



HAL
open science

Etude de la dynamique temporelle du microbiote digestif des bovins domestiques pour la compréhension du portage de clones d'*Escherichia coli* pathogènes et résistants aux antibiotiques

Ménil Massot

► **To cite this version:**

Ménil Massot. Etude de la dynamique temporelle du microbiote digestif des bovins domestiques pour la compréhension du portage de clones d'*Escherichia coli* pathogènes et résistants aux antibiotiques. Biologie moléculaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC328 . tel-03032943

HAL Id: tel-03032943

<https://theses.hal.science/tel-03032943v1>

Submitted on 1 Dec 2020

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

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (ED 562)

Infection, Antimicrobiens, Modélisation, Évolution (IAME)

UMR1137, INSERM, Universités Paris Diderot et Paris Nord

Étude de la dynamique temporelle du microbiote
digestif des bovins domestiques pour la
compréhension du portage de clones
d'*Escherichia coli* pathogènes et résistants aux
antibiotiques

Par MÉRIL MASSOT

Thèse de doctorat de microbiologie

Directeur : Erick Denamur

Codirectrice : France Mentré

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 20 novembre 2018

Président du jury : Dr Jean-Yves Madec, ANSES
Rapporteurs : Dr Delphine Sergentet-Thévenot, VetAgroSup, Université Claude Bernard Lyon 1
Dr Hervé Perdry, Inserm, Université Paris Sud
Examineurs : Dr Emmanuelle Le Chatelier, INRA
Dr Florence Hommais, Université Claude Bernard Lyon 1
Directeur de thèse : Pr Erick Denamur, IAME, Inserm, Université Paris Diderot
Codirectrice de thèse : Pr France Mentré, IAME, Inserm, Université Paris Diderot



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Titre : Étude de la dynamique temporelle du microbiote digestif des bovins domestiques pour la compréhension du portage de clones d'*Escherichia coli* pathogènes et résistants aux antibiotiques

Résumé : Les usages antibiotiques chez les bovins domestiques combinés à l'immense diversité et plasticité génomique de l'espèce *Escherichia coli* multiplient les contextes favorables à l'émergence au sein du microbiote digestif bovin de souches productrices de toxines de Shiga (STEC) et de souches résistantes aux antibiotiques. Cependant, la grande variété des systèmes d'élevage complique notre compréhension du risque sanitaire global que ces populations bactériennes représentent. Dans ce travail, nous avons eu recours à deux modèles bovins pour comprendre le contexte écologique et génomique de la dynamique de portage fécal des STEC et des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques au sein de leur réservoir.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux populations commensales d'*E. coli* de vaches adultes en l'absence d'exposition antibiotique, dans une zone rurale au Zimbabwe, où l'impact des activités humaines sur le microbiote intestinal des bovins était aussi faible que possible. Nous avons mis en évidence des populations commensales d'*E. coli* multiclones et spécifiques de leur hôte, avec un taux de rotation des clones dominants similaire entre les vaches et une taille de population stable sur une courte période de temps. Des STEC et des clones résistants aux antibiotiques ont été détectés de manière transitoire. Dans un second temps, nous avons étudié le microbiote fécal de veaux de boucherie en élevage intensif dans des fermes d'engraissement en Bretagne. Dès leur plus jeune âge, ces veaux reçoivent par voie orale, et sur de longues périodes, des traitements antibiotiques polychimiques. Dans une première étude, nous avons mis en évidence une transformation de leur microbiote fécal, avec une augmentation de la diversité intra-veau au cours de l'engraissement et un phénomène de convergence accélérée lors du premier mois. Un effet des antibiotiques a été observé sur la diversité intra-veau mais était limité dans le temps, ce qui suggère une résilience forte du microbiote fécal aux antibiotiques. Chez ces veaux, la taille de la population d'*E. coli* était impactée par la dose de lactose et atteignait un maximum lors du deuxième mois de l'engraissement, avec une influence des antibiotiques sur sa dynamique temporelle. Dans une seconde étude, nous avons montré que les veaux étaient colonisés par divers clones d'*E. coli* producteurs de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et multi-résistants, dont la persistance du portage semblait liée à l'antibiothérapie au début de l'engraissement et à leur capacité de diffusion au sein d'une ferme.

Les résultats de ces travaux montrent l'existence de plusieurs dynamiques des populations commensales bactériennes à différents niveaux de granularité. L'exposition prolongée aux antibiotiques des veaux de boucherie en début d'engraissement suivie d'une expansion de la niche écologique des *E. coli* commensaux a induit une colonisation massive et persistante de celle-ci par des clones producteurs de BLSE. Des clones STEC multi-résistants et producteurs de BLSE ont été retrouvés chez les veaux de boucherie. L'un de ces clones est un pathovar hybride émergent, responsable de syndromes hémolytiques et urémiques associés à des septicémies chez l'homme.

