stored
129 at 4°C after emission and transmitted to the bacteriologic laboratory after blinding. One hundred mg of
130 feces were conserved in 1 mL of Brain Heart Infusion medium at -80°C. On the day of the assay, fecal
131 samples were plated on specific agars and incubated for 48 hours in appropriate atmosphere, for
132 determination of the counts of micro-organisms expressed in colony forming units (CFU) per gram of
133 stool. Both ChromID ESBL (bioMérieux, France) and BLSE AES (AES Chemunex, France) agars were used

134 for identification of 3rd generation resistant enterobacteria, and total enterobacteria were counted after
135 plating on Drigalski agar (bioMérieux, France). *Enterococcus* spp. were studied using Enterococcosel agar
136 (Becton, Dickinson and Company, USA). Intestinal colonisation by noncommensal microorganisms were
137 studied using the following agars: Cétrimide (bioMerieux, France) for *P. aeruginosa*, Chapman (Becton,
138 Dickinson and Company, USA) for *S. aureus*, ChromID *Clostridium difficile* (bioMerieux, France) for *C.*
139 *difficile* and ChromID *Candida* (bioMerieux, France) for moulds. In case of positivity, counts were
140 determined by serial dilution on the appropriate agar. The limit of quantification was 2.0 log₁₀ CFU/g
141 for all microorganisms.

142 Analysis of the bacterial diversity within the microbiota

143 Samples obtained at days -15, -1, 4, 7, 10, and 30 were also analysed by 16S rRNA gene profiling.
144 Microbial DNA was extracted using QIAamp DNA stool Kit (Qiagen, Germany). The V3-V4 region of the
145 16S rRNA gene was then amplified using primers selected from (22). The PCR amplicons were sequenced
146 on a Illumina MiSeq platform according to the manufacturer's specifications (Illumina, San Diego, CA,
147 USA). Demultiplexing and quality filtering were performed using mothur (23). No mismatch was allowed
148 in the primers sequences in both forward and reverse primers, and quality-filtering was performed by
149 truncating bases at the 3' end with Phred quality score <25. Paired-end read assembly was then
150 performed with 100% overlap identity.

151 Following these pre-processing steps, chimera sequences were detected and eliminated using Vsearch
152 (24). Then, clustering of similar sequences (97% identity threshold for an affiliation at the genus level on
153 the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene) was performed through an open-reference OTU picking process
154 and complete-linkage method, finally creating groups of sequences or "Operational Taxonomic Units"
155 (OTUs). A final OTU cleaning step corresponding to the elimination of singletons and doubletons was
156 performed. Diversity in each fecal sample was estimated using 2 indices of diversity, the Shannon
157 diversity index (25) and the number of observed OTUs.

158 Determination of fecal antibiotic concentration

159 Active concentrations of ceftriaxone and cefotaxime in feces were measured by microbiological assay
160 (*E. coli* ATCC25922 for both antibiotics) on fecal samples collected between day -1 and day 10 after
161 incubation at 37°C for 24 hours, with a limit of quantification of 1.25 µg/g for both antibiotics.

162 **Endpoints**

163 Primary endpoint

164 The primary endpoint was the area under the curve between baseline and day 7 (AUC_{D0D7}) of the log-
165 counts of 3rd generation cephalosporins resistant enterobacteria.

166 Secondary endpoints

167 Secondary endpoints included the followings: AUC_{D0D15} of the variation from baseline of the log-counts
168 of 3rd generation cephalosporins resistant enterobacteria, AUC_{D0D7} and AUC_{D0D15} of the variation from
169 baseline of the log-counts of total enterobacteria, of *Enterococcus* spp. and of noncommensal
170 microorganisms of the digestive tract (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. difficile* and moulds) and proportion
171 of uncolonized subjects with the emergence 3rd generation cephalosporins resistant enterobacteria
172 (either on AES or ChromID ESBL agar) or noncommensal microorganisms in the intestinal tract between
173 day 1 and day 15.

174 Exploratory endpoints

175 In an exploratory analysis, we studied the bacterial diversity in the intestinal microbiota using the
176 Shannon index and the number of OTUs. For each subject, we computed the AUC_{D0D15} of the variation
177 from baseline of these two indices of bacterial diversity.

178 **Statistical methods**

179 The sample size was computed using data from the study by Michea-Hamzehpour et al. (17). In this
180 study, a median difference of 3 log₁₀ CFU/g was observed in the log-counts of the aerobic flora resistant
181 to 3rd generation cephalosporins, 7 days after a unique administration of either 2 g of ceftriaxone or 2 g
182 of cefotaxime. Assuming a common standard deviation of 2.2 log₁₀ CFU/gram of stool, the inclusion of
183 12 subjects in each group was required to evidence a difference between treatment groups, with a 90%
184 power and a type-I error of 0.05. Due to recruitment difficulties, inclusions were stopped on 04/18/2017.

185 At this date, 22 volunteers had been recruited (11 in each group). With this number, the power of the
186 trial was estimated to 86% using the above hypotheses.

187 We computed the variation from baseline (defined as day 0) of the bacterial and fungal counts in feces,
188 and determined the AUC_{D0D7} and AUC_{D0D15} using actual date and time of stools emission and the
189 trapezoidal method. For each subject, the baseline value was computed as the arithmetic mean of the
190 \log_{10} counts observed on available pre-treatment samples at days -15, -7 and -1. AUC_{D0D30} of diversity
191 indices were similarly computed. For each subject, the AUC_{D0D15} (respectively AUC_{D0D30}) was normalized
192 using the observed delay between day 0 and the actual time of collection of the day 15 (respectively day
193 30) sample.

194 Endpoints were compared between groups using bilateral non parametric Wilcoxon or Fisher exact's
195 tests, as appropriate, and a type-I error of 0.05.

196 Data are presented as median (min; max) or n (%), as appropriate. Statistical analyses were performed
197 using the SAS 9.4 software (SAS Institute, Cary, NC, USA).

198 **RESULTS**

199 **Subjects**

200 Thirty three subjects were screened and 22 subjects were randomized (11 in each treatment group).

201 None was secondary excluded and all participated to the trial until the end of follow up.

202 Overall, 6 (27.3%) were men. Median age was 28 years (18; 61), median weight was 71.1 kg (49.9; 87.0)

203 and median body mass index was 24.0 kg/m^2 (20.0; 28.9). Baseline characteristics according to

204 treatment group are presented in Table 1. No serious adverse events was reported, but one subject from

205 the cefotaxime group presented a vasovagal malaise while laying the last perfusion of cefotaxime.

206 Treatment was stopped for this subject who thus did not receive the last perfusion of antibiotic.

207 Overall, 3 fecal samples were missing among the 22 included subjects (one at day -15, one at day 3 and

208 one at day 30).

209 **3rd generation cephalosporins resistant enterobacteria**

210 At baseline, the median counts of resistant enterobacteria were $<2.0 \log_{10}$ CFU/g (<2.0 ; 5.4) in the
211 ceftriaxone group and $<2.0 \log_{10}$ CFU/g (<2.0 ; 2.8) in the cefotaxime group after plating on the AES agar
212 (Table 1). After plating on the ChromID ESBL agar, median counts of resistant enterobacteria at baseline
213 were $<2.0 \log_{10}$ CFU/g (<2.0 ; 5.7) and $<2.0 \log_{10}$ CFU/g (<2.0 ; <2.0) in the ceftriaxone and cefotaxime
214 groups, respectively. At baseline, 5 subjects (45.5%) and 1 subject (9.7%) were colonized with resistant
215 enterobacteria after plating either on AES or ChromID ESBL agars in the ceftriaxone and cefotaxime
216 groups, respectively.

217 The evolution of the variation of the log-counts of resistant enterobacteria according on the studied
218 agar is presented in the panels A and B of the Figure 1. No major change in the counts of resistant
219 enterobacteria was observed in any of the two treatment groups. The AUC_{D0D7} and normalized AUC_{D0D15}
220 of resistant enterobacteria were not significantly different between groups on both agars (Table 2).
221 Among uncolonized subjects, 1 subject (16.7%) and 2 subjects (20%) acquired a resistant enterobacteria
222 between the beginning of treatment and day 15 in the ceftriaxone and cefotaxime groups, respectively
223 (Table 3). This difference was not statistically significant ($p>0.99$).

224 **Total enterobacteria**

225 The median counts of total enterobacteria at baseline were $7.7 \log_{10}$ CFU/g (5.8; 8.7) and $7.8 \log_{10}$
226 CFU/g (3.3; 9.1) in the ceftriaxone and cefotaxime groups, respectively (Table 1). The evolution of the
227 change of total enterobacteria counts from baseline over time is presented in the Figure 1 (panel C).
228 Change from baseline of total enterobacteria counts was maximal on day 4 in both groups and reached
229 $-3.7 \log_{10}$ CFU/g (-7.4; -1.1) in the ceftriaxone group and -3.8 (-8.1; -1.6) in the cefotaxime group.
230 AUC_{D0D7} and AUC_{D0D15} of the variation of total enterobacteria counts were not significantly different
231 between treatment groups ($p=0.26$ and $p=0.066$, respectively, Table 2).

232 **Other microorganisms**

233 Observed counts at baseline of the other studied microorganisms are presented in Table 1. There was
234 no significant difference between groups in the AUC_{D0D7} and AUC_{D0D15} of the variation from baseline of
235 the counts of *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. difficile* or moulds (Table 2 and Figure 1,

236 panels D-H). Of note, none of the 22 included subjects was colonized by *C. difficile* before the beginning
237 of treatment. *C. difficile* carriage was detected in 3 patients, 1 (at day 10) in the ceftriaxone group and 2
238 (1 at day 4 and 1 at day 15) in the cefotaxime group, although the difference was not significant ($p>0.99$).
239 Results regarding the emergence of other noncommensal microorganism of the intestinal tract are
240 presented in Table 3.

241 **Bacterial diversity in feces**

242 In the ceftriaxone and cefotaxime groups, the median value of the Shannon index at baseline were 3.9
243 (3.2; 4.3) and 3.9 (3.0; 4.3), respectively. The median values of the number of OTUs were 441 (308; 577)
244 and 431 (282; 512) in the ceftriaxone and cefotaxime groups, respectively. The evolution of the changes
245 from baseline of the Shannon index and of the number of OTUs are presented in the Figure 2. The
246 maximal loss of the Shannon index was achieved at day 7 in the ceftriaxone group (-0.8 Shannon unit [-
247 2.9; 0.1]) and at day 4 in the cefotaxime group (-1.0 Shannon unit [-1.7; -0.3]). The AUC_{D0D30} of the
248 Shannon index was -11.5 (-25.7; 2.2) in the ceftriaxone group and -7.3 (-20.1; 12.1) in the cefotaxime
249 group. This difference was not significant ($p=0.40$). The maximal loss of the number of OTUs was -109 (-
250 275; 3) OTUs at day 7 in the ceftriaxone group, and -137 (-170; -48) OTUs at day 4 in the cefotaxime
251 group. The AUC_{D0D30} of the number of OTUs was -1391 (-5931; 682) in the ceftriaxone group and -1132
252 (-2372; 650) in the cefotaxime group. This difference was not significant ($p=0.52$). Detailed results are
253 presented in Table 2.

254 **Fecal active concentrations of antibiotics**

255 Most subjects exhibited undetectable concentrations of antibiotics in feces. In the ceftriaxone group, 1
256 subject had detectable concentrations of ceftriaxone between day 2 and day 7. Concentrations ranged
257 between 5.0 $\mu\text{g/g}$ and 93.7 $\mu\text{g/g}$. The maximal concentration was measured at day 4. In the cefotaxime
258 group, 1 subject had detectable concentrations of antibiotic in feces at day 4 (1.6 $\mu\text{g/g}$).

259 **DISCUSSION**

260 We present here the result of the CEREMI trial, aiming at comparing the impact of ceftriaxone and
261 cefotaxime on the intestinal microbiota using a standard dosing regimen in the clinical practice. Despite

262 known distinct biliary elimination (50% for ceftriaxone and 10% for cefotaxime), we did not observe any
263 significant difference, either in terms of phenotypic resistance emergence, or regarding the counts of
264 commensal or noncommensal microorganisms in the intestinal tract over time. The impact of antibiotic
265 treatment on bacterial diversity was not significantly different between treatment groups.

266 Preclinical and clinical data reported differences in cefotaxime and ceftriaxone pharmacokinetic
267 characteristics, in particular regarding their biliary elimination. Ceftriaxone biliary elimination has been
268 estimated to approximately 50% (26, 27), being 4 times higher than that of cefotaxime (28, 29). In their
269 animal study, van Ogtrop and colleagues treated mice either with cefoperazone, ceftriaxone, cefepime
270 or ceftazidime, whose intestinal elimination ranges from 0.2% to 37% of the administered dose (19).

271 Although all 4 cephalosporins exhibited similar effects on Gram negative bacteria, some differences
272 were observed. In particular, when higher doses were administered, the impact of antibiotics increased
273 with the fractional intestinal elimination, in particular regarding the overgrowth of antibiotic-resistant
274 *Citrobacter freundii*. However, differences in antibacterial spectrum and dosing regimens of studied
275 antibiotics in these animals might be part of these differences. In the CEREMI trial, we compared the
276 impact of two 3rd generation cephalosporins, whose antibacterial spectrum has previously been
277 reported to be similar to analyse specifically the impact of pharmacokinetic differences (30).

278 The most plausible explanation for the absence of difference might thus be that standard dosing
279 regimens of both antibiotics lead to intestinal concentrations that are high enough for the two
280 antibiotics to have similar impact. Nevertheless, this explanation is weakened by data of antibiotic
281 concentration measured in feces. Indeed, all but one volunteer from each treatment group exhibited
282 undetectable levels of antibiotic activity in feces. This might be due to the presence of endogenous
283 betalactamases in the feces. In the present trial, we measured the active concentration of antibiotics
284 using a microbiological assay. Several authors reported that betalactam antibiotics can be inactivated
285 by the enzymatic activity of the feces (31). In particular, using a semiquantitative test for measuring the
286 betalactamase activity in the fecal content, Leonard et al. observed that 2 of 6 volunteers treated by
287 ceftriaxone exhibited undetectable levels of antibiotic when betalactamase activity was detectable in

288 feces (32). This has been further illustrated by the administration of an oral betalactamase, which was
289 shown to reduce fecal concentrations of ceftriaxone (33). We cannot exclude that antibiotics impact the
290 microbiota in the upper part of the gastro-intestinal tract, while betalactamases located in the lower
291 part inactivate the antibiotic and decrease their fecal concentrations.

292 Despite the presence of low antibiotic concentrations at the distal part of the gut, total enterobacteria
293 were deeply affected by the 3-day course of both antibiotics. Their decrease was estimated to -30.7
294 CFU.day/g (-79.2; -12.4) and to -21.8 CFU.day/g (-37.5; 17.4) in the ceftriaxone and cefotaxime groups,
295 respectively. Similar findings were observed regarding bacterial diversity analysed through
296 metagenomic sequencing. We observed a maximal decrease of -0.8 (-2.9; 0.1) and -1.0 (-1.7; -0.3) units
297 of the Shannon index and -109 (-275; 3) and -137 (-170; -48) OTUs in the ceftriaxone and cefotaxime
298 groups, respectively.

299 The absence of difference regarding the emergence of phenotypic resistance among enterobacteria
300 might be explained by the design of the trial, which was performed in healthy volunteers. Included
301 subjects were young (median age of 28 years), and had not been exposed to the healthcare system in
302 the last preceeding 6 months nor exposed to repeated antibiotic treatments in the months before
303 inclusion in the trial. This community setting probably results in a low selective pressure, thereby limiting
304 the risk of colonisation with resistant bacterial strains. The exposition to the healthcare system of
305 patients requiring intravenous antibiotic therapy might be an additional factor that may explain the
306 differences observed in existing ecological studies between the 2 antibiotics (20, 21). Deeper analysis of
307 the resistance within the microbiota, such as the use of shotgun metagenomics for studying the fecal
308 content in resistance-conferring genes, would be of high value in order to draw a complete picture of
309 the possible difference of selective pressure between these 2 antibiotics.

310 Overall, our results suggest that the microbiota is highly susceptible to both ceftriaxone and cefotaxime,
311 which is in line with our results obtained regarding bacterial resistance.

312 This work has some limitations. First, we included only healthy volunteers. Our results might thus not
313 reflect the global effect of both antibiotics on the intestinal microbiota. Here, we aimed at analysing the

314 intrinsic impact of ceftriaxone and cefotaxime, avoiding confounding factors such as repeated antibiotic
315 treatments or frequent contact with the healthcare system. Another limitation is the absence of data
316 regarding the betalactamase activity in feces. This would have brought further details on the results
317 regarding fecal concentrations of antibiotics. This activity might also be used as a proxy of the exposure
318 of the intestinal microbiota to betalactam antibiotics.

319 This trial brings further insights on the comparison of ceftriaxone and cefotaxime impact on the
320 intestinal microbiota. Despite a rather low biliary elimination, cefotaxime exhibits a marked impact on
321 the microbiota. Under our experimental conditions, our results suggest that both drugs exert a similar
322 impact on the intestinal microbiota, extending what is already known on their antibacterial spectrum
323 for cultivable bacteria. They do not support the preferred choice of one of the two 3rd generation
324 cephalosporins in terms of either antibiotic selective pressure or microbiota dysbiosis. The extrapolation
325 of these results to a population of patients frequently exposed to antibiotics needs a specific study.

326 **Tables**

327 **Table 1.** Baseline characteristics of the 22 included subjects. Baseline counts of microorganisms were
 328 computed as the arithmetic mean of the log₁₀ counts observed on available pre-treatment samples at
 329 days -15, -7 and -1. Diversity indices at baseline were computed as the arithmetic mean of indices
 330 measured on samples obtained at days -15 and -1.

	Ceftriaxone (n=11)	Cefotaxime (n=11)
Clinical characteristics		
Gender : men (%)	2 (18)	4 (36)
Age (years)	30 (24; 55)	24 (18; 61)
Total body weight (kg)	72.0 (57.9; 78.4)	63.4 (49.9; 87.0)
Body mass index (kg/m ²)	24.6 (20.0; 28.7)	22.0 (18.6; 28.9)
Counts of microorganisms in feces (log₁₀ CFU/g)		
Resistant enterobacteria (AES agar)	<2.0 (<2.0; 5.4)	<2.0 (<2.0; 2.8)
Resistant enterobacteria (ChromID ESBL agar)	<2.0 (<2.0; 5.7)	<2.0 (<2.0; <2.0)
Total enterobacteria	7.7 (5.8; 8.7)	7.8 (3.3; 9.1)
<i>Enterococcus</i> spp.	6.2 (3.4; 9.2)	6.7 (3.3; 7.8)
<i>S. aureus</i>	<2.0 (<2.0; 4.2)	<2.0 (<2.0; 3.0)
<i>P. aeruginosa</i>	<2.0 (<2.0; 5.1)	<2.0 (<2.0; 2.7)
<i>C. difficile</i>	<2.0 (<2.0; <2.0)	<2.0 (<2.0; <2.0)
Moulds	<2.0 (<2.0; 2.7)	<2.0 (<2.0; 2.4)
Bacterial diversity indices		
Shannon index	3.9 (3.2 ; 4.3)	3.9 (3.0 ; 4.3)
Number of OTUs	441 (308 ; 577)	431 (282 ; 512)

331

332 **Table 2.** Area under the curve (AUC) of the variations from baseline of the counts of studied
 333 microorganisms between baseline and day 7 or day 15 in the fecal samples of the 22 included subjects.
 334 Baseline counts were computed as the arithmetic mean of the log₁₀ counts observed on pre-
 335 treatment samples. AUC_{D0D15} were normalized by the actual time observed between baseline and day
 336 15.