Mots clefs : bovin, microbiote fécal, *Escherichia coli* commensaux, résistance aux antibiotiques, *E. coli* producteurs de toxines de Shiga

Title: Study of temporal dynamics of gut microbiota in cattle to understand carriage of pathogenic and antibiotic resistant *Escherichia coli* clones

Abstract: Antibiotic usages in cattle combined with the huge diversity and genomic plasticity of the *Escherichia coli* bacteria enhance the emergence of Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) and antibiotic resistant *E. coli* within bovine gut microbiota. The diversity of cattle farming complicates our global understanding of these significant public health burdens. In the present work, we focused on two cattle models to study the ecological and genomic contexts of STEC and *E. coli* resistant strains carriage dynamics.

First, we investigated the temporal pattern of commensal *E. coli* populations in cows reared without antibiotic exposure, in a rural zone in Zimbabwe, in a short timeframe. In this area, impacts of human activities on bovine gut microbiota were limited. We showed that the structure of these *E. coli* populations was multiclonal and specific to their host, with a clonal turnover similar between cows. Population sizes were stable over time. STEC and antibiotic resistant *E. coli* were detected transiently. Second, we studied the dynamics of fecal microbiota of veal calves in intensive farming in Britain, France. From an early age, they received antibiotics orally and over long periods. In a first study, we showed that fecal microbiota underwent shifts with an increase of intra-calf diversity and convergent temporal dynamics in the first month. Antibiotics effect was observed on the intra-calf diversity, but was limited in time, suggesting a high resilience of fecal microbiota to antibiotics. In these calves, *E. coli* population size was impacted by the variations of lactose doses they received, with a maximum reached in the second month of fattening. Antibiotics also had a likely effect on *E. coli* population dynamics. In a second study, we showed that most of these calves were colonized by different extended spectrum β lactamases producing *E. coli* (ESBL *E. coli*). Their persistence was impacted by the use of antibiotics at the start of fattening and their abilities to diffuse within a farm.

Taken together, these results show the existence of several dynamics at different levels of granularity of the fecal microbiota of cattle. Extended exposition to antibiotics at the start of fattening followed by expansion of the ecological niche of *E. coli* in veal calves induced a massive and persistent colonization of *E. coli* populations by ESBL-producing clones. Multiresistant and ESBL-producing STEC were found in veal calves. One of these clones was an emergent hybrid pathotype associated with uremic and hemolytic syndrome and septicemia in humans.

Keywords: cattle, fecal microbiota, commensal *Escherichia coli*, antibiotic resistance, Shiga toxin producing *E. coli*

Remerciements

Merci aux membres du jury de me faire l'honneur de juger mon travail et d'y avoir consacré du temps :

*A **Delphine Sergentet** et **Hervé Perdry**, d'avoir accepté d'en être les rapporteurs,*

*A **Emmanuelle Le Chatelier**, **Florence Hommais** et **Jean-Yves Madec** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse,*

*A **Erick**, merci de m'avoir donné une chance il y a bientôt cinq ans déjà et d'avoir cru en moi. Merci pour votre indéfectible soutien et tout ce que vous m'avez appris.*

*A **France**, merci pour ta confiance. Merci de m'avoir accueilli dans ton équipe, laissé le temps d'y prendre mes marques et m'avoir fait découvrir le vaste monde des statistiques.*

Merci à tous les deux pour votre bienveillance. Vous m'avez fait grandir et ouvert à de nouveaux horizons.

Merci à ceux qui ont participé, de près ou de loin aux travaux présentés dans cette thèse. Je pense notamment:

*A **Alexandre Caron et sa famille**, pour m'avoir accueilli dans la savane Zimbabwéenne, ainsi qu'à **Antoine Andreumont** pour m'avoir fait découvrir une problématique passionnante et des contrées inoubliables.*

*A **Marisa et Jean-Yves**, pour votre disponibilité, ainsi que nos discussions scientifiques aussi bien qu'amicales.*

*A **Mélanie**, pour ta disponibilité, ta capacité à prévenir les boulettes, tes super pouvoirs de résolution des problèmes de biologie moléculaire ou d'autres ordres ;-). Merci pour ton soutien et ta patience devant mon obstination vaine à vaincre le Qubit.*

*A **Adrien**, **Antoine**, et **Mohamed**, pour m'avoir initié à la programmation en bash et à la bioinfo. Grâce à vous je peux désormais analyser des données de séquençage ET faire rire avec des blagues de geek 😊
Aux autres membres du **club microbiote de IAME** : **Jimmy**, **Charles**, et **Olivier**, pour vos conseils et votre émulation scientifique.*

*A **Camille Couffignal**, pour ton aide et ton encadrement enrichissant,*

*A **Olivier** pour ton aide et tes conseils,*

*A **Thu Thuy et Guilhem**, pour votre aide et votre gentillesse à l'épreuve des mails à répétition...*