	Ceftriaxone (n=11)	Cefotaxime (n=11)	p-value
AUC_{D0D7} of raw bacterial counts (log₁₀ CFU.day/g)			
Resistant enterobacteria (AES agar)	0.0 (0.0; 23.4)	0.0 (0.0; 2.7)	0.40
Resistant enterobacteria (ChromID ESBL agar)	0.0 (0.0; 24.3)	0.0 (0.0; 1.5)	0.28
AUC_{D0D7} of counts change from baseline (log₁₀ CFU.day/g)			
Total enterobacteria	-14.8 (-30.0; -7.0)	-11.2 (-26.0; -6.2)	0.26
<i>Enterococcus</i> spp.	-0.3 (-8.6; 2.6)	-0.9 (-3.5; 4.1)	0.56
<i>S. aureus</i>	0.0 (-9.7; 1.3)	0.0 (-2.7; 1.7)	0.23
<i>P. aeruginosa</i>	0.0 (-8.4; 5.5)	0.0 (-4.0; 2.9)	0.87
<i>C. difficile</i>	0.0 (0.0; 0.0)	0.0 (0.0; 7.0)	0.36
Moulds	0.0 (-3.9; 18.4)	0.0 (-2.5; 2.4)	0.85
AUC_{D0D15} of counts change from baseline (log₁₀ CFU.day/g)			
Resistant enterobacteria (AES agar)	0.0 (-50.7; 40.3)	0.0 (-12.2; 4.9)	>0.99
Resistant enterobacteria (ChromID ESBL agar)	0.0 (-6.5; 44.6)	0.0 (0.0; 3.6)	0.79
Total enterobacteria	-30.7 (-79.2; -12.4)	-21.8 (-37.5; 15.9)	0.066
<i>Enterococcus</i> spp.	7.6 (-19.2; 14.2)	6.2 (0.5; 17.4)	0.74
<i>S. aureus</i>	1.2 (-18.5; 6.6)	0.0 (-7.3; 21.2)	0.82
<i>P. aeruginosa</i>	0.0 (-25.5; 13.6)	0.0 (-8.4; 7.0)	0.69
<i>C. difficile</i>	0.0 (0.0; 23.4)	0.0 (0.0; 9.0)	0.66
Moulds	0.0 (-10.5; 45.7)	0.0 (-6.5; 6.9)	0.72
AUC_{D0D30} of the change of diversity indices from baseline (unit.day)			
Shannon index	-11.5 (-25.7 ; 2.2)	-7.3 (-20.1 ; 12.2)	0.40
Number of OTUs	-1391 (-5931 ; 682)	-1132 (-2372; 650)	0.52

337

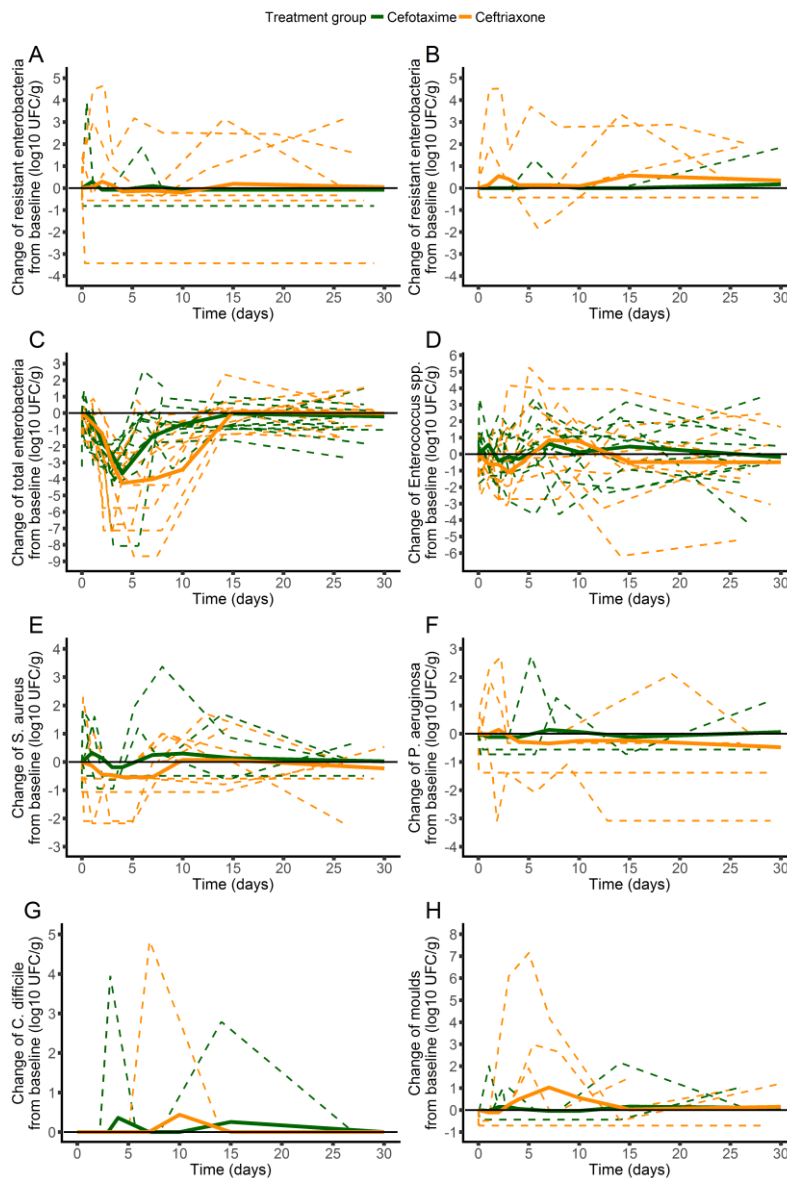
338 **Table 3.** Emergence of 3rd generation cephalosporins resistant enterobacteria or noncommensal
 339 microorganisms of the intestinal tract between day 1 and day 15 in included subjects. Only subjects
 340 who were not colonized before the beginning of treatment were included in the analysis. For resistant
 341 enterobacteria, results from either AES or ChromID ESBL agars were considered for definition of the
 342 emergence of resistance.

	Ceftriaxone		Cefotaxime		p-value
	Subjects at risk	Subjects colonized	Subjects at risk	Subjects colonized	
Resistant enterobacteria	6	1 (16.7%)	10	2 (20%)	>0.99
<i>S. aureus</i>	7	6 (85.7%)	8	3 (37.5%)	0.12
<i>P. aeruginosa</i>	8	1 (12.5%)	9	1 (11.1%)	>0.99
<i>C. difficile</i>	11	1 (9.1%)	11	2 (18.2%)	>0.99
Moulds	9	3 (33.3%)	10	4 (40%)	>0.99

343

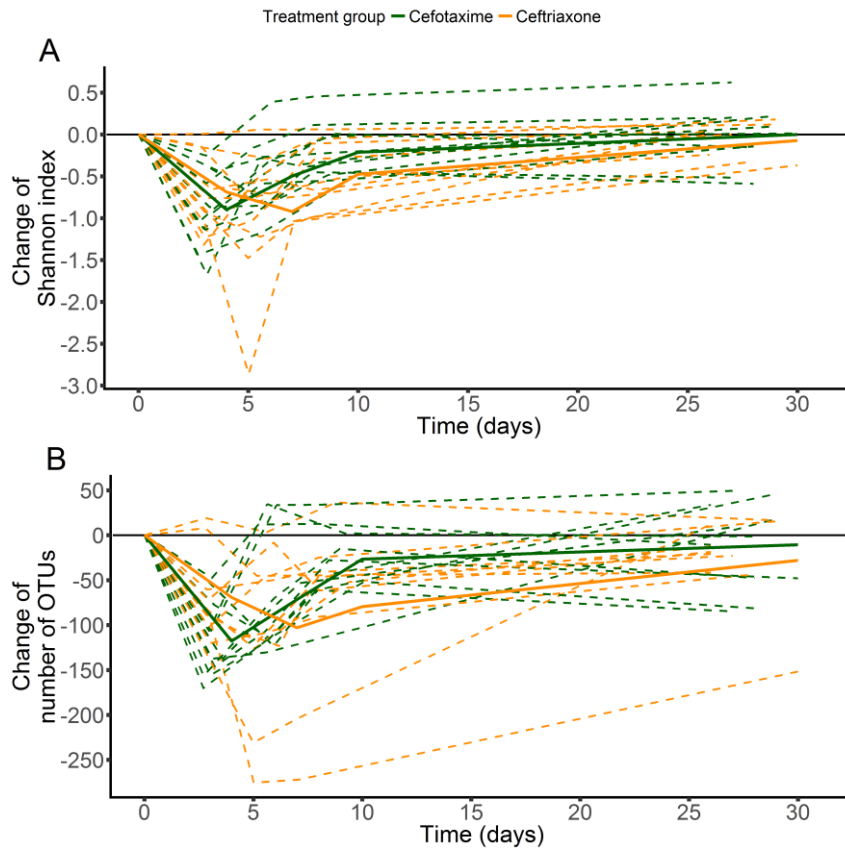
344 **Figures**

345 **Figure 1.** Evolution of the variations of the counts of the studied microorganisms from baseline to day
 346 30 in the fecal samples of included subjects treated by ceftriaxone (orange) or cefotaxime (green).
 347 Studied microorganisms included 3rd generation cephalosporin enterobacteria (measured on AES agar,
 348 panel A or ChromID ESBL agar, panel B), total enterobacteria (panel C), *Enterococcus* spp. (panel D), *S.*
 349 *aureus* (panel E), *P. aeruginosa* (panel F), *C. difficile* (panel G) and moulds (panel H). Dashed lines
 350 represent individual values, and plain thick lines represent the mean variation of the log-counts at each
 351 time.



352

353 **Figure 2.** Evolution of the variations of the Shannon index (panel A) and number of OTUs (panel B)
 354 from baseline to day 30 in the fecal samples of included subjects treated by ceftriaxone (orange) or
 355 cefotaxime (green). Dashed lines represent individual values, and plain thick lines represent the mean
 356 of the counts variation at each time.



357

358 **REFERENCES**

- 359 1. Harper K & Armelagos G (2010) The Changing Disease-Scape in the Third Epidemiological
360 Transition. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(2):675-697.
- 361 2. Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, & Angulo FJ (1998) Emergence of Multidrug-
362 Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 Infections in the United States. *The*
363 *New England Journal of Medicine* 338(19):1333-1338.
- 364 3. Gaynes R & Edwards JR (2005) Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative
365 Bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 41(6):848-854.
- 366 4. Reacher MH, Shah A, Livermore DM, Wale MC, Graham C, Johnson AP, Heine H, Monnickendam
367 MA, Barker KF, James D, & George RC (2000) Bacteraemia and Antibiotic Resistance of Its
368 Pathogens Reported in England and Wales between 1990 and 1998: Trend Analysis. *British*
369 *Medical Journal* 320(7229):213-216.
- 370 5. Jones RN, Low DE, & Pfaller MA (1999) Epidemiologic Trends in Nosocomial and Community-
371 Acquired Infections Due to Antibiotic-Resistant Gram-Positive Bacteria: The Role of
372 Streptogramins and Other Newer Compounds. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*
373 33(2):101-112.
- 374 6. Hsueh PR, Chen WH, & Luh KT (2005) Relationships between Antimicrobial Use and Antimicrobial
375 Resistance in Gram-Negative Bacteria Causing Nosocomial Infections from 1991-2003 at a
376 University Hospital in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(6):463-472.
- 377 7. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, & Andremont A (2013) Trends in Human Fecal Carriage of
378 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M.
379 *Clinical Microbiology Reviews* 26(4):744-758.
- 380 8. Andremont A (2003) Commensal Flora May Play Key Role in Spreading Antibiotic Resistance. *ASM*
381 *News* 69(12):601-607.
- 382 9. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, & Knight R (2012) The Impact of the Gut Microbiota on Human
383 Health: An Integrative View. *Cell* 148(6):1258-1270.

- 384 10. Chen Y & Blaser MJ (2008) Helicobacter Pylori Colonization Is Inversely Associated with Childhood
385 Asthma. *The Journal of Infectious Diseases* 198(4):553-560.
- 386 11. Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li H, Gao Z, Mahana D,
387 Zarate Rodriguez JG, Rogers AB, Robine N, Loke P, & Blaser MJ (2014) Altering the Intestinal
388 Microbiota During a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell*
389 158(4):705-721.
- 390 12. Cho I & Blaser MJ (2012) The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease. *Nature*
391 *Reviews Genetics* 13(4):260-270.
- 392 13. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, & Relman DA (2008) The Pervasive Effects of an Antibiotic on the
393 Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16s Rrna Sequencing. *PLOS Biology* 6(11):e280.
- 394 14. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, & Jansson JK (2007) Long-Term Ecological Impacts of Antibiotic
395 Administration on the Human Intestinal Microbiota. *The ISME Journal* 1(1):56-66.
- 396 15. Dethlefsen L & Relman DA (2011) Incomplete Recovery and Individualized Responses of the
397 Human Distal Gut Microbiota to Repeated Antibiotic Perturbation. *Proceedings of the National*
398 *Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1:4554-4561.
- 399 16. Ruppe E, Burdet C, Grall N, de Lastours V, Lescure FX, Andreumont A, & Armand-Lefevre L (2018)
400 Impact of Antibiotics on the Intestinal Microbiota Needs to Be Re-Defined to Optimize Antibiotic
401 Usage. *Clinical Microbiology and Infection* 24(1):3-5.
- 402 17. Michea-Hamzehpour M, Auckenthaler R, Kunz J, & Pechere JC (1988) Effect of a Single Dose of
403 Cefotaxime or Ceftriaxone on Human Faecal Flora. A Double-Blind Study. *Drugs* 35 Suppl 2:6-11.
- 404 18. Brautigam HH, Knothe H, & Rangoonwala R (1988) Impact of Cefotaxime and Ceftriaxone on the
405 Bowel and Vaginal Flora after Single-Dose Prophylaxis in Vaginal Hysterectomy. *Drugs* 35 Suppl
406 2:163-168.
- 407 19. van Ogtrop ML, Guiot HF, Mattie H, & van Furth R (1991) Modulation of the Intestinal Flora of
408 Mice by Parenteral Treatment with Broad-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrobial Agents and*
409 *Chemotherapy* 35(5):976-982.

- 410 20. Gbaguidi-Haore H, Dumartin C, L'Hériteau F, Pefau M, Hocquet D, Rogues AM, & Bertrand X (2013)
411 Antibiotics Involved in the Occurrence of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Nationwide Multilevel
412 Study Suggests Differences within Antibiotic Classes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*
413 68(2):461-470.
- 414 21. Grohs P, Kerneis S, Sabatier B, Lavollay M, Carbonnelle E, Rostane H, Souty C, Meyer G, Gutmann
415 L, & Mainardi JL (2014) Fighting the Spread of AmpC-hyperproducing *Enterobacteriaceae*:
416 Beneficial Effect of Replacing Ceftriaxone with Cefotaxime. *Journal of Antimicrobial*
417 *Chemotherapy* 69(3):786-789.
- 418 22. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, & Glockner FO (2013) Evaluation
419 of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-
420 Based Diversity Studies. *Nucleic Acids Research* 41(1):e1.
- 421 23. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB,
422 Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, & Weber CF (2009)
423 Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for
424 Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*
425 75(23):7537-7541.
- 426 24. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, & Mahe F (2016) VSearch: A Versatile Open Source Tool
427 for Metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
- 428 25. Shannon C (1948) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*
429 27:623-656.
- 430 26. Patel IH, Chen S, Parsonnet M, Hackman MR, Brooks MA, Konikoff J, & Kaplan SA (1981)
431 Pharmacokinetics of Ceftriaxone in Humans. *Antimicrob Agents Chemother* 20(5):634-641.
- 432 27. Patel IH & Kaplan SA (1984) Pharmacokinetic Profile of Ceftriaxone in Man. *The American Journal*
433 *of Medicine* 77(4C):17-25.

- 434 28. Kemmerich B, Lode H, Belmega G, Jendroschek T, Borner K, & Koeppe P (1983) Comparative
435 Pharmacokinetics of Cefoperazone, Cefotaxime, and Moxalactam. *Antimicrobial Agents and*
436 *Chemotherapy* 23(3):429-434.
- 437 29. Jehl F, Peter JD, Picard A, Dupeyron JP, Marescaux J, Sibilly A, & Monteil H (1987) [Biliary Excretion
438 of Cefotaxime and Desacetylcefotaxime]. *La Revue de Médecine Interne* 8(5):487-492.
- 439 30. Neu HC (1982) The in Vitro Activity, Human Pharmacology, and Clinical Effectiveness of New Beta-
440 Lactam Antibiotics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22:599-642.
- 441 31. Welling GW, Holtrop A, Sloomaker-van der Meulen C, Meijer-Severs GJ, van Santen E, Tonk RH,
442 de Vries-Hospers HG, & van der Waaij D (1992) Inactivation of Ceftriaxone by Faecal Enzyme
443 Preparations During Ceftriaxone Treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30(2):234-
444 236.
- 445 32. Leonard F, Andremont A, Leclercq B, Labia R, & Tancrede C (1989) Use of Beta-Lactamase-
446 Producing Anaerobes to Prevent Ceftriaxone from Degrading Intestinal Resistance to
447 Colonization. *The Journal of Infectious Diseases* 160(2):274-280.
- 448 33. Kokai-Kun JF, Roberts T, Coughlin O, Sicard E, Rufiange M, Fedorak R, Carter C, Adams MH,
449 Longstreth J, Whalen H, & Sliman J (2017) The Oral Beta-Lactamase Syn-004 (Ribaxamase)
450 Degrades Ceftriaxone Excreted into the Intestine in Phase 2a Clinical Studies. *Antimicrobial Agents*
451 *and Chemotherapy* 61(3):e02197-02116.

Chapitre 4. Discussion et perspectives

Les antibiotiques sont des médicaments essentiels en médecine humaine et vétérinaire, mais leur efficacité est compromise par l'émergence de la résistance aux antibiotiques, dans laquelle le microbiote intestinal est pressenti pour avoir un rôle important (177, 178). Par ailleurs, les méthodes récentes d'analyse des communautés bactériennes par séquençage de nouvelle génération ont permis d'apporter une lumière supplémentaire sur la composition des flores bactériennes, et sur l'effet dévastateur que les antibiotiques exercent sur ces communautés. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse visaient à quantifier l'effet des antibiotiques sur le microbiote intestinal, à la lumière des données apportées par ces nouvelles méthodes d'analyse, en particulier par le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S..

Dans un premier temps, nous avons utilisé les données d'études conduites dans un modèle animal de colite létale à *Clostridium difficile* induite par les antibiotiques pour analyser la relation entre la concentration fécale d'antibiotiques observée le jour de l'inoculation par *Clostridium difficile*, la perte de diversité induite par l'administration d'antibiotiques entre le début du traitement antibiotique et l'inoculation, et le décès des animaux.

Dans un premier travail, nous avons analysé la relation entre les concentrations fécales de moxifloxacine et le risque de mortalité dans ce modèle animal. Nous avons utilisé l'aptitude du DAV131A, un adsorbant à base de charbon actif, à réduire les concentrations fécales de moxifloxacine. Nous avons ainsi pu confirmer la relation concentration-dépendante du risque de décès animal et la quantifier précisément. Ce travail a par ailleurs permis de montrer que de faibles concentrations fécales de moxifloxacine conduisent à une perturbation suffisamment importante du microbiote intestinal pour permettre le développement de l'infection par *Clostridium difficile*, suggérant une forte sensibilité du microbiote intestinal des animaux à la moxifloxacine.