*A **Catherine Boileau**, **Diane Descamps** et **Gilles Collin** pour la mise à disposition de votre matériel et votre aide,*

*A **Catherine Branger** et **Luce Landraud** qui m'ont initié au monde des plasmides et des gènes CTX-M.*

*A **Bertrand Picard**, pour votre accueil chaleureux et nos discussions autour d'un café qui nous amenaient parfois un peu loin des bactéries !*

*A l'entité : **Anne-Claire**, **Marine**, **Marion**, qui ont pavé ces trois années de bons moments, de rires et d'amitié*

*Mais aussi à tous les autres membres des équipes de IAME : **Camille**, **André**, **Bénédicte**, **Anaïs**, **Françoise**, **Houda**, **Naouale**, **Anne**, **Emmanuelle** ... pour ne citer qu'eux. Votre soutien et votre bonne humeur me font aller au travail tous les jours avec plaisir.*

*A **Maman**, **Marie Laurence**, **Philippe**, **Solenne** et **Paolo**, pour votre compréhension, vos encouragements et votre affection.*

*Et enfin à mon compagnon **Thomas**. Merci de m'avoir suivi et soutenu dans cette aventure périlleuse sans faillir, toujours avec ta bonne humeur et ce grain de folie qui rendent la vie à tes côtés merveilleuse.*

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES EQUATIONS.....	13
INTRODUCTION : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF GENERAL DE LA THESE	14
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I. Les communautés bactériennes fécales du bovin domestique	18
1. Transformations du microbiote fécal au cours de la vie d'un bovin	18
2. Les forces qui structurent le microbiote fécal.....	23
3. Les populations commensales d' <i>E. coli</i>	30
4. Synthèse	41
II. Perturbations des communautés bactériennes fécales : le rôle des antibiotiques	43
1. Données épidémiologiques sur l'exposition aux antibiotiques en médecine vétérinaire	43
2. Effets indésirables des antibiotiques sur le microbiote fécal.....	48
3. Effets indésirables des antibiotiques sur les populations commensales d' <i>E. coli</i>	53
4. Synthèse	61
III. Modélisation des données longitudinales : les modèles linéaires à effets mixtes	62
1. Caractéristiques des données longitudinales.....	62
2. Composantes du modèle linéaire à effets mixtes	64
3. Estimation des paramètres du modèle	69
4. Evaluation du modèle	70
IV. Description des questions scientifiques	72
ÉTUDES EXPERIMENTALES	74
V. Dynamique quotidienne des populations commensales d'<i>E. coli</i> chez des bovins adultes	75
1. Résumé	75
2. Article	80
VI. Dynamique des populations bactériennes chez des veaux de boucherie durant la période d'engraissement	97
1. Présentation du projet et collection des échantillons	97
2. Etude n°1 : dynamique du microbiote fécal chez des veaux de boucherie durant la période d'engraissement.....	103

3. Etude n°2 : portage fécal et clairance de clones d' <i>E. coli</i> producteurs de β -lactamases à spectre étendu chez des veaux de boucherie	163
DISCUSSION GENERALE & CONCLUSION	207
PERSPECTIVES	218
BIBLIOGRAPHIE	221
ANNEXE 1 : L'ANALYSE DU MICROBIOTE FECAL PAR SEQUENÇAGE DU GENE DE L'ARNR 16S.....	237
ANNEXE 2 : RESIDUS DES MODELES DE L'ETUDE N°1 SUR LES VEAUX DE BOUCHERIE	239
ANNEXE 3 : ÉVOLUTION DE L'ABONDANCE RELATIVE DES 10 GENRES DOMINANTS DU MICROBIOTE FECAL AUX AUTRES TEMPS DE PRELEVEMENT	240
ANNEXE 4 : ARTICLE N°2	242