Dans le deuxième travail, nous avons utilisé l'effet du DAV131A sur les concentrations fécales d'antibiotiques pour analyser le lien entre les concentrations d'antibiotiques et la perte de diversité bactérienne mesurée par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S, et entre la perte de diversité bactérienne et la mortalité dans le modèle animal. Le résultat principal de ce travail est la mise en évidence d'une association entre la probabilité de décès et la perte de diversité bactérienne secondaire à l'administration d'antibiotiques. Une association entre la perte de diversité suite à une antibiothérapie et le développement d'une infection à *Clostridium difficile* avait déjà été rapportée (179). Dans un modèle murin d'infection à *Clostridium difficile*, des souris traitées par tigécycline, une

glyglycylcine, ou par céfopérazone, une céphalosporine de 3^{ème} génération, présentaient une chute de la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal, persistante après l'arrêt du traitement antibiotique. L'inoculation de spores de *Clostridium difficile* chez ces animaux était par ailleurs associée à l'apparition de signes d'infection, alors que des animaux contrôles non traités par antibiotiques ne développaient pas l'infection. L'originalité de notre travail réside dans le fait que la relation entre le niveau de perturbation du microbiote intestinal et le risque de mortalité n'avait pas été précisément quantifiée. Par ailleurs, le hamster doré est l'animal de laboratoire le plus sensible à l'infection à *Clostridium difficile*, le rendant ainsi particulièrement adapté aux travaux que nous avons menés. Nous avons ainsi pu prédire qu'une diminution relativement faible de la diversité bactérienne du microbiote intestinal était suffisante pour entraîner la mort de certains animaux. Nous avons également montré que la perte de diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal augmente avec les concentrations fécales d'antibiotiques, et est associée à un risque croissant de décès dans le modèle d'infection utilisé.

Par ailleurs, un grand nombre d'indices de diversité, issus pour la plupart du champ de l'écologie, sont actuellement disponibles et appliqués aux données provenant de l'analyse des microbiotes. Nous avons ainsi évalué les capacités des indices les plus couramment utilisés dans la littérature à prédire l'issue de l'infection à *Clostridium difficile*, afin de déterminer si certains indices apparaissaient comme de meilleurs prédicteurs que d'autres. Cette analyse a été réalisée à l'aide de la courbe ROC, qui permet l'évaluation globale des performances d'un prédicteur pour un événement binaire, tel que la survenue du décès au cours de l'étude. Nous avons observé que tous les indices de diversité étudiés avaient de bonnes capacités prédictives du décès suite à l'inoculation de spores de *Clostridium difficile*. Parmi les indices de diversité α étudiés – qui correspond à la diversité mesurée au sein d'un échantillon – l'indice de diversité de Shannon et le nombre de taxons bactériens présentaient les capacités prédictives les plus élevées. Ce travail a également guidé le choix des indices de diversité α analysés dans les deux travaux menés chez l'homme.

Ces travaux menés chez l'animal comportent malgré tout certaines limites qui méritent d'être discutées. Tout d'abord, les données bactériologiques de comptes fécaux de *Clostridium difficile* n'ont pas été prises en compte pour l'analyse du lien entre les concentrations fécales d'antibiotiques et la survenue du décès. Dans le premier travail en effet, nous avons observé que les comptes fécaux de *Clostridium difficile* avaient une capacité plus faible que les concentrations fécales de moxifloxacine à prédire le décès des animaux. Par ailleurs, l'existence de porteurs asymptomatiques de *Clostridium difficile* a été rapportée, et le mécanisme par lequel *Clostridium difficile* induit le développement d'une colite est la sécrétion de toxines dans la lumière intestinale (38). Dans le travail mené sur les hamsters, la prise en compte de ce paramètre n'a pas été possible. En effet, la variabilité de l'exposition du

microbiote intestinal aux antibiotiques a été obtenue en administrant conjointement à l'antibiotique des doses variables d'un adsorbant non spécifique – DAV131A – sur lequel les toxines de *Clostridium difficile* pouvaient s'adsorber, empêchant leur quantification précise. La méthode de mesure de la quantité de toxine n'était pas développée, empêchant ainsi l'intégration dans l'analyse de ce paramètre clé pour le développement de l'infection. Il n'est par ailleurs pas possible d'exclure que la réduction de la mortalité observée selon les groupes de doses d'adsorbant soit liée à une réduction de la quantité fécale de toxine bactérienne. Une perspective de ce travail mené chez l'animal est ainsi d'intégrer l'effet de l'adsorbant sur la réduction de la toxine pathogène pour l'estimation de son effet protecteur.

Ensuite, ces résultats n'ont été obtenus que dans un modèle animal d'infection à *Clostridium difficile*, et leur extrapolation directe à l'homme est difficile. Notamment, les analyses ont été menées en utilisant comme critère de jugement la mortalité animale au cours de l'étude. L'extrapolation entre mortalité animale et risque d'infection chez l'homme pour un certain degré de dysbiose n'est pas connue. De manière intéressante, la variation de l'indice de Shannon observée chez l'animal après 3 jours de traitement par moxifloxacine dans le deuxième travail de cette thèse (-1.7 [-3.0 ; -1.0]) était proche de la diminution maximale de l'indice de Shannon prédite par le modèle de l'évolution de l'indice de Shannon au cours du temps chez des volontaires sains, après un traitement de 5 jours par moxifloxacine (-1.2 [-1.3 ; -0.8]). Par ailleurs, dans une étude de type cas-témoins conduite auprès de patients présentant une infection à *Clostridium difficile* et de témoins indemnes de l'infection, la diversité bactérienne du microbiote intestinal était significativement moins élevée chez les cas que chez les témoins (180). Des éléments de réponses complémentaires pour l'analyse du lien entre dysbiose intestinale et survenue de l'infection chez l'homme devraient être apportés prochainement par l'étude européenne Anticipate, dont l'objectif principal est la détermination de l'incidence de l'infection à *Clostridium difficile* chez des patients de plus de 50 ans traités par antibiotiques. Dans cette étude observationnelle promue par l'Université d'Utrecht, conduite auprès de 1000 patients dans 6 pays européens, des échantillons fécaux ont été recueillis à l'initiation du traitement antibiotique, au 6^{ème} jour de traitement et lors de l'éventuelle survenue d'une infection à *Clostridium difficile*, pour analyse métagénomique. Cette étude permettra ainsi d'analyser le niveau de dysbiose associé à un risque de développement de l'infection en le considérant comme un biomarqueur.

Dans une deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes attachés à analyser l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal et son évolution au cours du temps, en utilisant des données générées aux cours d'essais cliniques conduits chez des volontaires sains. A la différence des travaux menés chez l'animal, nous avons utilisé des mesures de diversité bactérienne répétées dans le temps.

Le travail méthodologique de cette thèse a porté sur l'étude de la capacité de modèles mathématiques semi-mécanistiques à caractériser l'effet des concentrations fécales d'antibiotique sur la diversité bactérienne, et l'évolution d'indices de diversité bactérienne au sein du microbiote au cours du temps. A l'aide de modèles non linéaires à effets mixtes permettant l'analyse de l'ensemble des données longitudinales de tous les sujets simultanément, nous avons pu estimer les valeurs moyennes ainsi que la variabilité interindividuelle avec une bonne précision pour presque tous les paramètres. Cette estimation a été permise grâce à l'utilisation de l'algorithme d'estimation SAEM, implémenté dans le logiciel Monolix. Malgré la complexité des analyses bactériologiques utilisées, reposant sur l'analyse métagénomique ciblant le gène de l'ARN ribosomique 16S, nous avons pu montrer que des modèles mathématiques classiques en analyse pharmacocinétique-pharmacodynamique peuvent prédire de façon satisfaisante l'évolution au cours du temps des indices de diversité du microbiote intestinal. Dans ces modèles, la diversité a été considérée comme un biomarqueur, dont la vitesse d'élimination est augmentée par la présence d'antibiotiques de manière concentration-dépendante. Ces modèles mathématiques basés sur des équations différentielles ordinaires sont particulièrement intéressants. Ils permettent de calculer précisément l'aire sous la courbe de la diversité bactérienne au cours du temps. Cette métrique fournit une mesure globale de l'impact des antibiotiques sur le microbiote, qui tient compte à la fois de l'ampleur de la perturbation et de la durée pendant laquelle la perturbation persiste. En fournissant une valeur unique pour chaque sujet, elle permet par ailleurs de contourner le problème d'inflation du risque de première espèce introduit par la répétition des tests statistiques dans le cas de données longitudinales.

Couplée à l'utilisation d'effets mixtes, ce modèle mathématique nous a permis d'estimer la dysbiose globale induite par un traitement antibiotique, malgré le nombre limité d'échantillons par sujets, et de caractériser sa variabilité interindividuelle. Les effets mixtes sont particulièrement utiles du fait de la difficulté à obtenir des échantillons de selles répétés en recherche biomédicale, notamment chez des patients. Un nombre limité d'échantillons par sujet apparaît ainsi suffisant pour caractériser de manière satisfaisante l'impact d'une intervention sur le microbiote intestinal. Cette approche de modélisation permet également la comparaison de l'impact de différentes stratégies thérapeutiques par simulation.

Une limite de ce travail méthodologique est que nous nous sommes restreints à l'analyse d'indices de diversité, sans analyser l'évolution individuelle des différents taxons bactériens. En effet, plusieurs travaux ont rapporté l'association entre certains taxons bactériens et la survenue d'un évènement, telle que la présence de *Faecalibacterium praunitzii* et la récurrence de maladie de Crohn iléale (181). Cette analyse permettrait en effet une meilleure visualisation des modifications de la composition du microbiote intestinale suite à un traitement antibiotique. Elle a été limitée par le faible nombre de

sujets inclus dans l'analyse. Par ailleurs, les méthodes d'analyse métagénomique ne fournissent que des quantifications relatives des différents taxons bactériens, alors que des comptes absolus sont nécessaires pour l'application de modèles pharmacodynamiques tels que ceux présentés en introduction et utilisés ici pour l'analyse de la diversité. Cette difficulté pourrait être contournée par le couplage de ces données à celles issues de l'analyse par cytométrie en flux, récemment proposée (182). Malgré tout, l'utilisation d'indices de diversité, relativement simples à déterminer, apparaît séduisante pour une application clinique ou pour guider les cliniciens dans le choix du traitement antibiotique dont l'effet sur le microbiote intestinal est le plus faible.

Le modèle mathématique développé dans le cadre de ce travail de thèse permettra également une meilleure individualisation des traitements antibiotiques. Dans le champ des maladies infectieuses, la modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique est de plus en plus utilisée afin de déterminer la dose d'antimicrobien permettant de maximiser l'efficacité thérapeutique. Cette efficacité est le plus souvent déterminée à l'aide de paramètres intégrant l'exposition des patients à l'antibiotique et la sensibilité bactérienne vis-à-vis de l'antibiotique, mesurée au travers de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette dernière, facilement mesurable en routine au laboratoire, correspond à la plus petite concentration de l'antibiotique capable *in vitro* d'empêcher la croissance bactérienne après un contact de 18 à 24 heures. Trois paramètres pharmacocinétiques-pharmacodynamiques sont principalement utilisés : le pourcentage de temps passé au-dessus de la CMI, le rapport entre la concentration plasmatique maximale de l'antibiotique et la CMI, et le rapport entre l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de l'antibiotique en fonction du temps et la CMI (ASC/CMI). Plusieurs études ont montré que ces paramètres pharmacocinétiques-pharmacodynamiques étaient prédictifs de l'efficacité thérapeutique, notamment concernant les aminosides, les fluoroquinolones et les β -lactamines (183, 184). En utilisant les données collectées dans le cadre d'un essai thérapeutique multicentrique chez des patients traités par amikacine, un antibiotique de la classe des aminosides, suspects de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique, nous avons développé un modèle de l'évolution des concentrations plasmatiques d'antibiotique au cours du temps à l'aide de modèles non linéaires à effets mixtes. Nous avons ensuite pu évaluer par simulation la probabilité d'atteindre la cible pharmacocinétique-pharmacodynamique habituellement utilisée lors d'un traitement par aminoside, pour différentes doses et selon différentes CMI théoriques (voir l'article 5 en annexe). Nous avons ainsi pu montrer qu'une dose d'amikacine de 25 mg/kg était nécessaire pour obtenir une probabilité d'atteinte de la cible thérapeutique supérieure à 90%, dans le cas d'une souche bactérienne sensible.

Ces modèles sont de plus en plus utilisés pour tenir compte des modifications des paramètres pharmacocinétiques des antibiotiques observés notamment chez les patients hospitalisés en

réanimation (185), dans le but de maximiser l'efficacité thérapeutique. Afin de prendre en compte à la fois l'impératif de maximisation de la réponse aux traitements antibiotiques et de minimisation de l'effet néfaste des antibiotiques sur le microbiote intestinal, les perspectives des travaux de modélisation réalisés chez l'homme sont de développer un algorithme d'optimisation des traitements antibiotiques tenant compte de ces deux contraintes.

Dans le contexte actuel d'antibiorésistance croissante, il est nécessaire d'identifier des solutions permettant la protection du microbiote intestinal afin de prévenir l'acquisition et la sélection de souches bactériennes résistantes. Les cliniciens utilisent habituellement les antibiotiques dont l'impact sur le microbiote intestinal est minimal, compte tenu des données disponibles sur la sensibilité aux antibiotiques de la souche bactérienne responsable de l'infection. Cependant, les données soutenant le choix de la molécule sont le plus souvent parcellaires. Un certain nombre d'études ont fait état de l'impact que les antibiotiques exercent sur le microbiote intestinal, mais ces études ont le plus souvent utilisé des protocoles expérimentaux différents, et se sont appliquées à caractériser l'impact des antibiotiques sur le plan phénotypique. Peu d'études ont utilisé les méthodes de séquençage de nouvelle génération pour analyser l'impact d'un antibiotique donné (85, 96, 186-188). Le classement des antibiotiques selon l'impact qu'ils exercent sur le microbiote intestinal est ainsi difficile. En effet, le spectre clinique usuel des antibiotiques ne semble pas être un bon reflet de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal. Par exemple, l'érythromycine est un macrolide dont le spectre clinique est habituellement considéré étroit du fait d'une efficacité sur les seules bactéries à Gram positif chez l'homme, mais les concentrations atteintes dans les selles sont suffisamment élevées pour observer un impact sur certaines bactéries à Gram négatif, telles que les entérobactéries (189). Par ailleurs, l'utilisation de données issues d'études conduites chez des patients rendent difficile l'interprétation des résultats, du fait de facteurs de confusion, de l'administration fréquente de multi-antibiothérapies notamment en réanimation, ou d'antibiothérapies répétées. L'utilisation d'un modèle expérimental tel que les volontaires sains exempts d'exposition récente aux antibiotiques est ainsi bien adaptée pour estimer l'impact intrinsèque des antibiotiques sur la diversité bactérienne au sein du microbiote intestinal.

Dans le cadre de l'identification de stratégies permettant la limitation de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal, le 4^{ème} travail de cette thèse visait à comparer l'impact de la ceftriaxone et du céfotaxime administrés à des doses standard en pratique clinique sur le microbiote intestinal. Malgré des différences notables en termes de propriétés pharmacocinétiques de ces deux antibiotiques (50% d'élimination biliaire pour la ceftriaxone contre 10% pour le céfotaxime), nous n'avons pas observé de différence significative, tant sur le plan de l'émergence phénotypique de la

résistance, que sur celui de l'impact sur les germes commensaux ou non commensaux du microbiote intestinal. L'impact sur la diversité bactérienne n'était pas non plus différent entre les deux molécules. Globalement, ces résultats suggèrent que les deux molécules exercent un effet similaire sur le microbiote intestinal, étendant ainsi ce qui est déjà connu concernant leur spectre phénotypique. Une explication possible de cette absence de différence entre les deux antibiotiques est que les doses utilisées conduisent à des niveaux d'exposition fécale suffisamment élevés pour que l'impact des deux molécules soit similaire, de la même façon que les concentrations fécales de moxifloxacin mesurées dans le 3^{ème} travail de cette thèse dépassaient largement l'EC₅₀. Cependant, les concentrations fécales des deux céphalosporines n'atteignaient des niveaux détectables que chez un seul volontaire de chaque groupe, y compris au dernier jour de traitement. Dans ce travail, les concentrations fécales d'antibiotique ont été mesurées par méthode microbiologique. Cette observation peut être expliquée par la présence de β -lactamases endogènes dans les selles des volontaires. Plusieurs auteurs ont en effet rapporté que les β -lactamines peuvent être inactivées par l'activité β -lactamase présente dans les fèces (190, 191). Malgré ces faibles concentrations fécales, les deux céphalosporines de 3^{ème} génération présentaient un effet marqué de réduction des comptes d'entérobactéries totales et de la diversité bactérienne. Le retour de ces deux paramètres au niveau pré-thérapeutique n'était pas immédiat après l'arrêt du traitement. Les perspectives de ce travail sont de poursuivre la comparaison des deux molécules à un niveau plus fin, notamment concernant l'analyse du résistome et de la composition du microbiote intestinal. En effet, dans le cadre du projet PrediRes retenu à l'appel d'offre générique 2016 de l'Agence Nationale de la Recherche, nous avons prévu de réaliser une analyse par métagénomique non ciblée des échantillons fécaux, afin d'étudier l'évolution du contenu en gènes de résistance du microbiote intestinal. L'analyse de la diversité intra-espèce est également prévue, en prenant l'exemple de la bactérie *Escherichia coli*, de même que l'analyse du rôle des phages dans la modification de la composition du microbiote et du contenu en gènes de résistance. Ces analyses sont actuellement en cours, en lien avec l'unité IAME de l'Inserm pour l'analyse de la métapopulation d'*Escherichia coli*, avec l'Institut Pasteur pour l'analyse des phages du tube digestif et avec l'Institut National pour la Recherche Agronomique pour le résistome. Une autre perspective de ce travail est la modélisation de l'évolution longitudinale des données de comptes d'entérobactéries totales et des indices de diversité bactérienne au cours du temps.

Les travaux menés dans cette thèse chez les volontaires sains ont permis de montrer que le microbiote intestinal est très sensible à l'administration d'antibiotiques. En effet, nous avons pu observer que la réduction de la diversité bactérienne survient rapidement après le début du traitement antibiotique, dès la première dose administrée. Dans le 3^{ème} travail, malgré une estimation peu précise du paramètre de sensibilité EC₅₀, nous avons observé que les concentrations fécales de moxifloxacin

dépassent très rapidement et très largement la valeur estimée, et restaient supérieures à la borne supérieure de son intervalle de confiance à 95% près de 10 jours après la dernière administration d'antibiotique. Dans les deux travaux menés chez l'homme, la réduction maximale observée de l'indice de Shannon était similaire pour les 3 antibiotiques étudiés, de l'ordre d'une unité. Ces résultats ont été observés malgré des plans expérimentaux différents, la moxifloxacine étant administrée pendant 5 jours par voie orale tandis que les deux céphalosporines étaient administrées pendant seulement 3 jours par voie intraveineuse. Le nombre de taxons bactériens semblait cependant affecté de façon différente entre les deux essais. De ces travaux, nous pouvons conclure que les résultats de l'étude de l'impact d'une intervention sur le microbiote intestinal peuvent varier selon l'indice de diversité étudié, et qu'il est nécessaire d'inclure plusieurs de ces indices lors de ce type d'évaluation, afin d'avoir une vision globale de la perturbation induite.