Liste des figures

- Figure 1. Anatomie digestive du veau (A) avant sevrage, (B) en période de transition alimentaire et (C) de la vache adulte (source : laboratoire Mérial). Les régions du tube digestif pour lesquelles des communautés microbiennes ont été décrites dans la littérature sont encadrées en vert. Le côlon et le caecum constituent l'habitat primaire d'*E. coli* et sont colorés en rouge sur les dessins. La caillette est le lieu de digestion du lait par l'organisme du veau. 24
- Figure 2. Nombre de gènes partagés en fonction du nombre de génomes représentatifs de la diversité à l'échelle (A) de l'espèce, extrait de (46) et (B) d'un complexe clonal pathogène, extrait de (49). 32
- Figure 3. Arbre phylogénétique de l'espèce *E. coli*, raciné sur l'espèce *E. fergusonii*. Arbre construit par la méthode du plus proche voisin (« neighbor joining »), à partir de séquences nucléotidiques des gènes *icd* (1166 paires de bases), *papB* (1003 paires de bases), *polB* (1081 paires de bases), *putB* (906 paires de bases), *trpA* (727 paires de bases) et *trpB* (1140 paires de bases). Le groupe B2 est indiqué en rouge, le groupe F en orange, le groupe D en jaune, le groupe E en marron, le groupe C en violet, le groupe B1 en vert et le groupe A en bleu. Extrait de (57). 33
- Figure 4. Construction de la modélisation statistique à effets mixtes. 64
- Figure 5. Exemple de modélisation de données longitudinales à l'aide d'un modèle linéaire simple à effets mixtes. Le terme « AIC » désigne le critère d'information d'Akaike. 66
- Figure 6. Troupeau de vaches de race Nguni rentrant après une journée de pâturage en liberté. 75
- Figure 7. Les quatre vaches dont les populations fécales d'*E. coli* ont été suivies pendant 25 jours. Les vaches étaient désignées sous les numéros C765 (en haut à gauche), C767 (en haut à droite), C1403 (en bas à gauche) et C1458 (en bas à droite). 76
- Figure 8. Courbe de croissance de veaux de boucherie mâles de race Holstein estimée à partir de moyennes et variances de poids mesurés tous les mois pendant six mois chez 154 veaux. 98
- Figure 9. Evolution de la ration quotidienne de fibres et de poudre de lait dans une des fermes où nous avons réalisé l'étude (ferme B). 98
- Figure 10. Veaux de boucherie en ferme d'engraissement. (A) Veaux âgés de 14 jours, à leur arrivée dans la ferme, (B) veaux âgés de 115 jours, au troisième mois d'engraissement. Les veaux présents sur ces photos ne sont pas ceux qui ont été inclus dans l'étude. 99
- Figure 11. Plans d'échantillonnages dans les fermes A, B, et C (présentés respectivement en haut, au milieu et en bas de la figure). « N » est le nombre de veaux échantillonnés. Dans la ferme C, 14 veaux ont été prélevés jusqu'à la fin de l'engraissement car un veau est mort en cours d'étude et a donc été exclu des analyses. Les jours d'échantillonnage pour lesquels les fèces ont été utilisées dans ces deux études sont indiqués en rouge. Les traitements antibiotiques sont indiqués en noir. Un jour de traitement est indiqué par un triangle, un traitement plus long par une barre. Les veaux sont arrivés dans les fermes à l'âge de 14 jours et ont été abattus à cinq mois d'âge. 102
- Figure 12. Indices de diversité rapportés dans une revue des études publiées en 2016 sur le microbiote des animaux par séquençage du gène de l'ARNr 16S. 108
- Figure 13. Exemple de calcul de distance Unifrac non pondérée d'après (183). Un arbre phylogénétique est construit à partir de tous les UTO détectés dans trois communautés différentes (les carrés, les cercles et les triangles représentent l'origine des UTO). Pour chaque arbre contenant les UTO d'une paire de communautés, les branches épaisses et grises sont les branches partagées, et les branches noires et fines sont uniques à une communauté. Plus le nombre d'UTO partagés est grand et plus la somme des longueurs de branches noires et fines est petite. La distance Unifrac pondérée est donc plus faible entre des communautés proches (ronds et triangles) qu'éloignées (ronds et rectangles). 109
- Figure 14. (A – C) Heatmaps construites à partir des distances Unifrac pondérées. Les carrés jaunes indiquent des communautés proches tandis que les carrés rouges indiquent des communautés éloignées. Les panneaux (A), (B), et (C) illustrent les distances entre les veaux au (A) premier échantillonnage (7^{ème} jour), (B) deuxième échantillonnage (21^{ème} jour), et (C) dernier échantillonnage (161^{ème} jour pour les fermes A et B, 147^{ème} jour pour la ferme C). Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de chaque heatmap. A chaque échantillonnage, les veaux sont ordonnés en ligne et en colonne selon la ferme et la classification hiérarchique basée sur les distances Unifrac. (D) Graphiques en spaghetti illustrant pour chaque veau les distances Unifrac pondérées entre échantillons consécutifs. Les veaux de la ferme A, B et C sont représentés respectivement en haut, au milieu, et en bas. Les traitements antibiotiques sont indiqués par des barres grises sous le nom de la ferme dans les panneaux (A), (B), (C) et sous le jour dans (D). 121