Dans cette thèse, nous nous sommes concentrés sur l'analyse du lien entre l'exposition fécale aux antibiotiques, la dysbiose intestinale secondaire et – pour les études conduites chez l'animal – la mortalité dans un modèle d'infection à *Clostridium difficile*. Un résultat important de ces deux études animales est la protection apportée par DAV131A vis-à-vis du développement de l'infection et de la mortalité. En effet, les connaissances accumulées sur le rôle clé du microbiote intestinal sur la santé humaine ont souligné l'importance de l'homéostasie du microbiote, et un certain nombre d'approches sont actuellement à l'étude afin de protéger le microbiote notamment de l'effet délétère des antibiotiques. Citons notamment l'administration de l'adsorbant DAV132, équivalent de DAV131A formulé spécifiquement pour être libéré au niveau de l'iléon terminal et du colon chez l'homme (176), de la β -lactamase recombinante SYN-004, dont l'utilisation s'est avérée efficace pour réduire l'impact d'un traitement par ceftriaxone sur la diversité du microbiote (192), ou de la transplantation fécale, qui permet de traiter efficacement les récurrences d'infection à *Clostridium difficile* résistantes aux traitements médicamenteux (193).

Dans les deux études animales, nous avons montré que l'administration de DAV131A fournit une protection dose-dépendante contre la dysbiose induite par les antibiotiques et la mortalité qui en résulte. Dans le premier travail, nous avons mis en évidence que l'horaire de l'administration du DAV131A par rapport au début du traitement antibiotique n'avait pas d'influence significative sur l'effet protecteur vis-à-vis de la mortalité, et sur la réduction des concentrations fécales. Le nombre d'administrations quotidiennes ne semblait pas non plus influencer l'effet de l'adsorbant, bien que ces résultats n'aient été obtenus que sur un petit nombre d'animaux. Un point particulièrement intéressant sur le plan clinique est l'effet protecteur supplémentaire résultant de l'administration d'une dose supplémentaire de DAV131A plusieurs heures avant le début du traitement antibiotique.

En effet, si cet effet était également observé chez l'homme, cela permettrait d'apporter une protection supplémentaire du microbiote intestinal vis-à-vis des effets néfastes des antibiotiques, au moins dans les situations dans lesquelles l'antibiothérapie peut être programmée, comme c'est le cas par exemple en antibioprophylaxie. La transposition de ces résultats à l'homme, notamment de la dose d'adsorbant permettant d'obtenir chez l'homme un niveau de protection similaire à celui observé chez l'animal, reste toutefois très difficile : les deux espèces diffèrent en termes de transit intestinal, et probablement de pharmacocinétique. Les concentrations maximales de moxifloxacine mesurées dans les études hamsters sont cependant comparables aux concentrations observées chez l'homme suivant un traitement usuel en pratique clinique.

Chez l'homme, le développement de l'adsorbant est actuellement en cours. Dans l'essai de phase 1 dont une partie des données ont été utilisées pour le 3^{ème} travail de cette thèse, les résultats sont très encourageants. En effet, l'administration de 7.5 g de DAV132 trois fois par jour a permis une réduction de 99% de l'exposition fécale aux antibiotiques, mesurée par l'aire sous la courbe des concentrations entre le début du traitement et le 16^{ème} jour après le début du traitement (176). Les concentrations plasmatiques de moxifloxacine n'étaient pas modifiées par l'administration de l'adsorbant. En utilisant la méthode de séquençage non ciblé des génomes bactériens, nous avons montré que la richesse bactérienne était préservée par la co-administration de DAV132 au cours du traitement antibiotique. Cette approche semble ainsi particulièrement prometteuse, du fait du large spectre d'activité potentiel de ce produit.

Dans le cadre du développement clinique du DAV132, une étude dose-réponse réalisée chez des volontaires sains a récemment été terminée. Dans cette étude, 12 groupes de 12 volontaires ont été constitués. Parmi eux, 11 groupes ont été traités par moxifloxacine (400 mg/j) pendant 5 jours, soit seule, soit associée à différentes doses de DAV132 (entre 2g/j et 22.5 g/j). Le critère principal de cet essai était l'aire sous la courbe des concentrations fécales de moxifloxacine libre entre le début du traitement et 16 jours après le début du traitement. Certains échantillons fécaux ont par ailleurs été analysés par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S. Les résultats de cet essai seront présentés à l'ECCMID en avril 2018. De même que dans les études animales, une réduction dose-dépendante des concentrations fécales de moxifloxacine a été observée. Une protection dose-dépendante de la diversité bactérienne a également été mise en évidence. Une perspective de cette thèse, dans la continuité du travail réalisé dans le 3^{ème} article, est le développement d'un modèle de l'effet protecteur de l'administration de DAV132 sur la diversité bactérienne, intégrant l'effet dose-réponse de DAV132 sur les concentrations fécales de moxifloxacine. Ce travail aidera à identifier, dans le cas d'un traitement par moxifloxacine chez l'homme, la dose de DAV132 nécessaire pour réduire l'impact de la moxifloxacine sur le microbiote intestinal, en utilisant par ailleurs les résultats de l'étude Anticipate

présentée plus haut. Il permettra également de pallier aux limites du 3^{ème} travail de cette thèse, en améliorant l'estimation des paramètres du modèle de l'effet de la moxifloxacin sur le microbiote intestinal, notamment concernant la sensibilité du microbiote intestinal à la moxifloxacin, au travers du paramètre EC₅₀. Des concentrations fécales de moxifloxacin de niveau intermédiaires sont en effet observées dans certains groupes de dose.

Une autre perspective de cette thèse, dans la continuité du travail sur l'analyse des moyens de protéger le microbiote intestinal contre l'impact des antibiotiques, s'inscrit dans le cadre du programme transversale « Microbiote » de l'Inserm, lancé en 2016. Dans ce programme, nous avons proposé de conduire un essai clinique randomisé en plan factoriel visant à comparer l'impact de deux durées de traitement par moxifloxacin, 3 jours et 7 jours, sur le microbiote intestinal, et à analyser l'effet correcteur de la transplantation fécale autologue administrée plusieurs jours après l'arrêt du traitement antibiotique. Dans ce projet, outre l'analyse de la diversité bactérienne et du contenu du microbiote intestinal en gènes conférant la résistance aux antibiotiques, nous avons prévu une collaboration avec le Laboratoire d'Etudes du Métabolisme des Médicaments du Comité à l'Energie Atomique, dirigé par le Dr François Fenaille, pour analyser les métabolites du microbiote intestinal et leur évolution au cours du traitement antibiotique, ainsi que l'effet de la transplantation fécale autologue pour en restaurer l'état pré-thérapeutique. Ce travail, qui a fait l'objet d'une demande de financement auprès de l'Agence Nationale de la Recherche en mars 2018, est actuellement en développement. Il permettra notamment une analyse à un niveau plus fin de l'impact des antibiotiques. En effet, si les études utilisant l'analyse métagénomique réalisées jusque-là ont révélé une grande variabilité intrer-individuelle de la composition taxonomique du microbiote intestinal, les voies métaboliques codées présentes dans cet écosystème bactérien semblent relativement peu variables entre les individus (194). Ce niveau d'analyse supplémentaire permettra ainsi de compléter l'analyse de l'impact d'une antibiothérapie sur le microbiote intestinal. Les données répétées de microbiote recueillies dans cet essai seront également analysées par modélisation, afin de fournir une information quantitative sur le lien entre la durée de traitement antibiotique et l'impact observé sur le microbiote intestinal. Cela permettra de générer des données préliminaires pour le design d'essais cliniques visant à réduire les durées d'antibiothérapies actuellement recommandées.

En conclusion, ce travail de thèse se situe dans le cadre de la lutte contre les effets néfastes des antibiotiques sur le microbiote intestinal. Nous espérons avoir contribué à mieux comprendre les mécanismes de l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal et sa diversité bactérienne. Nous

avons exploré le lien entre la perte de diversité bactérienne et la survenue du décès dans un modèle animal à *Clostridium difficile*, en montrant l'existence d'une relation quantitative entre les deux paramètres, appuyant ainsi l'utilisation de données issues de l'analyse métagénomique du microbiote intestinal comme biomarqueurs d'un évènement clinique. Nous avons également proposé un modèle de l'évolution de ce biomarqueur au cours du temps, en analysant la relation entre la concentration fécale d'antibiotique et la diversité bactérienne, et analysé l'impact de différents antibiotiques sur le microbiote intestinal. Ces travaux contribueront au développement de stratégies limitant l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal, tant sur le plan de l'optimisation des traitements antibiotiques, pour le choix de la molécule ou de la dose administrée, que sur celui du développement d'interventions visant à réduire l'effet des concentrations résiduelles d'antibiotiques qui atteignent le tube digestif après administration.

Bibliographie

1. Lederberg J & Mccray AT (2001) 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury Of Words. *The Scientist* 15(7).
2. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, Knight R, & Ley RE (2014) Conducting A Microbiome Study. *Cell* 158(2):250-262.
3. Sommer F & Backhed F (2013) The Gut Microbiota--Masters Of Host Development And Physiology. *Nature Reviews Microbiology* 11(4):227-238.
4. Lofgren ET, Cole SR, Weber DJ, Anderson DJ, & Moehring RW (2014) Hospital-Acquired *Clostridium difficile* Infections: Estimating All-Cause Mortality And Length Of Stay. *Epidemiology* 25(4):570-575.
5. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, Beldavs ZG, Dumyati GK, Dunn JR, Farley MM, Holzbauer SM, Meek JI, Phipps EC, Wilson LE, Winston LG, Cohen JA, Limbago BM, Fridkin SK, Gerding DN, & Mcdonald LC (2015) Burden Of *Clostridium difficile* Infection In The United States. *The New England Journal Of Medicine* 372(9):825-834.
6. Andremont A (2003) Role Of The Commensal Flora In The Spread Of Bacterial Resistance : The Invisible Collateral Damage Of Antibiotic Treatments. *ASM News*:601–607.
7. ANSM (2013) Caractérisation Des Antibiotiques Considérés Comme « Critiques».
8. Nguyen TT, Guedj J, Chachaty E, De Gunzburg J, Andremont A, & Mentre F (2014) Mathematical Modeling Of Bacterial Kinetics To Predict The Impact Of Antibiotic Colonic Exposure And Treatment Duration On The Amount Of Resistant Enterobacteria Excreted. *Plos Computational Biology* 10(9):E1003840.
9. Ley RE, Peterson DA, & Gordon JI (2006) Ecological And Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity In The Human Intestine. *Cell* 124(4):837-848.
10. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, & Finlay BB (2010) Gut Microbiota In Health And Disease. *Physiological Reviews* 90(3):859-904.
11. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, & Wang J (2010) A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established By Metagenomic Sequencing. *Nature* 464(7285):59-65.

12. Sullivan A, Edlund C, & Nord CE (2001) Effect Of Antimicrobial Agents On The Ecological Balance Of Human Microflora. *The Lancet. Infectious Diseases* 1(2):101-114.
13. Rashid MU, Weintraub A, & Nord CE (2012) Effect Of New Antimicrobial Agents On The Ecological Balance Of Human Microflora. *Anaerobe* 18(2):249-253.
14. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, & Gordon JI (2007) The Human Microbiome Project. *Nature* 449(7164):804-810.
15. Woese CR, Fox GE, Zablen L, Uchida T, Bonen L, Pechman K, Lewis BJ, & Stahl D (1975) Conservation Of Primary Structure In 16S Ribosomal Rna. *Nature* 254(5495):83-86.
16. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, & Rossello-Mora R (2014) Uniting The Classification Of Cultured And Uncultured Bacteria And Archaea Using 16S rRNA Gene Sequences. *Nature Reviews Microbiology* 12(9):635-645.
17. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, & Weber CF (2009) Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software For Describing And Comparing Microbial Communities. *Applied And Environmental Microbiology* 75(23):7537-7541.
18. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, & Knight R (2010) Qiime Allows Analysis Of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nature Methods* 7(5):335-336.
19. Hill TC, Walsh KA, Harris JA, & Moffett BF (2003) Using Ecological Diversity Measures With Bacterial Communities. *FEMS Microbiology Ecology* 43(1):1-11.
20. Chao A (1984) Nonparametric Estimation Of The Number Of Classes In A Population. *Scandinavian Journal Of Statistics* 11(4):265-270.
21. Shannon C (1948) A Mathematical Theory Of Communication. *The Bell System Technical Journal* 27:623-656.
22. Simpson EH (1949) Measurement Of Diversity. *Nature* 163:688.
23. Bray JR & Curtis JT (1957) An Ordination Of The Upland Forest Communities Of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27(4):325-349.
24. Lozupone C & Knight R (2005) Unifrac: A New Phylogenetic Method For Comparing Microbial Communities. *Applied And Environmental Microbiology* 71(12):8228-8235.

25. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, & Knight R (2007) Quantitative And Qualitative Beta Diversity Measures Lead To Different Insights Into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied And Environmental Microbiology* 73(5):1576-1585.
26. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, & Knight R (2012) The Impact Of The Gut Microbiota On Human Health: An Integrative View. *Cell* 148(6):1258-1270.
27. O'Hara AM & Shanahan F (2006) The Gut Flora As A Forgotten Organ. *EMBO Reports* 7(7):688-693.
28. Tamburini S, Shen N, Wu HC, & Clemente JC (2016) The Microbiome In Early Life: Implications For Health Outcomes. *Nature Medicine* 22(7):713-722.
29. Clemente JC, Manasson J, & Scher JU (2018) The Role Of The Gut Microbiome In Systemic Inflammatory Disease. *British Medical Journal* 360:J5145.
30. Leung C, Rivera L, Furness JB, & Angus PW (2016) The Role Of The Gut Microbiota In NAFLD. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 13(7):412-425.
31. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, & Mazmanian SK (2016) The Central Nervous System And The Gut Microbiome. *Cell* 167(4):915-932.
32. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, & Turnbaugh PJ (2014) Diet Rapidly And Reproducibly Alters The Human Gut Microbiome. *Nature* 505(7484):559-563.
33. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, & Lewis JD (2011) Linking Long-Term Dietary Patterns With Gut Microbial Enterotypes. *Science* 334(6052):105-108.
34. Tedesco FJ, Barton RW, & Alpers DH (1974) Clindamycin-Associated Colitis. A Prospective Study. *Annals Of Internal Medicine* 81(4):429-433.
35. Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB, Eriksson S, Granstrom G, Lagergren L, Englund G, Nord CE, & Svenungsson B (2001) Frequency Of Antibiotic-Associated Diarrhoea In 2462 Antibiotic-Treated Hospitalized Patients: A Prospective Study. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 47(1):43-50.
36. McFarland LV (1998) Epidemiology, Risk Factors And Treatments For Antibiotic-Associated Diarrhea. *Digestive Diseases* 16(5):292-307.
37. Levine J, Dykoski RK, & Janoff EN (1995) Candida-Associated Diarrhea: A Syndrome In Search Of Credibility. *Clinical Infectious Diseases* 21(4):881-886.
38. Leffler DA & Lamont JT (2015) *Clostridium difficile* Infection. *The New England Journal Of Medicine* 372(16):1539-1548.

39. Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, Wilcox MH, & Kuijper EJ (2016) European Society Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases: Update Of The Diagnostic Guidance Document For *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Microbiology And Infection* 22 Suppl 4:S63-81.
40. Knetsch CW, Connor TR, Mutreja A, Van Dorp SM, Sanders IM, Browne HP, Harris D, Lipman L, Keessen EC, Corver J, Kuijper EJ, & Lawley TD (2014) Whole Genome Sequencing Reveals Potential Spread Of *Clostridium difficile* Between Humans And Farm Animals In The Netherlands, 2002 To 2011. *Eurosurveillance* 19(45):20954.
41. Anderson DJ, Chen LF, Weber DJ, Moehring RW, Lewis SS, Triplett PF, Blocker M, Becherer P, Schwab JC, Knelson LP, Lokhnygina Y, Rutala WA, Kanamori H, Gergen MF, Sexton DJ, & Program CDCPE (2017) Enhanced Terminal Room Disinfection And Acquisition And Infection Caused By Multidrug-Resistant Organisms And *Clostridium difficile* (The Benefits Of Enhanced Terminal Room Disinfection Study): A Cluster-Randomised, Multicentre, Crossover Study. *Lancet* 389(10071):805-814.
42. Barbut F (2015) How To Eradicate *Clostridium difficile* From The Environment. *The Journal Of Hospital Infection* 89(4):287-295.
43. Rupnik M (2007) Is *Clostridium difficile*-Associated Infection A Potentially Zoonotic And Foodborne Disease? *Clinical Microbiology And Infection* 13(5):457-459.
44. Shaughnessy MK, Bobr A, Kuskowski MA, Johnston BD, Sadowsky MJ, Khoruts A, & Johnson JR (2016) Environmental Contamination In Households Of Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Applied And Environmental Microbiology* 82(9):2686-2692.
45. Brown KA, Fisman DN, Moineddin R, & Daneman N (2014) The Magnitude And Duration Of *Clostridium difficile* Infection Risk Associated With Antibiotic Therapy: A Hospital Cohort Study. *Plos One* 9(8):E105454.
46. Khanafer N, Vanhems P, Barbut F, Luxemburger C, & Group CDIS (2017) Factors Associated With *Clostridium difficile* Infection: A Nested Case-Control Study In A Three Year Prospective Cohort. *Anaerobe* 44:117-123.
47. Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Lamothe F, Michaud S, Turgeon N, Toye B, Beaudoin A, Frost EH, Gilca R, Brassard P, Dendukuri N, Beliveau C, Oughton M, Brukner I, & Dascal A (2011) Host And Pathogen Factors For *Clostridium difficile* Infection And Colonization. *The New England Journal Of Medicine* 365(18):1693-1703.
48. Pakyz AL, Jawahar R, Wang Q, & Harpe SE (2014) Medication Risk Factors Associated With Healthcare-Associated *Clostridium difficile* Infection: A Multilevel Model Case-Control Study

-
- Among 64 US Academic Medical Centres. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 69(4):1127-1131.
49. Pepin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V, Nguyen M, Jacob CE, & Lanthier L (2005) Emergence Of Fluoroquinolones As The Predominant Risk Factor For *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: A Cohort Study During An Epidemic In Quebec. *Clinical Infectious Diseases* 41(9):1254-1260.
50. Louie TJ, Cannon K, Byrne B, Emery J, Ward L, Eyben M, & Krulicki W (2012) Fidaxomicin Preserves The Intestinal Microbiome During And After Treatment Of *Clostridium difficile* Infection (CDI) And Reduces Both Toxin Reexpression And Recurrence Of CDI. *Clinical Infectious Diseases* 55 Suppl 2:S132-142.
51. Almeida R, Gerbaba T, & Petrof EO (2016) Recurrent *Clostridium difficile* Infection And The Microbiome. *Journal Of Gastroenterology* 51(1):1-10.
52. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmee M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, Von Muller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Noren T, Novakova E, Nyc O, Rupnik M, Schmid D, & Wilcox MH (2014) Underdiagnosis Of *Clostridium difficile* Across Europe: The European, Multicentre, Prospective, Biannual, Point-Prevalence Study Of *Clostridium difficile* Infection In Hospitalised Patients With Diarrhoea (EUCLID). *The Lancet. Infectious Diseases* 14(12):1208-1219.
53. Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, & Haider S (2012) Clinical And Economic Burden Of *Clostridium difficile* Infection In Europe: A Systematic Review Of Healthcare-Facility-Acquired Infection. *The Journal Of Hospital Infection* 81(1):1-14.
54. Wilcox MH, Shetty N, Fawley WN, Shemko M, Coen P, Birtles A, Cairns M, Curran MD, Dodgson KJ, Green SM, Hardy KJ, Hawkey PM, Magee JG, Sails AD, & Wren MW (2012) Changing Epidemiology Of *Clostridium difficile* Infection Following The Introduction Of A National Ribotyping-Based Surveillance Scheme In England. *Clinical Infectious Diseases* 55(8):1056-1063.
55. Zarb P, Coignard B, Giskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, Goossens M, Vaerenberg S, Hopkins S, Catry B, Monnet D, Goossens H, & Suetens C (2012) The European Centre For Disease Prevention And Control (ECDC) Pilot Point Prevalence Survey Of Healthcare-Associated Infections And Antimicrobial Use. *Eurosurveillance* 17(46).
56. Centers for Diseases Control (2013) Antibiotic Resistance Threats In The United States. (CDC, Atlanta).
57. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, Mcallister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, & Fridkin SK (2014) Multistate

-
- Point-Prevalence Survey Of Health Care-Associated Infections. *The New England Journal Of Medicine* 370(13):1198-1208.
58. Crobach MJT, Voor In 'T Holt AF, Knetsch CW, Van Dorp SM, Bras W, Harmanus C, Kuijper EJ, & Vos MC (2018) An Outbreak Of *Clostridium difficile* Infections Due To New PCR Ribotype 826: Epidemiologic And Microbiologic Analyses. *Clinical Microbiology And Infection* 24(3):309 E301-309 E304.
59. Nanwa N, Kwong JC, Krahn M, Daneman N, Lu H, Austin PC, Govindarajan A, Rosella LC, Cadarette SM, & Sander B (2016) The Economic Burden Of Hospital-Acquired *Clostridium difficile* Infection: A Population-Based Matched Cohort Study. *Infection Control And Hospital Epidemiology* 37(9):1068-1078.
60. Allen SJ, Wareham K, Wang D, Bradley C, Hutchings H, Harris W, Dhar A, Brown H, Foden A, Gravenor MB, & Mack D (2013) Lactobacilli And Bifidobacteria In The Prevention Of Antibiotic-Associated Diarrhoea And *Clostridium difficile* Diarrhoea In Older Inpatients (PLACIDE): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Trial. *Lancet* 382(9900):1249-1257.
61. Nanwa N, Sander B, Krahn M, Daneman N, Lu H, Austin PC, Govindarajan A, Rosella LC, Cadarette SM, & Kwong JC (2017) A Population-Based Matched Cohort Study Examining The Mortality And Costs Of Patients With Community-Onset *Clostridium difficile* Infection Identified Using Emergency Department Visits And Hospital Admissions. *Plos One* 12(3):E0172410.
62. Pepin J, Valiquette L, & Cossette B (2005) Mortality Attributable To Nosocomial *Clostridium difficile*-Associated Disease During An Epidemic Caused By A Hypervirulent Strain In Quebec. *Canadian Medical Association Journal* 173(9):1037-1042.
63. Cobo J, Merino E, Martinez C, Cozar-Llisto A, Shaw E, Marrodan T, Calbo E, Bereciartua E, Sanchez-Munoz LA, Salavert M, Perez-Rodriguez MT, Garcia-Rosado D, Bravo-Ferrer JM, Galvez-Acebal J, Henriquez-Camacho C, Cuquet J, Pino-Calm B, Torres L, Sanchez-Porto A, Fernandez-Felix BM, & Nosocomial Infection Study G (2018) Prediction Of Recurrent *Clostridium difficile* Infection At The Bedside: The GEIH-CDI Score. *International Journal Of Antimicrobial Agents* 51(3):393-398.
64. Zilberberg MD, Shorr AF, Jesdale WM, Tjia J, & Lapane K (2017) Recurrent *Clostridium difficile* Infection Among Medicare Patients In Nursing Homes: A Population-Based Cohort Study. *Medicine* 96(10):E6231.
65. Heimann SM, Vehreschild JJ, Cornely OA, Wisplinghoff H, Hallek M, Goldbrunner R, Bottiger BW, Goeser T, Holscher A, Baldus S, Muller F, Jazmati N, Wingen S, Franke B, & Vehreschild MJ (2015) Economic Burden Of *Clostridium difficile* Associated Diarrhoea: A Cost-Of-Illness Study From A German Tertiary Care Hospital. *Infection* 43(6):707-714.
-

-
66. Van Werkhoven CH, Van Der Tempel J, Jajou R, Thijsen SF, Diepersloot RJ, Bonten MJ, Postma DF, & Oosterheert JJ (2015) Identification Of Patients At High Risk For *Clostridium difficile* Infection: Development And Validation Of A Risk Prediction Model In Hospitalized Patients Treated With Antibiotics. *Clinical Microbiology And Infection* 21(8):786 E781-788.
 67. Furuya-Kanamori L, Stone JC, Clark J, Mckenzie SJ, Yakob L, Paterson DL, Riley TV, Doi SA, & Clements AC (2015) Comorbidities, Exposure To Medications, And The Risk Of Community-Acquired *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Infection Control And Hospital Epidemiology* 36(2):132-141.
 68. Slimings C & Riley TV (2014) Antibiotics And Hospital-Acquired *Clostridium difficile* Infection: Update Of Systematic Review And Meta-Analysis. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 69(4):881-891.
 69. Hebbard AIT, Slavin MA, Reed C, Trubiano JA, Teh BW, Haeusler GM, Thursky KA, & Worth LJ (2017) Risks Factors And Outcomes Of *Clostridium difficile* Infection In Patients With Cancer: A Matched Case-Control Study. *Supportive Care In Cancer* 25(6):1923-1930.
 70. Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, & Kuijper EJ (2012) Time Interval Of Increased Risk For *Clostridium difficile* Infection After Exposure To Antibiotics. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 67(3):742-748.
 71. Kavanagh K, Pan J, Marwick C, Davey P, Wiuff C, Bryson S, Robertson C, & Bennie M (2017) Cumulative And Temporal Associations Between Antimicrobial Prescribing And Community-Associated *Clostridium difficile* Infection: Population-Based Case-Control Study Using Administrative Data. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 72(4):1193-1201.
 72. Kurti Z, Lovasz BD, Mandel MD, Csima Z, Golovics PA, Csako BD, Mohas A, Gonczi L, Gecse KB, Kiss LS, Szathmari M, & Lakatos PL (2015) Burden Of *Clostridium difficile* Infection Between 2010 And 2013: Trends And Outcomes From An Academic Center In Eastern Europe. *World Journal Of Gastroenterology* 21(21):6728-6735.
 73. Stevens V, Dumyati G, Fine LS, Fisher SG, & Van Wijngaarden E (2011) Cumulative Antibiotic Exposures Over Time And The Risk Of *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases* 53(1):42-48.
 74. Eze P, Balsells E, Kyaw MH, & Nair H (2017) Risk Factors For *Clostridium difficile* Infections - An Overview Of The Evidence Base And Challenges In Data Synthesis. *Journal Of Global Health* 7(1):010417.
 75. Deshpande A, Pasupuleti V, Thota P, Pant C, Rolston DD, Hernandez AV, Donskey CJ, & Fraser TG (2015) Risk Factors For Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Infection Control And Hospital Epidemiology* 36(4):452-460.

76. Miller AC, Polgreen LA, Cavanaugh JE, & Polgreen PM (2016) Hospital *Clostridium difficile* Infection (CDI) Incidence As A Risk Factor For Hospital-Associated CDI. *American Journal Of Infection Control* 44(7):825-829.
77. Predrag S (2016) Analysis Of Risk Factors And Clinical Manifestations Associated With *Clostridium difficile* Disease In Serbian Hospitalized Patients. *Brazilian Journal Of Microbiology* 47(4):902-910.
78. Rodriguez C, Korsak N, Taminiau B, Avesani V, Van Broeck J, Delmee M, & Daube G (2014) *Clostridium difficile* Infection In Elderly Nursing Home Residents. *Anaerobe* 30:184-187.
79. Suljagic V, Miljkovic I, Starcevic S, Stepic N, Kostic Z, Jovanovic D, Brusica-Renaud J, Mijovic B, & Sipetic-Grujicic S (2017) Risk Factors For *Clostridium difficile* Infection In Surgical Patients Hospitalized In A Tertiary Hospital In Belgrade, Serbia: A Case-Control Study. *Antimicrobial Resistance And Infection Control* 6:31.
80. Ziakas PD, Joyce N, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Besdine RW, Mor V, & Mylonakis E (2016) Prevalence And Impact Of *Clostridium difficile* Infection In Elderly Residents Of Long-Term Care Facilities, 2011: A Nationwide Study. *Medicine* 95(31):E4187.
81. Abrahamian FM, Talan DA, Krishnadasan A, Citron DM, Paulick AL, Anderson LJ, Goldstein EJC, Moran GJ, & Group EMINS (2017) *Clostridium difficile* Infection Among US Emergency Department Patients With Diarrhea And No Vomiting. *Annals Of Emergency Medicine* 70(1):19-27 E14.
82. Chalmers JD, Akram AR, Singanayagam A, Wilcox MH, & Hill AT (2016) Risk Factors For *Clostridium difficile* Infection In Hospitalized Patients With Community-Acquired Pneumonia. *The Journal Of Infection* 73(1):45-53.
83. Dubberke ER, Olsen MA, Stwalley D, Kelly CP, Gerding DN, Young-Xu Y, & Mahe C (2016) Identification Of Medicare Recipients At Highest Risk For *Clostridium difficile* Infection In The US By Population Attributable Risk Analysis. *Plos One* 11(2):E0146822.
84. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, Van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, & O'Toole PW (2012) Gut Microbiota Composition Correlates With Diet And Health In The Elderly. *Nature* 488(7410):178-184.
85. Dethlefsen L & Relman DA (2011) Incomplete Recovery And Individualized Responses Of The Human Distal Gut Microbiota To Repeated Antibiotic Perturbation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 108 Suppl 1:4554-4561.
86. Baggs J, Yousey-Hindes K, Ashley ED, Meek J, Dumyati G, Cohen J, Wise ME, McDonald LC, & Lessa FC (2015) Identification Of Population At Risk For Future *Clostridium difficile* Infection Following Hospital Discharge To Be Targeted For Vaccine Trials. *Vaccine* 33(46):6241-6249.

87. Krishna A, Pervaiz A, Lephart P, Tarabishy N, Varakantam S, Kotecha A, Awali RA, Kaye KS, & Chopra T (2017) Prevalence Of *Clostridium difficile* Infection In Acute Care Hospitals, Long-Term Care Facilities, And Outpatient Clinics: Is *Clostridium difficile* Infection Underdiagnosed In Long-Term Care Facility Patients? *American Journal Of Infection Control* 45(10):1157-1159.
88. Karanika S, Grigoras C, Flokas ME, Alevizakos M, Kinamon T, Kojic EM, & Mylonakis E (2017) The Attributable Burden Of *Clostridium difficile* Infection To Long-Term Care Facilities Stay: A Clinical Study. *Journal Of The American Geriatrics Society* 65(8):1733-1740.
89. Keddiss MT, Khanna S, Noheria A, Baddour LM, Pardi DS, & Qian Q (2012) *Clostridium difficile* Infection In Patients With Chronic Kidney Disease. *Mayo Clinic Proceedings* 87(11):1046-1053.
90. Rodriguez Garzotto A, Merida Garcia A, Munoz Unceta N, Galera Lopez MM, Orellana-Miguel MA, Diaz-Garcia CV, Cortijo-Cascajares S, Cortes-Funes H, & Agullo-Ortuno MT (2015) Risk Factors Associated With *Clostridium difficile* Infection In Adult Oncology Patients. *Supportive Care In Cancer* 23(6):1569-1577.
91. Singh H, Nugent Z, Yu BN, Lix LM, Targownik LE, & Bernstein CN (2017) Higher Incidence Of *Clostridium difficile* Infection Among Individuals With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 153(2):430-438 E432.
92. Becerra MB, Becerra BJ, Banta JE, & Safdar N (2015) Impact Of *Clostridium difficile* Infection Among Pneumonia And Urinary Tract Infection Hospitalizations: An Analysis Of The Nationwide Inpatient Sample. *BMC Infectious Diseases* 15:254.
93. Ticinesi A, Nouvenne A, Folesani G, Prati B, Morelli I, Guida L, Turrone F, Ventura M, Lauretani F, Maggio M, & Meschi T (2015) Multimorbidity In Elderly Hospitalised Patients And Risk Of *Clostridium difficile* Infection: A Retrospective Study With The Cumulative Illness Rating Scale (CIRS). *BMJ Open* 5(10):E009316.
94. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, & Ehrlich SD (2010) A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established By Metagenomic Sequencing. *Nature* 464(7285):59-65.
95. Willing BP, Russell SL, & Finlay BB (2011) Shifting The Balance: Antibiotic Effects On Host-Microbiota Mutualism. *Nature Reviews Microbiology* 9(4):233-243.
96. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, & Relman DA (2008) The Pervasive Effects Of An Antibiotic On The Human Gut Microbiota, As Revealed By Deep 16S rRNA Sequencing. *Plos Biology* 6(11):E280.

-
97. Reeves AE, Koenigsnecht MJ, Bergin IL, & Young VB (2012) Suppression Of *Clostridium difficile* In The Gastrointestinal Tracts Of Germfree Mice Inoculated With A Murine Isolate From The Family Lachnospiraceae. *Infection And Immunity* 80(11):3786-3794.
 98. Newton DF, Macfarlane S, & Macfarlane GT (2013) Effects Of Antibiotics On Bacterial Species Composition And Metabolic Activities In Chemostats Containing Defined Populations Of Human Gut Microorganisms. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 57(5):2016-2025.
 99. Petrof EO, Gloor GB, Vanner SJ, Weese SJ, Carter D, Daigneault MC, Brown EM, Schroeter K, & Allen-Vercoe E (2013) Stool Substitute Transplant Therapy For The Eradication Of *Clostridium difficile* Infection: 'Repopulating' The Gut. *Microbiome* 1(1):3.
 100. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Jansson JK, & Engstrand L (2010) Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts On The Human Throat And Gut Microbiome. *Plos One* 5(3):E9836.
 101. Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillere R, Hannani D, Enot DP, Pfirschke C, Engblom C, Pittet MJ, Schlitzer A, Ginhoux F, Apetoh L, Chachaty E, Woerther PL, Eberl G, Berard M, Ecobichon C, Clermont D, Bizet C, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N, Opolon P, Yessaad N, Vivier E, Ryffel B, Elson CO, Dore J, Kroemer G, Lepage P, Boneca IG, Ghiringhelli F, & Zitvogel L (2013) The Intestinal Microbiota Modulates The Anticancer Immune Effects Of Cyclophosphamide. *Science* 342(6161):971-976.
 102. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillere R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, Fidelle M, Flament C, Poirier-Colame V, Opolon P, Klein C, Iribarren K, Mondragon L, Jacquelot N, Qu B, Ferrere G, Clemenson C, Mezquita L, Masip JR, Naltet C, Brosseau S, Kaderbhai C, Richard C, Rizvi H, Levenez F, Galleron N, Quinquis B, Pons N, Ryffel B, Minard-Colin V, Gonin P, Soria JC, Deutsch E, Lorient Y, Ghiringhelli F, Zalcman G, Goldwasser F, Escudier B, Hellmann MD, Eggermont A, Raoult D, Albiges L, Kroemer G, & Zitvogel L (2018) Gut Microbiome Influences Efficacy Of PD-1-Based Immunotherapy Against Epithelial Tumors. *Science* 359(6371):91-97.
 103. Milani C, Ticinesi A, Gerritsen J, Nouvenne A, Lugli GA, Mancabelli L, Turroni F, Duranti S, Mangifesta M, Viappiani A, Ferrario C, Maggio M, Lauretani F, De Vos W, Van Sinderen D, Meschi T, & Ventura M (2016) Gut Microbiota Composition And *Clostridium difficile* Infection In Hospitalized Elderly Individuals: A Metagenomic Study. *Scientific Reports* 6:25945.
 104. Theriot CM & Young VB (2015) Interactions Between The Gastrointestinal Microbiome And *Clostridium difficile*. *Annual Review Of Microbiology* 69:445-461.
 105. De Lastours V & Fantin B (2015) Impact Of Fluoroquinolones On Human Microbiota. Focus On The Emergence Of Antibiotic Resistance. *Future Microbiology* 10(7):1241-1255.

-
106. Khanna S & Pardi DS (2016) Clinical Implications Of Antibiotic Impact On Gastrointestinal Microbiota And *Clostridium difficile* Infection. *Expert Review Of Gastroenterology & Hepatology* 16:1-8.
107. Rashid MU, Weintraub A, & Nord CE (2015) Development Of Antimicrobial Resistance In The Normal Anaerobic Microbiota During One Year After Administration Of Clindamycin Or Ciprofloxacin. *Anaerobe* 31:72-77.
108. ECDC (2016) Antimicrobial Resistance Interactive Database (Ears-Net). Accédé Le 22/02/2018 À L'adresse : http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/pages/database.aspx.
109. ECDC (2013) Antimicrobial Resistance Surveillance In Europe 2012. Annual Report Of The European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Disponible À L'adresse <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/pages/publications.aspx>.
110. ECDC (2014) Antimicrobial Resistance Interactive Database (Ears-Net). Accédé Le 20/02/2014 À L'adresse : http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/pages/database.aspx.
111. Andremont A, Brun-Buisson C, & Struelens M (2001) Evaluating And Predicting The Ecologic Impact Of Antibiotics. *Clinical Microbiology And Infection* 7 Suppl 5:1-6.
112. Sommer MO, Church GM, & Dantas G (2010) The Human Microbiome Harbors A Diverse Reservoir Of Antibiotic Resistance Genes. *Virulence* 1(4):299-303.
113. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, & Salyers AA (2001) Evidence For Extensive Resistance Gene Transfer Among *Bacteroides* spp. And Among *Bacteroides* And Other Genera In The Human Colon. *Applied And Environmental Microbiology* 67(2):561-568.
114. Hunter JE, Shelley JC, Walton JR, Hart CA, & Bennett M (1992) Apramycin Resistance Plasmids In *Escherichia coli*: Possible Transfer To *Salmonella typhimurium* In Calves. *Epidemiology And Infection* 108(2):271-278.
115. Vasseur MV, Laurentie M, Rolland JG, Perrin-Guyomard A, Henri J, Ferran AA, Toutain PL, & Bousquet-Melou A (2014) Low Or High Doses Of Cefquinome Targeting Low Or High Bacterial Inocula Cure *Klebsiella pneumoniae* Lung Infections But Differentially Impact The Levels Of Antibiotic Resistance In Fecal Flora. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 58(3):1744-1748.
116. Prevot MH, Andremont A, Sancho-Garnier H, & Tancrede C (1986) Epidemiology Of Intestinal Colonization By Members Of The Family *Enterobacteriaceae* Resistant To Cefotaxime In A Hematology-Oncology Unit. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 30(6):945-947.