- Figure 15. (A – C) Heatmaps construites à partir des distances Unifrac non pondérées. Les carrés orange indiquent des communautés plus proches que les carrés rouges et noirs, qui indiquent des communautés éloignées. Les panneaux (A), (B), et (C) illustrent les distances entre les veaux au (A) premier échantillonnage (7^{ème} jour), (B) deuxième échantillonnage (21^{ème} jour), et (C) dernier échantillonnage (161^{ème} jour pour les fermes A et B, 147^{ème} jour pour la ferme C). Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de chaque heatmap. A chaque échantillonnage, les veaux sont ordonnés en ligne et en colonne selon la ferme et la classification hiérarchique basée sur les distances Unifrac. (D) Graphiques en spaghetti illustrant pour chaque veau les distances Unifrac non pondérées entre échantillons consécutifs. Les veaux de la ferme A, B et C sont représentés respectivement en haut, au milieu, et en bas. Les traitements antibiotiques sont indiqués par des barres grises sous le nom de la ferme dans les panneaux (A), (B), (C) et sous le jour dans (D). 123
- Figure 16. Boîtes à moustaches des distances Unifrac pondérées à chaque date d'échantillonnage. Les distances entre tous les veaux sont représentées en fonction des fermes. Les distances entre les veaux au sein des fermes A, B et C sont colorées respectivement en violet, orange et vert. Pour les distances entre les veaux de fermes différentes, le code couleur correspondant aux fermes est reporté à droite de la figure..... 124
- Figure 17. Boîtes à moustaches des distances Unifrac non pondérées à chaque date d'échantillonnage. Les distances entre tous les veaux sont représentées en fonction des fermes. Les distances entre les veaux au sein des fermes A, B et C sont colorées respectivement en violet, orange et vert. Pour les distances entre les veaux de fermes différentes, le code couleur correspondant aux fermes est reporté à droite de la figure..... 125
- Figure 18. Graphiques en spaghetti des indices de Shannon par ferme. 129
- Figure 19. Graphiques en spaghetti du nombre d'UTO par ferme. 129
- Figure 20. (A) Distribution de l'indice de Shannon au 7^{ème} jour en fonction de l'existence d'un traitement antibiotique. Les quartiles et les valeurs minimales et maximales sont indiqués par les boîtes à moustaches. Les échantillons sont indiqués par des points et colorés en fonction de la ferme. (B) Evolution de l'indice de Shannon au sein de chaque ferme et profil prédit par le modèle final. Pour chaque ferme, les valeurs moyennes des données observées +/- les écart-types sont indiqués respectivement par des points et des barres d'erreur en pointillés. Les profils prédits et leur intervalle de confiance à 95% sont représentés respectivement par des traits pleins et par des rubans. Les traitements antibiotiques reçus dans les premières semaines dans les fermes A et C sont indiqués en bas de la figure. 131
- Figure 21. Distribution de l'indice de Shannon et du nombre d'UTO dans chaque ferme pour des échantillons consécutifs réalisés avant et après un traitement antibiotique. Les valeurs de q correspondent aux valeurs de p corrigées des 12 tests de Wilcoxon par la méthode de Benjamini et Hochberg. Sur chaque abscisse, le premier et le deuxième jour indiqués correspondent respectivement au jour de prélèvement avant et après le traitement antibiotique, excepté pour les prélèvements aux 21^{ème} et 35^{ème} jours dans la ferme C (les veaux sont déjà sous traitement le 21^{ème} jour)..... 132
- Figure 22. (A) Distribution du nombre d'UTO au 7^{ème} jour en fonction de l'existence d'un traitement antibiotique. Les quartiles et les valeurs minimales et maximales sont indiqués par les boîtes à moustaches. Les échantillons sont indiqués par des points et colorés en fonction de la ferme. (B) Evolution du nombre d'UTO au sein de chaque ferme et profil prédit par le modèle final. Pour chaque ferme, les valeurs moyennes des données observées +/- les écart-types sont indiqués respectivement par des points et des barres d'erreur en pointillés. Les profils prédits et leur intervalle de confiance à 95% sont représentés respectivement par des traits pleins et par des rubans. Les traitements antibiotiques reçus dans les premières semaines dans les fermes A et C sont indiqués en bas de la figure. 133
- Figure 23. Abondances relatives moyennes +/- écart-types des quatre principaux phyla à chaque échantillonnage dans les fermes A, B et C. Les traitements antibiotiques en début d'engraissement sont indiqués par des barres au-dessus de l'abscisse dans les fermes A et C..... 138
- Figure 24. Page ci-après. Abondances relatives des 10 taxa les plus abondants à l'échelle des genres chez tous les veaux au (A) premier échantillonnage (7^{ème} jour), (B) deuxième échantillonnage (21^{ème} jour) et (C) dernier échantillonnage (161^{ème} jour dans les fermes A et B, 147^{ème} dans la ferme C)..... 141
- Figure 25. Différence d'abondances relatives entre le premier échantillonnage (7^{ème} jour) et le deuxième (21^{ème} jour) des 10 taxa les plus abondants à l'échelle du genre chez tous les veaux. Les veaux sont ordonnés au sein de chaque ferme selon les valeurs croissantes d'indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut du graphique. Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes. 143