117. Richard P, Delangle MH, Raffi F, Espaze E, & Richet H (2001) Impact Of Fluoroquinolone Administration On The Emergence Of Fluoroquinolone-Resistant Gram-Negative Bacilli From Gastrointestinal Flora. *Clinical Infectious Diseases* 32(1):162-166.
118. Fantin B, Duval X, Massias L, Alavoine L, Chau F, Retout S, Andremont A, & Mentre F (2009) Ciprofloxacin Dosage And Emergence Of Resistance In Human Commensal Bacteria. *The Journal Of Infectious Diseases* 200(3):390-398.
119. Hoiby N, Jarlov JO, Kemp M, Tvede M, Bangsborg JM, Kjerulf A, Pers C, & Hansen H (1997) Excretion Of Ciprofloxacin In Sweat And Multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet* 349(9046):167-169.
120. Terpstra S, Noordhoek GT, Voesten HG, Hendriks B, & Degener JE (1999) Rapid Emergence Of Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci* On The Skin After Antibiotic Prophylaxis. *The Journal Of Hospital Infection* 43(3):195-202.
121. Dinubile MJ, Friedland I, Chan CY, Motyl MR, Giezek H, Shivaprakash M, Weinstein RA, & Quinn JP (2005) Bowel Colonization With Resistant Gram-Negative Bacilli After Antimicrobial Therapy Of Intra-Abdominal Infections: Observations From Two Randomized Comparative Clinical Trials Of Ertapenem Therapy. *European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases* 24(7):443-449.
122. Pletz MW, Rau M, Bulitta J, De Roux A, Burkhardt O, Kruse G, Kurowski M, Nord CE, & Lode H (2004) Ertapenem Pharmacokinetics And Impact On Intestinal Microflora, In Comparison To Those Of Ceftriaxone, After Multiple Dosing In Male And Female Volunteers. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 48(10):3765-3772.
123. De Vries-Hospers HG, Tonk RH, & Van Der Waaij D (1991) Effect Of Intramuscular Ceftriaxone On Aerobic Oral And Faecal Flora Of 11 Healthy Volunteers. *Scandinavian Journal Of Infectious Diseases* 23(5):625-633.
124. Michea-Hamzehpour M, Auckenthaler R, Kunz J, & Pechere JC (1988) Effect Of A Single Dose Of Cefotaxime Or Ceftriaxone On Human Faecal Flora. A Double-Blind Study. *Drugs* 35 Suppl 2:6-11.
125. Brautigam HH, Knothe H, & Rangoonwala R (1988) Impact Of Cefotaxime And Ceftriaxone On The Bowel And Vaginal Flora After Single-Dose Prophylaxis In Vaginal Hysterectomy. *Drugs* 35 Suppl 2:163-168.
126. Edlund C, Sjostedt S, & Nord CE (1997) Comparative Effects Of Levofloxacin And Ofloxacin On The Normal Oral And Intestinal Microflora. *Scandinavian Journal Of Infectious Diseases* 29(4):383-386.
127. Edlund C & Nord CE (2000) Effect On The Human Normal Microflora Of Oral Antibiotics For Treatment Of Urinary Tract Infections. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 46 Suppl 1:41-48; Discussion 63-45.

-
128. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, & Jansson JK (2007) Long-Term Ecological Impacts Of Antibiotic Administration On The Human Intestinal Microbiota. *ISME Journal* 1(1):56-66.
129. Lindgren M, Lofmark S, Edlund C, Huovinen P, & Jalava J (2009) Prolonged Impact Of A One-Week Course Of Clindamycin On *Enterococcus* spp. In Human Normal Microbiota. *Scandinavian Journal Of Infectious Diseases* 41(3):215-219.
130. Ruppe E, Burdet C, Grall N, De Lastours V, Lescure FX, Andremont A, & Armand-Lefevre L (2018) Impact Of Antibiotics On The Intestinal Microbiota Needs To Be Re-Defined To Optimize Antibiotic Usage. *Clinical Microbiology And Infection* 24(1):3-5.
131. Van Ogtrop ML, Guiot HF, Mattie H, & Van Furth R (1991) Modulation Of The Intestinal Flora Of Mice By Parenteral Treatment With Broad-Spectrum Cephalosporins. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 35(5):976-982.
132. Mandell LA, Bergeron MG, Ronald AR, Vega C, Harding G, Saginur R, Feld R, Duperval R, Landis SJ, Miedzinski LJ, & Et Al. (1989) Once-Daily Therapy With Ceftriaxone Compared With Daily Multiple-Dose Therapy With Cefotaxime For Serious Bacterial Infections: A Randomized, Double-Blind Study. *The Journal Of Infectious Diseases* 160(3):433-441.
133. Smith CR, Petty BG, Hendrix CW, Kernan WN, Garver PL, Fox K, Beamer A, Carbone K, Threlkeld M, & Lietman PS (1989) Ceftriaxone Compared With Cefotaxime For Serious Bacterial Infections. *The Journal Of Infectious Diseases* 160(3):442-447.
134. Gerstner GJ (1990) Comparison Of Ceftriaxone (1 X 1 G/Day) Versus Cefotaxime (3 X 1 G/Day) For Gynecologic And Obstetric Infections. A Randomized Clinical Trial. *Gynecologic And Obstetric Investigation* 29(4):273-277.
135. Scholz H, Hofmann T, Noack R, Edwards DJ, & Stoeckel K (1998) Prospective Comparison Of Ceftriaxone And Cefotaxime For The Short-Term Treatment Of Bacterial Meningitis In Children. *Chemotherapy* 44(2):142-147.
136. Abbate GF, Alagia I, Giaquinto E, Leonessa V, Savioli L, Altucci P, Caputi M, Guarino C, Micillo E, & Catena E (1986) Treatment Of Lower Respiratory Tract Infections With Ceftriaxone And Cefotaxime. A Comparative Study. *Respiration* 49(3):222-230.
137. SPILF (2008) Prise En Charge Des Méningites Bactériennes Aiguës Communautaires (à l'exception du Nouveau-Né). Disponible À L'adresse : [Http://Www.Infectiologie.Com/Site/Medias/ Documents/Consensus/Meningites Consensus-Long.Pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/documents/consensus/meningites_consensus-long.pdf).
138. SPILF/AFFSSAPS/SPLF (2010) Antibiothérapie Par Voie Générale Dans Les Infections Respiratoires Basses De L'adulte. Disponible À L'adresse :
-

-
- [Http://Www.Infectiologie.Com/Site/Medias/ Documents/Consensus/2010-Infvrb-Spilf-Afssaps.Pdf.](http://www.infectiologie.com/site/medias/documents/consensus/2010-infvrb-spilf-afssaps.pdf)
139. ANSM (2008) Diagnostic Et Antibiothérapie Des Infections Urinaires Bactériennes Communautaires Chez L'adulte. Disponible À L'adresse : [Http://Www.Infectiologie.Com/Site/Medias/ Documents/Consensus/Afssaps-Inf-Urinaires-Adulte-Argumentaire.Pdf.](http://www.infectiologie.com/site/medias/documents/consensus/afssaps-inf-urinaires-adulte-argumentaire.pdf)
140. Scully BE, Fu KP, & Neu HC (1984) Pharmacokinetics Of Ceftriaxone After Intravenous Infusion And Intramuscular Injection. *Amerian Journal Of Medicine* 77(4C):112-116.
141. Perry TR & Schentag JJ (2001) Clinical Use Of Ceftriaxone: A Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Perspective On The Impact Of Minimum Inhibitory Concentration And Serum Protein Binding. *Clinical Pharmacokinetics* 40(9):685-694.
142. Harb G, Lebel F, Battikha J, & Thackara JW (2010) Safety And Pharmacokinetics Of Subcutaneous Ceftriaxone Administered With Or Without Recombinant Human Hyaluronidase Versus Intravenous Ceftriaxone Administration In Adult Volunteers. *Current Medical Research And Opinion* 26(2):279-288.
143. Mcnamara PJ, Trueb V, & Stoeckel K (1990) Ceftriaxone Binding To Human Serum Albumin. Indirect Displacement By Probenecid And Diazepam. *Biochemical Pharmacology* 40(6):1247-1253.
144. Bergan T (1985) [Pharmacokinetics And Tissue Penetration Of Ceftriaxone]. *La Revue De Médecine Interne* 6(2):163-177.
145. Arvidsson A, Leijd B, Nord CE, & Angelin B (1988) Interindividual Variability In Biliary Excretion Of Ceftriaxone: Effects On Biliary Lipid Metabolism And On Intestinal Microflora. *European Journal Of Clinical Investigation* 18(3):261-266.
146. Sanofi-Aventis (2010) Claforan - Monographie De Produit. Disponible À L'adresse : [Http://Products.Sanofi.Ca/Fr/Claforan.Pdf.](http://products.sanofi.ca/fr/claforan.pdf) Ed Sanofi-Aventis.
147. Jehl F, Peter JD, Picard A, Dupeyron JP, Marescaux J, Sibilly A, & Monteil H (1987) [Biliary Excretion Of Cefotaxime And Desacetylcefotaxime]. *La Revue De Médecine Interne* 8(5):487-492.
148. Guggenbichler JP, Kofler J, & Allerberger F (1985) The Influence Of Third-Generation Cephalosporins On The Aerobic Intestinal Flora. *Infection* 13 Suppl 1:S137-139.
149. Knothe H, Dette GA, & Shah PM (1985) Impact Of Injectable Cephalosporins On The Gastrointestinal Microflora: Observations In Healthy Volunteers And Hospitalized Patients. *Infection* 13 Suppl 1:S129-133.
150. Gbaguidi-Haore H, Dumartin C, L'Heriteau F, Pefau M, Hocquet D, Rogues AM, & Bertrand X (2013) Antibiotics Involved In The Occurrence Of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Nationwide Multilevel
-

-
- Study Suggests Differences Within Antibiotic Classes. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 68(2):461-470.
151. Grohs P, Kerneis S, Sabatier B, Lavollay M, Carbonnelle E, Rostane H, Souty C, Meyer G, Gutmann L, & Mainardi JL (2014) Fighting The Spread Of AmpC-Hyperproducing *Enterobacteriaceae*: Beneficial Effect Of Replacing Ceftriaxone With Cefotaxime. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 69(3):786-789.
152. Gabrielsson J & Weiner D (2006) *Pharmacokinetic And Pharmacodynamic Data Analysis : Concepts And Applications* (Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm) 4th Ed P 1254.
153. Savic RM, Jonker DM, Kerbusch T, & Karlsson MO (2007) Implementation Of A Transit Compartment Model For Describing Drug Absorption In Pharmacokinetic Studies. *Journal Of Pharmacokinetics And Pharmacodynamics* 34(5):711-726.
154. Friberg LE, Henningson A, Maas H, Nguyen L, & Karlsson MO (2002) Model Of Chemotherapy-Induced Myelosuppression With Parameter Consistency Across Drugs. *Journal Of Clinical Oncology* 20(24):4713-4721.
155. Jusko WJ & Ko HC (1994) Physiologic Indirect Response Models Characterize Diverse Types Of Pharmacodynamic Effects. *Clinical Pharmacology And Therapeutics* 56(4):406-419.
156. Dartois C, Brendel K, Comets E, Laffont CM, Laveille C, Tranchand B, Mentre F, Lemenuel-Diot A, & Girard P (2007) Overview Of Model-Building Strategies In Population PK/PD Analyses: 2002-2004 Literature Survey. *British Journal Of Clinical Pharmacology* 64(5):603-612.
157. Sheiner LB, Rosenberg B, & Melmon KL (1972) Modelling Of Individual Pharmacokinetics For Computer-Aided Drug Dosage. *Computers And Biomedical Research, An International Journal* 5(5):411-459.
158. Lindstrom ML & Bates DM (1990) Nonlinear Mixed Effects Models For Repeated Measures Data. *Biometrics* 46(3):673-687.
159. Vonesh E (1996) A Note On The Use Of Laplace's Approximation For Nonlinear Mixed-Effects Models. *Biometrika* 83:447-452.
160. Ge Z, Bickel P, & Rice J (2004) An Approximate Likelihood Approach To Nonlinear Mixed Effects Models Via Spline Approximation. *Computational Statistics And Data Analysis* 46:747-776.
161. Wolfinger R (1993) Laplace's Approximation For Nonlinear Mixed Models. *Biometrika* 80:791-795.
162. Pinheiro J & Bates D (1995) Approximations To The Log-Likelihood Function In The Nonlinear Mixed-Effects Model. *Journal Of Computational And Graphical Statistics* 4:12-35.
163. Kuhn E & Lavielle M (2005) Maximum Likelihood Estimation In Nonlinear Mixed Effects Models. *Computational Statistics And Data Analysis* 49:1020-1038.
-

-
164. Comets E, Lavenu A, & Lavielle M (2011) saemix: Stochastic Approximation Expectation Maximization (Saem) Algorithm. *R Package Version 1.0*.
165. Nguyen TH, Mouksassi MS, Holford N, Al-Huniti N, Freedman I, Hooker AC, John J, Karlsson MO, Mould DR, Perez Ruixo JJ, Plan EL, Savic R, Van Hasselt JG, Weber B, Zhou C, Comets E, Mentre F, & Model Evaluation Group Of The International Society Of Pharmacometrics Best Practice C (2017) Model Evaluation Of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics And Graphics. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 6(2):87-109.
166. Brendel K, Comets E, Laffont C, Laveille C, & Mentre F (2006) Metrics For External Model Evaluation With An Application To The Population Pharmacokinetics Of Gliclazide. *Pharmaceutical Research* 23(9):2036-2049.
167. Zhi JG, Nightingale CH, & Quintiliani R (1988) Microbial Pharmacodynamics Of Piperacillin In Neutropenic Mice Of Systematic Infection Due To *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal Of Pharmacokinetics And Biopharmaceutics* 16(4):355-375.
168. Mouton JW, Vinks AA, & Punt NC (1997) Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling Of Activity Of Ceftazidime During Continuous And Intermittent Infusion. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 41(4):733-738.
169. Jumbe N, Louie A, Leary R, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Freeman C, Kahn JB, Bush K, Dudley MN, Miller MH, & Drusano GL (2003) Application Of A Mathematical Model To Prevent In Vivo Amplification Of Antibiotic-Resistant Bacterial Populations During Therapy. *The Journal Of Clinical Investigation* 112(2):275-285.
170. Gumbo T, Louie A, Deziel MR, Parsons LM, Salfinger M, & Drusano GL (2004) Selection Of A Moxifloxacin Dose That Suppresses Drug Resistance In *Mycobacterium tuberculosis*, By Use Of An In Vitro Pharmacodynamic Infection Model And Mathematical Modeling. *The Journal Of Infectious Diseases* 190(9):1642-1651.
171. Meagher AK, Forrest A, Dalhoff A, Stass H, & Schentag JJ (2004) Novel Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model For Prediction Of Outcomes With An Extended-Release Formulation Of Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 48(6):2061-2068.
172. Chung P, Mcnamara PJ, Campion JJ, & Evans ME (2006) Mechanism-Based Pharmacodynamic Models Of Fluoroquinolone Resistance In *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 50(9):2957-2965.
173. Campion JJ, Mcnamara PJ, & Evans ME (2005) Pharmacodynamic Modeling Of Ciprofloxacin Resistance In *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 49(1):209-219.

-
174. Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, Knights D, Gajer P, Ravel J, Fierer N, Gordon JI, & Knight R (2011) Moving Pictures Of The Human Microbiome. *Genome Biology* 12(5):R50.
175. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, De Vos WM, Brunak S, Dore J, Meta HITC, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariatz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, Van De Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, Van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Merieux A, Melo Minardi R, M'Rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, & Bork P (2011) Enterotypes Of The Human Gut Microbiome. *Nature* 473(7346):174-180.
176. De Gunzburg J, Ghoulane A, Ducher A, Le Chatelier E, Duval X, Ruppe E, Armand-Lefevre L, Sablier-Gallis F, Burdet C, Alavoine L, Chachaty E, Augustin V, Varastet M, Levenez F, Kennedy S, Pons N, Mentre F, & Andremont A (2018) Protection Of The Human Gut Microbiome From Antibiotics. *The Journal Of Infectious Diseases* 217(4):628-636.
177. Andremont A (2003) Commensal Flora May Play Key Role In Spreading Antibiotic Resistance. *ASM News* 69(12):601-607.
178. Carlet J (2012) The Gut Is The Epicentre Of Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Resistance And Infection Control* 1(1):39.
179. Bassis CM, Theriot CM, & Young VB (2014) Alteration Of The Murine Gastrointestinal Microbiota By Tigecycline Leads To Increased Susceptibility To *Clostridium difficile* Infection. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 58(5):2767-2774.
180. Schubert AM, Rogers MA, Ring C, Mogle J, Petrosino JP, Young VB, Aronoff DM, & Schloss PD (2014) Microbiome Data Distinguish Patients With *Clostridium difficile* Infection And Non-*C. difficile*-Associated Diarrhea From Healthy Controls. *Mbio* 5(3):E01021-01014.
181. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, & Langella P (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* Is An Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified By Gut Microbiota Analysis Of Crohn Disease Patients. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 105(43):16731-16736.

182. Vandeputte D, Kathagen G, D'Hoe K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, Wang J, Tito RY, De Commer L, Darzi Y, Vermeire S, Falony G, & Raes J (2017) Quantitative Microbiome Profiling Links Gut Community Variation To Microbial Load. *Nature* 551(7681):507-511.
183. Forrest A, Nix DE, Ballou CH, Goss TF, Birmingham MC, & Schentag JJ (1993) Pharmacodynamics Of Intravenous Ciprofloxacin In Seriously Ill Patients. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 37(5):1073-1081.
184. Mohr JF, Wanger A, & Rex JH (2004) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling Can Help Guide Targeted Antimicrobial Therapy For Nosocomial Gram-Negative Infections In Critically Ill Patients. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease* 48(2):125-130.
185. Roberts JA & Lipman J (2009) Pharmacokinetic Issues For Antibiotics In The Critically Ill Patient. *Critical Care Medicine* 37(3):840-851; Quiz 859.
186. Stewardson AJ, Gaia N, Francois P, Malhotra-Kumar S, Delemont C, Martinez De Tejada B, Schrenzel J, Harbarth S, Lazarevic V, Saturn WP, & Groups WPS (2015) Collateral Damage From Oral Ciprofloxacin Versus Nitrofurantoin In Outpatients With Urinary Tract Infections: A Culture-Free Analysis Of Gut Microbiota. *Clinical Microbiology And Infection* 21(4):344 E341-311.
187. Fernandes MR, Ignacio A, Rodrigues VA, Groppo FC, Cardoso AL, Avila-Campos MJ, & Nakano V (2017) Alterations Of Intestinal Microbiome By Antibiotic Therapy In Hospitalized Children. *Microbial Drug Resistance* 23(1):56-62.
188. Grall N, Lazarevic V, Gaia N, Couffignal C, Laouenan C, Ilic-Habensus E, Wieder I, Plesiat P, Angebault C, Bournoux ME, Armand-Lefevre L, Andremont A, Duval X, & Schrenzel J (2017) Unexpected Persistence Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* In The Faecal Microbiota Of Hospitalised Patients Treated With Imipenem. *International Journal Of Antimicrobial Agents* 50(1):81-87.
189. Hartley CL, Clements HM, & Linton KB (1978) Effects Of Cephalexin, Erythromycin And Clindamycin On The Aerobic Gram-Negative Faecal Flora In Man. *Journal Of Medical Microbiology* 11(2):125-135.
190. Leonard F, Andremont A, Leclercq B, Labia R, & Tancrede C (1989) Use Of Beta-Lactamase-Producing Anaerobes To Prevent Ceftriaxone From Degrading Intestinal Resistance To Colonization. *The Journal Of Infectious Diseases* 160(2):274-280.
191. Welling GW, Holtrop A, Slotmaker-Van Der Meulen C, Meijer-Severs GJ, Van Santen E, Tonk RH, De Vries-Hospers HG, & Van Der Waaij D (1992) Inactivation Of Ceftriaxone By Faecal Enzyme Preparations During Ceftriaxone Treatment. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy* 30(2):234-236.

192. Kokai-Kun JF, Roberts T, Coughlin O, Sicard E, Rufiange M, Fedorak R, Carter C, Adams MH, Longstreth J, Whalen H, & Sliman J (2017) The Oral Beta-Lactamase Syn-004 (Ribaxamase) Degrades Ceftriaxone Excreted Into The Intestine In Phase 2a Clinical Studies. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 61(3).
193. Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, De Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, & Keller JJ (2013) Duodenal Infusion Of Donor Feces For Recurrent *Clostridium difficile*. *The New England Journal Of Medicine* 368(5):407-415.
194. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, & Gordon JI (2009) A Core Gut Microbiome In Obese And Lean Twins. *Nature* 457(7228):480-484.