- Figure 26. Spaghetti plots du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces exprimé en logarithme décimal, par ferme. 145
- Figure 27. (A) Distribution du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces au 7^{ème} jour en fonction de l'existence d'un traitement antibiotique, exprimé en logarithme décimal. Les quartiles et les valeurs minimales et maximales sont indiqués par les boîtes à moustaches. Les échantillons sont indiqués par des points et colorés en fonction de la ferme. (B) Evolution du nombre d'*E. coli* au sein de chaque ferme et profil prédit par le modèle final (les moyennes +/- écart-types des données observées sont indiqués respectivement par des points et des barres d'erreur en pointillés, les profils prédits et leur intervalle de confiance à 95% sont indiqués respectivement en trait plein et par des rubans). Les traitements antibiotiques reçus dans les premières semaines dans les fermes A et C sont indiqués en bas de la figure. 147
- Figure 28. (A) Abondance relative du genre *Escherichia* en fonction du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces. (B) Abondance relative du genre *Enterococcus* en fonction du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces. Chaque point représente un échantillon dans (A) et (B). Les points collés aux abscisses correspondent aux échantillons où (A) le genre *Escherichia* ou (B) *Enterococcus* n'a pas été détecté. (C) Evolution du genre *Enterococcus* dans chaque ferme (les médianes +/- min-max sont indiqués). 148
- Figure 29. (A) Profil prédit par le modèle final du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces (exprimé en logarithme décimal). (B) Doses théoriques de poudre de lait consommées par kilo de poids vif par les veaux des fermes B et C. 151
- Figure 30. Dynamique de portage des *E. coli* producteurs de BLSE dans les fèces des veaux au cours du temps. Pour chaque veau, ce profil est représenté par une ligne reliant des points marquant les jours d'échantillonnage. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons positifs, les points de petite taille et bas correspondent à des échantillons négatifs. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc et par ferme. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse pour chaque ferme. Les triangles et les rectangles vides représentent respectivement les traitements antibiotiques ayant couru sur un ou plusieurs jours. 171
- Figure 31. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers de 21 nucléotides qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de format « groupe phylogénétique_sequence types_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris au-dessus des feuilles. L'arbre a été raciné sur une souche appartenant au groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. « NA » dans la dénomination des clones signifie « gène absent ». 178
- Figure 32. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash et répartition des gènes *bla*_{CTX-M}. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers de 21 nucléotides qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de format « groupe phylogénétique_sequence types_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris au niveau des feuilles. L'arbre a été raciné sur une souche appartenant au groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. Le terme « NA » dans le nom des clones signifie « gène absent ». Les gènes détectés codant pour une CTX-M sont indiqués à l'extérieur de l'arbre en fonction de leur localisation dans le chromosome ou sur un plasmide. 180
- Figure 33. Nombre de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE résistants aux différentes familles d'antibiotiques. 181
- Figure 34. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash et répartition des génotypes de résistance. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de forme « groupe phylogénétique_ST_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris au niveau des feuilles. L'arbre a été raciné sur une souche appartenant au groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. Le terme « NA » dans le nom des clones signifie « gène absent ». Les génotypes de résistance sont indiqués à l'extérieur de l'arbre. Les mutations et les acquisitions de gènes sont indiquées respectivement par des triangles et des ronds. 183
- Figure 35. Gènes de résistance acquis des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE. 184
- Figure 36. Gènes de virulence des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE. Les gènes codant pour une adhésine sont indiqués dans le panel A, et les gènes impliqués dans la capture du fer sont indiqués dans le panel B. 186

- Figure 37. Gènes de virulence des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE. Les gènes codant pour une toxine sont indiqués dans le panel A, et ceux codant pour une protectine dans le panel B. 187
- Figure 38. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash et nombre de gènes de virulence en fonction du type de virulence. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers de 21 nucléotides qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de format « groupe phylogénétique_sequence types_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris. L'arbre a été raciné sur une souche du groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. Le terme « NA » dans le nom des clones signifie « gène absent ». Le nombre de gènes de virulence de chaque type sont indiqués à l'extérieur de l'arbre. Les clones porteurs de toxine de Shiga ont été encadrés en noirs. 189
- Figure 39. Détection des différents clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés chez les veaux de la ferme A au cours du temps. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons pour lesquels des *E. coli* producteurs de BLSE ont été isolés. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Les ronds vides correspondent à des souches dont le génome n'a pas été séquencé. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse. Les triangles et les rectangles vides représentent respectivement les traitements ayant couru sur un ou plusieurs jours. 193
- Figure 40. Détection des différents clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés chez les veaux de la ferme B au cours du temps. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons pour lesquels des *E. coli* producteurs de BLSE ont été isolés. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Le rond vide correspond à une souche dont le génome n'a pas été séquencé. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse par des triangles vides. 196
- Figure 41. Détection des différents clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés chez les veaux de la ferme C au cours du temps. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons pour lesquels des *E. coli* producteurs de BLSE ont été isolés. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Les ronds vides correspondent à des souches dont le génome n'a pas été séquencé. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse. Les triangles et les rectangles vides représentent respectivement les traitements ayant couru sur un ou plusieurs jours. 197
- Figure 42. Nombre de veaux colonisés par un clone d'*E. coli* producteur de BLSE en fonction de sa durée de détection dans une ferme. Chaque point correspond à un clone. La durée de détection est la durée entre le jour du premier et du dernier prélèvement dans lesquels le clone a été détecté. Pour les clones retrouvés dans plusieurs fermes, la durée de détection la plus longue au sein d'une ferme est donnée. Les clones détectés dans le même nombre de veaux et sur une durée égale ont été espacés afin d'éviter leur superposition. Les lignes verticales et horizontales ont été tracées arbitrairement et respectivement à 25 jours et trois veaux. 199
- Figure 43. (A) Les différents niveaux taxonomiques dans la classification du vivant. Les niveaux souvent utilisés pour étudier le microbiote fécal sont le phylum et le genre (encadrés). (B) Exemple de taxonomie avec l'espèce *E. coli*. (C) arbre phylogénétique représentant les phyla bactériens et quelques genres fréquemment retrouvés dans le microbiote fécal, adapté de (247). Les couleurs correspondent aux niveaux taxonomiques de (A)..... 237
- Figure 44. Justification de l'utilisation du gène de l'ARNr 16S comme marqueur taxonomique dans l'étude des communautés bactériennes. (A) Le gène de l'ARNr 16S est présent chez toutes les bactéries et archées car il code pour un produit très conservé au sein des bactéries et des archées. Illustration tirée de (248). (B) structure secondaire de l'ARNr 16S chez *E. coli* (à gauche) et *Methanococcus vannielii*, une archée (à droite), produit du gène ciblé par les études de communautés bactériennes. (C) Régions dites hypervariables de l'ARNr 16S, ciblées par le séquençage haut débit pour étudier les communautés bactériennes. 238
- Figure 45. Résidus en fonction du temps des différents modèles. Les résidus représentés dans (A) et (B) sont respectivement ceux des modèles de l'indice de Shannon et du nombre d'UTO. Les résidus représentés dans (C), (D), (E) et (F) sont respectivement ceux des modèles des abondances relatives des Firmicutes, des Bacteroidetes, des Actinobactéries et des Protéobactéries. (G) représente les résidus du modèle du nombre d'*E. coli*/g..... 239
- Figure 46. Abondances relatives des 10 taxa les plus abondants à l'échelle des genres chez tous les veaux au (A) troisième échantillonnage (35^{ème} jour pour la ferme C, 49^{ème} jour pour les fermes A et B), et (B)

quatrième échantillonnage (63^{ème} jour pour la ferme C, 77^{ème} jour pour les fermes A et B). Les veaux sont ordonnés selon les valeurs croissantes d'indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut de chaque graphique. Les points sous les graphiques indiquent l'indice de Shannon (points du haut) et le nombre d'UTO (points du bas). Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes 240

Figure 47. Abondances relatives des 10 taxa les plus abondants à l'échelle des genres chez tous les veaux au (A) cinquième échantillonnage (91^{ème} jour pour la ferme C, 106^{ème} jour pour les fermes A et B), et (B) sixième échantillonnage (119^{ème} jour pour la ferme C, 133^{ème} jour pour les fermes A et B). Les autres taxa détectés sont représentés par des barres blanches. Les veaux sont ordonnés selon les valeurs croissantes d'indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut de chaque graphique. Les points sous les graphiques indiquent l'indice de Shannon (points du haut) et le nombre d'UTO (points du bas). Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes 241