Annexe: article 5

Eur J Clin Pharmacol (2015) 71:75–83
DOI 10.1007/s00228-014-1766-y

PHARMACOKINETICS AND DISPOSITION

Population pharmacokinetics of single-dose amikacin in critically ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia

C. Burdet · O. Pajot · C. Couffignal · L. Armand-Lefèvre ·
A. Foucrier · C. Laouénan · M. Wolff · L. Massias · F. Mentré

Received: 10 June 2014 / Accepted: 2 October 2014 / Published online: 21 October 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Aims Modifications of antimicrobials' pharmacokinetic parameters have been reported in critically ill patients, resulting in a risk of treatment failure. We characterized amikacin pharmacokinetic variability in critically ill patients with ventilator-associated pneumonia (VAP) and evaluated several dosing regimens.

Methods We conducted a prospective multicenter study in critically ill patients with presumptive diagnosis of Gram-

negative bacilli (GNB) VAP. Patients empirically received imipenem and a single-dose of amikacin, which was administered as a 30-min infusion (20 mg/kg). Concentrations were measured 0.5, 1, 8, 16, and 24 h after beginning of infusion. Pharmacokinetic parameters were estimated using a population approach. Main pharmacodynamic target was a ratio ≥ 10 between the concentration achieved 1 h after beginning of infusion (C_{1h}) and the minimal inhibitory concentration of the liable bacteria (MIC). We simulated individual C_{1h} for several dosing regimens by Monte Carlo method and computed C_{1h}/MIC ratios for MICs from 0.5 to 64 mg/L.

Results Sixty patients (47 males), median (range) age, and body weight, 61.5 years (28–84) and 78 kg (45–126), respectively, were included. Amikacin median C_{1h} was 45 mg/L (22–87). Mean value (between-patients variability) for CL, V_1 , Q , and V_2 were 4.3 L/h (31 %), 15.9 L (22 %), 12.1 L/h (27 %), and 21.4 L (47 %), respectively. CL increased with CrCL ($p < 0.001$) and V_1 with body weight ($p < 0.001$) and PaO_2/FIO_2 ratio ($p < 0.001$). With a 25 mg/kg regimen, the pharmacodynamic target was achieved in 20 and 96 % for a MICs of 8 and 4 mg/L, respectively.

Conclusion Amikacin clearance was decreased and its volume of distribution was increased as previously reported. A ≥ 25 mg/kg single-dose is needed for empirical treatment of GNB-VAP.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00228-014-1766-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Burdet (✉) · C. Couffignal · L. Armand-Lefèvre · C. Laouénan ·
M. Wolff · F. Mentré
INSERM, IAME, UMR 1137, 75018 Paris, France
e-mail: charles.burdet@inserm.fr

C. Burdet · C. Couffignal · L. Armand-Lefèvre · C. Laouénan ·
M. Wolff · F. Mentré
Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité,
75018 Paris, France

C. Burdet · C. Couffignal · C. Laouénan · F. Mentré
AP-HP, Bichat Hospital, Biostatistics Department, 75018 Paris,
France

O. Pajot
V. Dupouy Hospital, Intensive Care Unit, 95107 Argenteuil, France

L. Armand-Lefèvre
AP-HP, Bichat Hospital, Bacteriology Department, 75018 Paris,
France

A. Foucrier · M. Wolff
AP-HP, Bichat Hospital, Intensive Care Unit, 75018 Paris, France

L. Massias
AP-HP, Bichat Hospital, Pharmacy Department, 75018 Paris, France

Keywords Amikacin · Population pharmacokinetics ·
Intensive care unit · Ventilator-associated pneumonia

Introduction

Ventilator-associated pneumonia (VAP), defined as pneumonia occurring more than 48 h after the initiation of mechanical ventilation, is the most common hospital-acquired infection in the intensive care unit (ICU) [1]. Many previously published

 Springer

studies have shown that early and appropriate antibiotic therapy is associated with better outcome in critically ill patients with severe infections [2]. The latest guidelines of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America recommend that the empirical antibiotic therapy for late-onset pneumonia or in patients with risk factors for infection by multidrug-resistant pathogens should include a combination of an anti-pseudomonal β -lactam and an anti-pseudomonal fluoroquinolone or an aminoglycoside such as amikacin [3]. The superiority of once-daily dosing of aminoglycosides over multiple-daily dosing has been established [4]. However, no data supports a clinical benefit of a single-dose of aminoglycosides over multiple administrations. The rationale for an initial combination therapy is to broaden the antimicrobial spectrum of the empirical therapy; however, some data suggest adverse effects linked to repeated administrations, such as adaptive resistance or nephrotoxicity.

Amikacin, like other aminoglycosides, exhibits a concentration-dependent killing and produces a prolonged post-antibiotic effect. Previous clinical studies have shown that a ratio of 10 or more between the concentration achieved 1 h after the beginning of a 30-min infusion (C_{1h}) and the minimal inhibitory concentration (MIC) of the bacteria responsible of the infection was predictive of therapeutic success [5, 6]. Some authors recently suggested that a ratio between the area under the curve of concentration over time (AUC) and MIC (AUC/MIC) greater than 90 also has some predictive value for therapeutic success, with no difference in predictive capacities when compared to C_{1h} /MIC ratio [7]. Those pharmacodynamic targets may be difficult to reach in critically ill patients for several reasons. First, large interindividual variations of amikacin pharmacokinetic parameters have been reported [8–10], with variations of C_{1h} and AUC as a consequence. This variability is partially explained by total body weight and creatinine clearance, which are the most frequently reported covariates of amikacin pharmacokinetic parameters [8–11]. Second, the current breakpoint of MICs defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for Enterobacteriaceae species and *Pseudomonas aeruginosa* is 8 mg/L [12].

Few authors investigated the amikacin dosage needed in a single infusion setting to achieve the defined pharmacodynamic target in a homogenous group of patients hospitalized in ICU with suspected VAP.

Using data from a prospective clinical trial, we aimed (i) to characterize amikacin pharmacokinetic parameters and their variability in ICU patients with suspected VAP, (ii) to study covariates of amikacin pharmacokinetic parameters, and (iii) to evaluate several amikacin dosing regimens using Monte Carlo simulations.

Material and methods

Patients and sampling

This study is part of the IMPACT trial, a prospective multicenter clinical trial conducted between 2009 and 2011 in three ICUs, at Bichat university hospital, Paris, France, and Victor Dupouy hospital, Argenteuil, France (ClinicalTrials #NCT00950222).

Patients were included in the trial if they presented the following criteria: mechanical ventilation for more than 48 h, a clinical suspicion of Gram-negative bacilli VAP, risk factors for multidrug resistant bacteria, and if a microbiologic sample was obtained before initiation of antimicrobial therapy using blinded protected telescoping catheter or bronchoalveolar lavage. Clinical suspicion of VAP was defined by the onset of new lung infiltrates on chest radiography, fever greater than 38.3 °C, purulent tracheal aspirates, or a leukocytosis $>10,000/\text{mL}$. Risk factors for multidrug-resistant bacteria were antimicrobial therapy in the preceding 15 days or late-onset VAP (≥ 6 days) [3]. Patients were not eligible if they were younger than 18 year old and if they had renal failure requiring renal replacement therapy or received a treatment by imipenem or amikacin at the time of inclusion. Written consent was obtained from patients or their legal representative. The study was approved by the Ethics Committee of the Hôtel-Dieu university hospital (APHP, Paris).

All patients were treated with a combination of imipenem and amikacin. Imipenem was administered every 8 h over a 30-min infusion and should not be changed for the first 48 h. Doses ranged from 500 to 1000 mg, according to creatinine clearance (CrCL). Amikacin treatment consisted in one single 30-min infusion of a suggested dose of 20 mg/kg administered the first day of antimicrobial therapy. This dose was recommended by guidelines at the time of this study was designed [3]. De-escalation therapy was encouraged after isolation of the Gram-negative pathogen and obtaining the results of susceptibility tests.

Usual clinical and demographic characteristics were recorded at ICU admission, as well as ventilator parameters, two scores for assessment of severity (SOFA [13] and SAPS-II [14]) and routine biologic markers.

Blood samples were collected 0.5, 1, 8, 16, and 24 h after the onset of infusion. Exact times of beginning and end of infusion were recorded, as well as exact sampling times. Amikacin concentrations were determined by fluorescence polarization immunoassay using the amikacin Innofluor[®] kit [15]. The limit of quantification of the technique is 0.5 mg/L, and coefficients of variation for intra- and inter-assay were 4.1 % and 5.8 %, respectively.

Population pharmacokinetic analysis

Basic model

Population pharmacokinetic analysis was performed using the Stochastic Approximation Expectation Minimization (SAEM) algorithm in Monolix v4.2 (Lixoft, Orsay, France, available at <http://www.lixoft.com>). This algorithm handles concentrations below the limit of quantification to improve parameters estimation [16]. We used the total dose administered to each patient for model building.

Both one- and two-compartment(s) models with first order elimination were tested [8, 10, 11, 17].

We used an exponential random effects model for each pharmacokinetic parameter. We assumed the random effects to have a normal distribution with a mean of 0 and a variance of ω^2 . Correlation (ρ) between individual random effects was kept in the model if the estimated correlation coefficient was ≥ 0.2 . The residual error model was supposed to be additive, proportional or combined, with a being the standard deviation of the additive component and b the standard deviation of the proportional component.

The best model was chosen using the Bayesian information criteria (BIC), derived for each model from the computation of likelihood by importance sampling [18].

Covariate model building

The influence of the following covariates at initiation of treatment on amikacin pharmacokinetic parameters was tested: three demographic variables (age, gender, and total body weight), two clinical variables (shock and edema score [19]), two severity scores (SOFA [13] and SAPS-II [14]), two ventilator-related parameters (PEEP and $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ ratio), and three biochemical markers (serum albumin, total bilirubin and 4-h creatinine clearance). Four-hour creatinine clearance was calculated using serum creatinine level and a 4-h urine collection at the day of inclusion. This approach has been validated for monitoring renal function in critically ill patients [20]. Missing values for tested covariates were imputed to the median value observed in the analysis population. Steps for selection of covariate model are described in Online Resource 1.

Final model determination

We graphically studied the influence of covariates on their related pharmacokinetic parameters. Outliers were studied and excluded from analysis when there was a suspicion of incomplete data collection, in particular for creatinine clearance

which was estimated using a 4-h urine collection. Patients for whom covariates had been imputed were also excluded. The covariate model was adjusted to the reduced population obtained after exclusion of these patients, and a backward selection method was used in order to obtain a final model in which all covariates had a p value < 0.05 using the likelihood-ratio test.

The coefficient estimated for creatinine clearance was compared to 1 using the likelihood ratio test.

Model evaluation

Evaluation of the final model was conducted using graphical methods. Basic goodness-of-fit plots were used, as well as the individual weighted residuals (IWRES) and the normalized prediction distribution errors (NPDE) over time and the visual predictive check (VPC). NPDE and VPC were generated using 500 Monte Carlo simulations.

Evaluation of doses by simulation

Using the estimated distribution of amikacin pharmacokinetic parameters in the final model with covariates, we simulated amikacin concentration obtained 1 h after the start of a 30-min infusion and AUC for 1000 patients by Monte Carlo simulation for several dosing regimens. This timing for amikacin sampling is commonly used for studying amikacin efficacy [17]. For pharmacokinetic simulations, we randomly re-sampled 1000 vectors of covariates among those observed in the patients included in the analysis and simulated individual pharmacokinetic parameters from their estimated distribution in the final model with covariates. Simulated dose regimens were the following: 20, 25, 30, 35, and 40 mg/kg. We computed the probability to achieve a C_{1h}/MIC ratio ≥ 10 and an AUC/MIC ratio ≥ 90 for MICs ranging from 0.25 to 64 mg/L for each of these dosing regimens. These values are usually observed in clinical practice (http://www.eucast.org/mic_distributions/), with an 8 mg/l susceptibility breakpoint for Enterobacteriaceae species and *P. aeruginosa*.

Results

Patients' characteristics

Of the 61 patients included in the IMPACT trial, one had a kinetic profile which was not compatible with a unique injection and was withdrawn from analysis. Thus, data from 60 patients were available for modeling. Patients' characteristics are presented in Table 1. Median (min-max) age and total body weight were respectively 61.5 years (28–84) and 78 kg

Table 1 Characteristics of the 60 patients included in the analysis. Values are given as median (min-max) or n [%]. PEEP, positive end expiratory pressure

Variable	Value
Age (years)	61.5 (28–84)
Female	13 [22]
Total body weight (kg)	78 (45–126)
SAPS-II	42 (19–90)
SOFA	7 (2–17)
Edema score ^a	7 (0–17)
Shock	26 [43]
PEEP (mmH ₂ O)	6 (0–15)
PaO ₂ /FIO ₂ ratio (mmHg)	169 (57–302)
4-h creatinine clearance (ml/min) ^b	82 (4–412)
Serum albumin (g/L) ^c	19 (10–44)
Serum bilirubin (μmol/L) ^d	7 (2–55)

^a Values for 11, 5, 25, and 17 subjects were missing for edema score, creatinine clearance, and serum albumin and bilirubin, respectively

(45–126), and most patients were males ($n=47$, 78 %). At inclusion, 26 patients had septic shock (43 %). Median SAPS-II and SOFA scores were 42 (19–90) and 7 (2–17), respectively, and median 4-h creatinine clearance was 82 mL/min (4–412).

Pharmacokinetic data and modeling

A total of 291 values of amikacin concentrations were available, with a median of 5 per patient (3–5). Median amikacin dose administered was 20 mg/kg (11–28). Median serum concentration observed 1 h after the beginning of infusion was 45 mg/L (22–87). Individual observed concentrations are presented in Fig. 1. Fourteen values (4.8 %) of amikacin concentration were below the limit of quantification.

Serum concentrations were best described by a two-compartment model with a combined residual error model (Online Resource 2). Correlations between estimates in the basic model were ≥ 0.2 between all individual random effects, and thus kept in the analysis. In this model, amikacin clearance (CL) was estimated to 4.0 L/h, central volume of distribution (V1) to 15.3 L, peripheral volume of distribution (V2) to 22.1 L, and inter-compartmental clearance (Q) to 12.2 L/h (Table 2). Their relative standard errors were satisfactory, all being <10 %. The inter-individual variability of pharmacokinetic parameters ranged from 30 % for Q to 60 % for CL. Estimates of inter-individual variability of pharmacokinetic parameters were also satisfactory (Table 2). The goodness of fit plots of this model without covariate did not show any model deficiency (data not shown).

Among the 12 studied covariates, eight were significantly associated with the individual Bayes estimates of

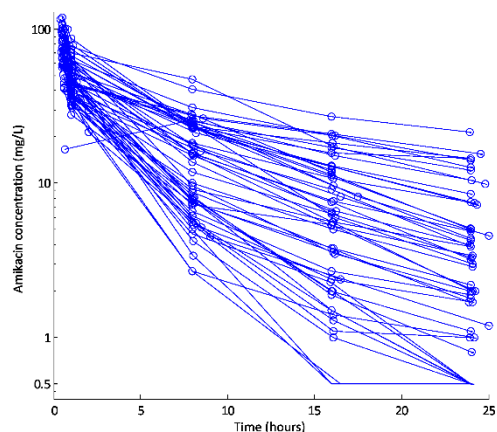


Fig. 1 Observed amikacin pharmacokinetic profiles of the 60 patients included in the analysis, after a single 30-min infusion. Median (min-max) doses administered were 20 mg/kg (11–28)

pharmacokinetic parameters (Online Resource 1). The best model included four covariates (Online resource 1): creatinine clearance for CL, total body weight and PaO₂/FIO₂ ratio for V1, and creatinine clearance for V2. Two patients presented a low creatinine clearance but a high amikacin clearance. Their individual fits were satisfactory, and we hypothesized that their urine collection was incomplete. They were excluded from the analysis. In another patient, amikacin clearance was estimated to 11 mL/min, but creatinine clearance was missing and had been imputed to the median value. The five patients in whom creatinine clearance was not available were excluded. The four-covariate model was adjusted to the 53 remaining patients.

Creatinine clearance was no longer a significant covariate for V2 ($p=0.4$), and the final model included three covariates: creatinine clearance ($p<0.001$) for CL, total body weight ($p<0.001$), and PaO₂/FIO₂ ratio ($p<0.001$) for V1 (Table 2). The coefficient for creatinine clearance on CL was significantly different from 1 ($p<0.001$). The variations of pharmacokinetic parameters according to covariates are presented in Fig. 2. All three of them were positively correlated with the pharmacokinetic parameters. Amikacin clearance was estimated in the final model at 4.3 L/h (72 mL/min), V1 at 15.9 L, and V2 at 21.4 L (Table 2). Variance-covariance matrix between the individual random effects is presented in Online Resource 3.

Goodness-of-fit plots did not show any model misspecification. The IWRES and NPDE were centered to zero and did not show any trend over time (Online Resource 4). The VPC did not show any model deficiency (Fig. 3).

Table 2 Estimated population pharmacokinetics parameters for the basic and final model

Parameter/coefficient	Basic model (60 patients)		Final model (53 patients)		
	Estimate	RSE (%)	Estimate	RSE (%)	<i>p</i> value
CL (L/h)	4.0	7	4.3	4	
$-\beta_{CrCl-4h}$	–	–	0.7	8	<0.001
V1 (L)	15.3	5	15.9	4	
$-\beta_{TBW}$	–	–	0.9	19	<0.001
$-\beta_{P/F}$	–	–	0.4	28	<0.001
Q (L/h)	12.2	6	12.1	7	
V2 (L)	22.1	7	21.4	7	
ω_{Cl}	0.6	8	0.3	10	
ω_{V1}	0.3	14	0.2	20	
ω_Q	0.3	27	0.3	32	
ω_{V2}	0.5	13	0.5	14	
$\rho(Cl,V1)$	0.3	59	0.1	141	
$\rho(Cl,Q)$	–0.4	58	–0.7	33	
$\rho(V1,Q)$	0.4	89	0.6	87	
$\rho(Cl,V2)$	0.3	52	0.1	179	
$\rho(V1,V2)$	0.2	100	0.1	167	
$\rho(Q,V2)$	0.2	95	0.03	10 ³	
a (mg/L)	0.2	15	0.2	17	
b	0.1	12	0.1	12	

a additive component for the residual error model, *b* proportional component for the residual model error, β covariate effect on related pharmacokinetic parameter, CL amikacin clearance, $CrCl-4h$ 4-h creatinine clearance, TBW total body weight, P/F PaO₂/FIO₂ ratio, RSE relative standard error

Pharmacokinetic simulations

Probabilities to achieve a C_{1h}/MIC ratio ≥ 10 according to the single-dose of amikacin simulated and MICs are presented in Fig. 4. A 20 mg/kg dose was sufficient to achieve the pharmacokinetic target in 100 % of patients for a MIC of 2 mg/L or less. With this dose, only 80 % and 4 % of patients achieved the target for a MIC of 4 and 8 mg/L, respectively. With a 25 mg/kg simulated infusion, the probability to reach the target was 96 % for a MIC of 4 mg/L and 20 % for a MIC of 8 mg/L. With the 40 mg/kg regimen, the probability to achieve a C_{1h}/MIC ratio ≥ 10 was 80 % for a MIC of 8 mg/L. Online Resource 5 presents the boxplots of the 1000 simulated C_{1h}/MIC ratio for a MIC of 8 mg/L, for doses from 20 to 40 mg/kg.

Results were similar when considering the target of $AUC/MIC \geq 90$ (Online Resource 6). With a dose of 20 mg/kg, 90 % of patients achieved the target for a MIC of 2 mg/L or less, but this proportion was below 20 % for a MIC value of 8 mg/L. Simulations for a dose of 25 mg/kg showed that 69 % of patients achieved the pharmacodynamic target for a MIC of 4 mg/L, but only 22 % did for a MIC of 8 mg/L. An increase to 40 mg/kg led to an increase of the probability to reach the pharmacodynamic target to 90 % and 52 % for a MIC of 4 and 8 mg/L, respectively.

Discussion

The present study confirms that the 20 mg/kg single-dose regimen traditionally used is not adequate based on the analyzed pharmacokinetic and pharmacodynamic indices and that amikacin dosing regimen should be increased to at least 25 mg/kg for critically ill patients when initiating empirical amikacin therapy for VAP caused by a Gram-negative rod. This increase has been recently suggested by Taccone et al. [17]. To our knowledge, few data supported this recommendation [21, 22]. Those studies did not use a population approach and were performed in patients with severe sepsis or septic shock, thereby gathering patients with different varieties of infection. Although the influence of the nature of infection has not been thoroughly examined, some authors suggested that the clinical diagnosis might influence the pharmacokinetic parameters of aminoglycosides [10]. We focused our analysis on a homogenous group of patients. Our simulation-based analysis, using data from a prospective multicenter trial and a solid methodology, confirms the results of Taccone et al. [17], and suggest that a higher initial dose is necessary, at least in patients requiring mechanical ventilation.

A comparative study of different initial amikacin dosing regimen would confirm our conclusions. It would also allow to study the impact of higher doses on renal function.

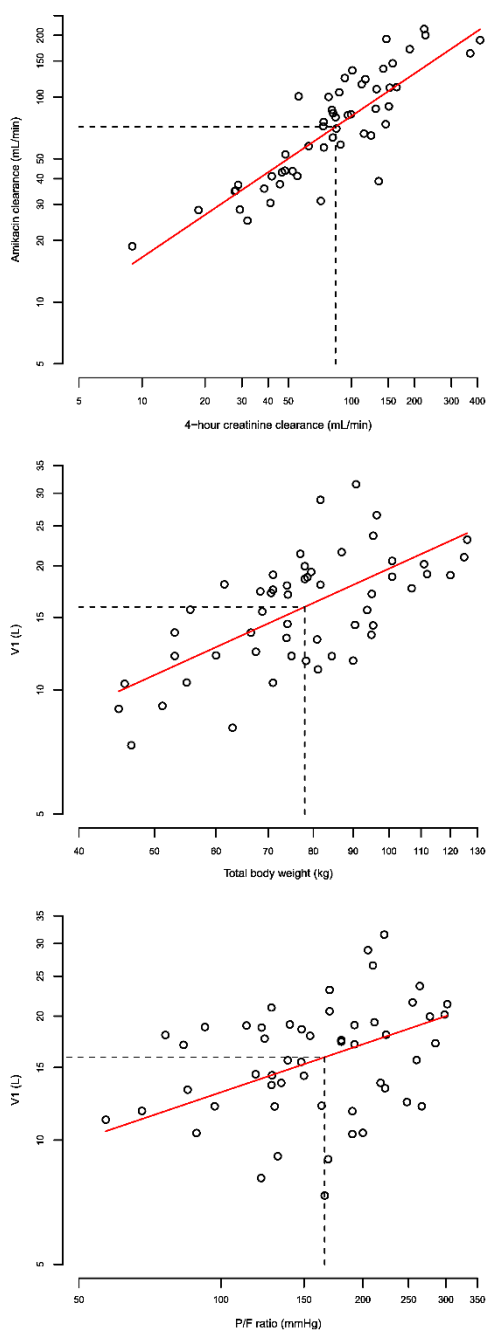


Fig. 2 Changes in amikacin pharmacokinetic parameters with respect to covariates in the final model. Circles correspond to observed values; red curves represent the changes of pharmacokinetic parameters according to estimated covariate model; dashed lines correspond to the median observed values. P/F, $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$

Nephrotoxicity is a well-known adverse effect of aminoglycoside therapy. However, this effect has been associated with duration of therapy [23]. Available studies suggest that short-course treatments would allow to minimize toxicity while keeping maximal efficacy [24]. In the majority of severe infections, aminoglycosides are administered as a single infusion in combined antimicrobial therapy. Higher single doses would therefore have potentially limited or no effect on renal function, as suggested by recent studies [21, 22]. It should also be noticed that neuromuscular blockade might have an increased frequency when using higher doses of aminoglycosides [25]. Its main manifestation is respiratory weakness, and this side effect is reversible. It would have a limited impact on patients with mechanical ventilation.

Another result is that amikacin clearance and volume of distribution were estimated to approximately 70 mL/min and 37 L, respectively. These values were in accordance with published data on ICU patients. This confirms the issues observed in antimicrobial pharmacokinetic parameters in critically ill patients [26, 27], i.e., a decrease of drug clearance and an increase of volume of distribution [28–32]. Significant covariates were 4-h creatinine clearance for amikacin clearance, and total body weight and $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ ratio for central volume.

The association between total body weight and volume of distribution has already been reported [9, 10, 33], and administered amikacin doses are commonly adjusted to total body weight. It is still not clear which measure of body size best describes pharmacokinetic parameters. A recent meta-analysis explored the relationship between drug clearance and body size metrics [34]. The authors found that lean body weight to the exponent $2/3$ was more suitable for describing the relationship between drug clearance and body size. However, they did not question the link between the volume of distribution and body size, and this conclusion may not apply for all pharmacokinetic parameters. As body size was not collected in the IMPACT trial, we could not investigate the effect of this weight metrics or of body mass index on amikacin pharmacokinetic parameters. For hydrophilic drugs such as aminoglycosides, data on the influence of lean body weight and drug volume of distribution are lacking and would be of interest.

The BIC was not improved by adding total body weight as a covariate for V2. This is quite unexpected, and V2 might represent a weight-independent compartment in which amikacin accumulates. It has previously been shown that total urine recovery of amikacin is not complete 24 h after its

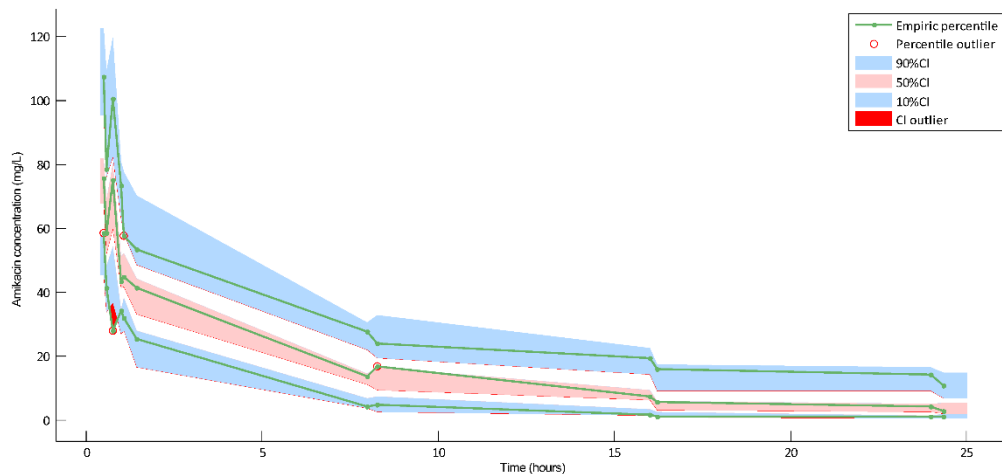


Fig. 3 Visual predictive check for the final model. *CI* confidence interval

administration and that aminoglycosides including amikacin accumulates in the kidney [35, 36].

We found a high interindividual variability in amikacin pharmacokinetic parameters as previously reported in studies performed among critically ill patients [8, 37]. Significant covariates reduced this variability, with a 50 % maximal decrease for amikacin CL in our study. To our knowledge, no published covariate model could fully explain the observed interindividual variability. It is therefore highly probable that inside diagnosis-homogeneous groups of patients,

subpopulations exist that are not individualized by usual covariates. Such variability makes the choice of the optimal dosing strategy extremely challenging from an individual perspective. Considering the absence of severe adverse effect expected in a single-dose setting, mechanically ventilated patients in intensive care units should receive a high amikacin dose in order to maximize the probability of pharmacodynamic target attainment. Further studies should furthermore focus on identification of covariates allowing for reducing the high unexplained interindividual variability.

The main limitation of this study is that it was restricted to a limited number of patients who had a suspicion on VAP. Therefore, the results may not apply to patients who do not require mechanical ventilation. Nevertheless, the French surveillance network of nosocomial infections recently reported that about 60 % of patients hospitalized in ICU would require mechanical ventilation during their stay [38]. Another limitation is the use of the MIC breakpoint for Monte Carlo simulations. To our knowledge, no published data report the distribution of MICs for Gram-negative bacilli responsible for infection in intensive care units. As bacteria involved in infection of critically ill patients frequently have higher MICs than those isolated from patients hospitalized in other wards, we did not use published MICs distributions that gather strains obtained from all wards. A recent study of MIC breakpoints based on simulations suggested that pharmacokinetic-pharmacodynamic breakpoints are similar to those defined by the EUCAST or the CLSI [39]. In the empirical setting, the worst-case assumption should be preferred when initiating an antimicrobial therapy. This approach is currently used for pharmacokinetic-pharmacodynamic simulations [17, 40, 41]. However, it is likely that the majority of Gram-negative rods

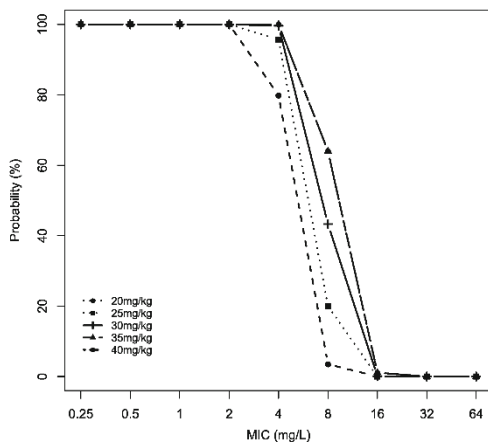


Fig. 4 Probability to achieve the pharmacokinetic target ($C_{1h}/MIC \geq 10$) according to the single-dosing regimen and the theoretical minimum inhibitory concentration of the strain in the Monte Carlo simulation. *MIC* minimal inhibitory concentration

involved in critical infections have a MIC below 8 mg/L. For a MIC of 4 mg/L, 96 % of patients achieved a C_{1h}/MIC ratio ≥ 10 after a dose of 25 mg/kg in our simulations.

In conclusion, amikacin pharmacokinetic parameter values were similar to those previously reported. This study confirms recent results for the determination of the initial amikacin dose required in critically ill patients. An empirical dose of 25 mg/kg or more is needed to achieve the amikacin pharmacodynamic predictors of clinical efficacy in Gram-negative bacilli infections. Other studies are needed to prospectively evaluate these conclusions in order to improve the management of patients with severe infections.

Acknowledgments This study was funded by the Contrat d'Initiation à la Recherche Clinique 2006 (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Département de la Recherche Clinique et du Développement, CRC 06049)

Authors' contributions FM, LAL, MW, and OP conceived the study. AF, MW, and OP provided medical care to trial participants. LM performed the pharmacological assays. CB, CC, CL, and FM performed the statistical analysis. CB, FM, MW, and OP wrote the first draft of the manuscript. All authors read and agreed with the manuscript in its published version.

Conflict of interest All authors declare no support from any organization for the submitted work; no financial relationship with any organization that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activity that could appear to have influenced the submitted work.

References

- Bouadma L, Wolff M, Lucet JC (2012) Ventilator-associated pneumonia and its prevention. *Curr Opin Infect Dis* 25(4):395–404
- Zahar JR, Timsit JF, Garrouste-Orgeas M, Francois A, Vesin A, Descorps-Declere A, Dubois Y, Souweine B, Haouache H, Goldgran-Toledano D, Allaouchiche B, Azoulay E, Adrie C (2011) Outcomes in severe sepsis and patients with septic shock: pathogen species and infection sites are not associated with mortality. *Crit Care Med* 39(8):1886–1895
- Zahar JR, Timsit JF, Garrouste-Orgeas M, Francois A, Vesin A, Descorps-Declere A, Dubois Y, Souweine B, Haouache H, Goldgran-Toledano D, Allaouchiche B, Azoulay E, Adrie C (2005) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171(4):388–416
- Barza M, Ioannidis JP, Cappelleri JC, Lau J (1996) Single or multiple daily doses of aminoglycosides: a meta-analysis. *BMJ* 312(7027):338–345
- Moore RD, Lietman PS, Smith CR (1987) Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *J Infect Dis* 155(1):93–99
- Kashuba AD, Nafziger AN, Drusano GL, Bertino JS Jr (1999) Optimizing aminoglycoside therapy for nosocomial pneumonia caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 43(3):623–629
- Zelenitsky SA, Harding GK, Sun S, Ubhi K, Ariano RE (2003) Treatment and outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: an antibiotic pharmacodynamic analysis. *J Antimicrob Chemother* 52(4):668–674
- Delattre IK, Musuamba FT, Nyberg J, Taccone FS, Laterre PF, Verbeeck RK, Jacobs F, Wallemacq PE (2010) Population pharmacokinetic modeling and optimal sampling strategy for Bayesian estimation of amikacin exposure in critically ill septic patients. *Ther Drug Monit* 32(6):749–756
- Bacopoulou F, Markantonis SL, Pavlou E, Adamidou M (2003) A study of once-daily amikacin with low peak target concentrations in intensive care unit patients: pharmacokinetics and associated outcomes. *J Crit Care* 18(2):107–113
- Romano S, Fdez DM, de Gatta M, Calvo V, Mendez E, Dominguez-Gil A, Lanao JM (1998) Influence of clinical diagnosis in the population pharmacokinetics of amikacin in intensive care unit patients. *Clin Drug Investig* 15(5):435–444
- Lugo G, Castaneda-Hernandez G (1997) Relationship between hemodynamic and vital support measures and pharmacokinetic variability of amikacin in critically ill patients with sepsis. *Crit Care Med* 25(5):806–811
- EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Consulted on 03/02/2013, available at : http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG (1996) The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the European society of intensive care medicine. *Intensive Care Med* 22(7):707–710
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F (1993) A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 270(24):2957–2963
- White LO, Holt HA, Reeves DS, MacGowan AP (1997) Evaluation of inoffluor fluorescence polarization immunoassay kits for the determination of serum concentrations of gentamicin, tobramycin, amikacin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 39(3):355–361
- Samson A, Lavielle M, Mentré F (2006) Extension of the SAEM algorithm to left-censored data in non-linear mixed-effects model: application to HIV dynamics model. *Comput Stat Data Anal* 51(3):1562–1574
- Taccone FS, Laterre PF, Spapen H, Dugemier T, Delattre I, Layeux B, De Backer D, Wittebole X, Wallemacq P, Vincent JL, Jacobs F (2010) Revisiting the loading dose of amikacin for patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care* 14(2):R53
- Lavielle M, Mentré F (2007) Estimation of population pharmacokinetic parameters of saquinavir in HIV patients with the MONOLIX software. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 34(2):229–249
- Gomez CM, Cordingley JJ, Palazzo MG (1999) Altered pharmacokinetics of ceftazidime in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43(7):1798–1802
- Pickering JW, Frampton CM, Walker RJ, Shaw GM, Endre ZH (2012) Four h creatinine clearance is better than plasma creatinine for monitoring renal function in critically ill patients. *Crit Care* 16(3):R107
- Galvez R, Luengo C, Comejo R, Kosche J, Romero C, Tobar E, Illanes V, Llanos O, Castro J (2011) Higher than recommended amikacin loading doses achieve pharmacokinetic targets without associated toxicity. *Int J Antimicrob Agents* 38(2):146–151
- Mahmoudi L, Mohammadpour AH, Ahmadi A, Niknam R, Mojtahedzadeh M (2013) Influence of sepsis on higher daily dose of amikacin pharmacokinetics in critically ill patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17(3):285–291
- Bertino JS Jr, Booker LA, Franck PA, Jenkins PL, Franck KR, Nafziger AN (1993) Incidence of and significant risk factors for aminoglycoside-associated nephrotoxicity in patients dosed by using individualized pharmacokinetic monitoring. *J Infect Dis* 167(1):173–179

24. Drusano GL, Ambrose PG, Bhavnani SM, Bertino JS, Nafziger AN, Louie A (2007) Back to the future: using aminoglycosides again and how to dose them optimally. *Clin Infect Dis* 45(6):753–760
25. Snively S, Hodges G (1984) The neurotoxicity of antibacterial agents. *Ann Intern Med* 101(1):92–104
26. Roberts JA, Lipman J (2009) Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Crit Care Med* 37(3):840–851, quiz 859
27. Pea F, Viale P, Furlanut M (2005) Antimicrobial therapy in critically ill patients: a review of pathophysiological conditions responsible for altered disposition and pharmacokinetic variability. *Clin Pharmacokinet* 44(10):1009–1034
28. Lode H, Grunert K, Koeppe P, Langmaack H (1976) Pharmacokinetic and clinical studies with amikacin, a new aminoglycoside antibiotic. *J Infect Dis* 134(SUPPL.):S316–S322
29. Tormo C, Abad FJ, Ronchera-Oms CL, Parra V, Jimenez NV (1995) Critically ill patients receiving total parenteral nutrition show altered amikacin pharmacokinetics. *Clin Nutr* 14(4):254–259
30. Marik PE (1993) Aminoglycoside volume of distribution and illness severity in critically ill septic patients. *Anaesth Intensive Care* 21(2):172–173
31. Bressolle F, Gouby A, Martinez JM, Joubert P, Saissi G, Guillaud R, Gomeni R (1996) Population pharmacokinetics of amikacin in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 40(7):1682–1689
32. Marik PE, Havlik I, Monteagudo FS, Lipman J (1991) The pharmacokinetic of amikacin in critically ill adult and paediatric patients: comparison of once- versus twice-daily dosing regimens. *J Antimicrob Chemother* 27(Suppl C):81–89
33. Fernandez M, de Gatta MD, Victoria Calvo M, Ardanuy R, Dominguez-Gil A, Lanao JM, Moreno SR (2009) Evaluation of population pharmacokinetic models for amikacin dosage individualization in critically ill patients. *J Pharm Pharmacol* 61(6):759–766
34. McLeay SC, Morrish GA, Kirkpatrick CM, Green B (2012) The relationship between drug clearance and body size: systematic review and meta-analysis of the literature published from 2000 to 2007. *Clin Pharmacokinet* 51(5):319–330
35. Edwards CQ, Smith CR, Baughman KL, Rogers JF, Lietman PS (1976) Concentrations of gentamicin and amikacin in human kidneys. *Antimicrob Agents Chemother* 9(6):925–927
36. French MA, Cerra FB, Plaut ME, Schentag JJ (1981) Amikacin and gentamicin accumulation pharmacokinetics and nephrotoxicity in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 19(1):147–152
37. Joubert P, Bressolle F, Gouby A, Doucot PY, Saissi G, Gomeni R (1999) A population approach to the forecasting of amikacin plasma and urinary levels using a prescribed dosage regimen. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 24(1):39–46
38. Savey A, Machut A (2012) Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, Réseau REA-Raisin, France, Résultats 2011. Available at <http://www.invs.sante.fr/%20fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Surveillance-des-infections-nosocomiales-en-reanimation-adulte>. In: ed
39. Frei CR, Wiederhold NP, Burgess DS (2008) Antimicrobial breakpoints for gram-negative aerobic bacteria based on pharmacokinetic-pharmacodynamic models with Monte Carlo simulation. *J Antimicrob Chemother* 61(3):621–628
40. Carlier M, Noe M, De Waele JJ, Stove V, Verstraete AG, Lipman J, Roberts JA (2013) Population pharmacokinetics and dosing simulations of amoxicillin/clavulanic acid in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* 68(11):2600–2608
41. de Montmollin E, Bouadma L, Gault N, Mourvillier B, Mariotte E, Chemam S et al. (2014) Predictors of insufficient amikacin peak concentration in critically ill patients receiving a 25 mg/kg total body weight regimen. *Intensive Care Med*