Liste des tableaux

Table 1. Décomposition des paramètres des modèles candidats pour l'indice de Shannon.....	112
Table 2. Distribution des distances Unifrac pondérées entre les veaux au sein des trois fermes au 7 ^{ème} , 21 ^{ème} et dernier jour d'engraissement. « n » correspond au nombre de distances entre veaux pour chaque ferme à chaque temps, et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.....	120
Table 3. Distribution des distances Unifrac non pondérées entre les veaux au sein des trois fermes au 7 ^{ème} , 21 ^{ème} et dernier jour d'engraissement. « n » correspond au nombre de distances entre veaux pour chaque ferme à chaque temps et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.	122
Table 4. Distribution des distances Unifrac pondérées entre les échantillons consécutifs des veaux au sein des trois fermes. « n » correspond au nombre de distances utilisées pour calculer la distribution et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.	127
Table 5. Distribution des distances Unifrac non pondérées entre les échantillons consécutifs des veaux au sein des trois fermes. « n » correspond au nombre de distances utilisées pour calculer la distribution et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.	127
Table 6. Paramètres estimés par le modèle final pour l'indice de Shannon. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, ω la variabilité inter-individuelle des effets aléatoires, et σ la variabilité résiduelle. La ferme de référence utilisée pour chaque paramètre est indiquée entre parenthèses.....	134
Table 7. Paramètres estimés par le modèle final pour le nombre d'UTO. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, ω la variabilité inter-individuelle des effets aléatoires, et σ la variabilité résiduelle. La ferme de référence utilisée pour chaque paramètre est indiquée entre parenthèses.....	135
Table 8. Paramètres estimés par ferme pour les quatre principaux phyla. La ferme A a été choisie comme catégorie de référence. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, et σ la variabilité résiduelle. « NE » signifie « Non Estimé ».	139
Table 9. Paramètres estimés du nombre d' <i>E. coli</i> par gramme de fèces. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, ω la variabilité inter-individuelle des effets aléatoires, et σ la variabilité résiduelle. La ferme de référence utilisée pour chaque paramètre est indiquée entre parenthèses.....	146
Table 10. ST selon le schéma Warwick détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les ST sont rangés par ordre décroissant.	172
Table 11. ST selon le schéma de l'Institut Pasteur détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les ST sont rangés par ordre décroissant.	173
Table 12. Sérotypes détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les sérotypes sont rangés par ordre décroissant.	174
Table 13. Allèles du gène <i>fimH</i> détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les allèles sont rangés par ordre décroissant.	175
Table 14. Regroupement des isolats en fonction des différents marqueurs moléculaires utilisés, le groupe phylogénétique, les deux ST, le sérotype et l'allèle du gène <i>fimH</i> , et en fonction de leur combinaison.	176
Table 15. Distribution du nombre de gènes de virulence dans les clones en fonction du type de virulence.	188

Liste des équations

Équation 1. Modèle mathématique structural d'un modèle linéaire simple	67
Équation 2. Modèle candidat à une pente pour l'indice de Shannon et le nombre d'UTO	111
Équation 3. Modèle candidat à deux pentes pour l'indice de Shannon et le nombre d'UTO	112
Équation 4. Modèle candidat à une pente pour les abondances relatives des phyla	113
Équation 5. Modèles polynomiaux candidats pour le nombre d' <i>E. coli</i> /g	115

Introduction : problématique et objectif général de la thèse

Les populations intestinales d'*Escherichia coli* chez les bovins domestiques constituent un réservoir de souches pathogènes et de souches résistantes aux antibiotiques. Ces souches d'intérêt représentent une menace importante en termes de pathogénicité et d'échec thérapeutique pour l'homme.

La grande variété des systèmes d'élevage combinée à l'immense diversité et plasticité génomique de l'espèce *E. coli* multiplie les situations favorables à l'émergence, au portage, et à la diffusion jusqu'à l'homme de ces souches pathogènes ou résistantes. La présence et la persistance de ces souches à l'état commensal dans le tube digestif des bovins résultent de nombreuses interactions de natures variées avec le microbiote intestinal de l'hôte, qui est l'ensemble des micro-organismes vivant dans son tube digestif. L'avènement des techniques de séquençage de la nouvelle génération a permis d'étudier en détails ces communautés bactériennes complexes dans lesquelles les populations commensales d'*E. coli* doivent sans cesse s'adapter pour persister.

Comme dans tout système biologique, ces relations écologiques aboutissent à des fluctuations temporelles des populations bactériennes, rendant difficile l'interprétation des observations lors de l'introduction d'une perturbation. Le recours aux études transversales n'est pas suffisant pour caractériser le portage de ces souches d'intérêt au sein de l'écosystème digestif des bovins, car elles ne renseignent pas sur la dynamique au cours du temps de ce portage, ni sa variabilité dans un troupeau, ou, plus largement, dans une population. De plus, elles n'informent pas sur l'enchaînement temporel des événements conduisant à un état, et ne permettent donc pas de distinguer une causalité lors de la détection d'une association.

Du fait de sa complexité épidémiologique, il est difficile de définir avec précision le risque sanitaire que représente *E. coli* au sein du réservoir bovin. La conséquence directe est l'absence de stratégies de prévention et de contrôle simples et généralisables à l'ensemble des systèmes de production. L'hétérogénéité constatée dans les cheptels, qui complique la démarche des scientifiques et des pouvoirs publics, est due à notre méconnaissance des facteurs environnementaux biotiques et génétiques, dont la conjonction structure l'écologie de ces souches dans leur habitat primaire.

L'objectif global de ce travail de thèse est d'étudier les contextes écologique et génomique des souches d'*E. coli* à potentiel pathogène ou résistantes aux antibiotiques dans leurs milieux naturels.

Dans une première partie, nous présentons d'abord les connaissances actuelles concernant le microbiote intestinal et les populations commensales d'*E. coli* des bovins domestiques, puis l'impact des antibiotiques sur ces communautés bactériennes, et enfin, les méthodes d'analyses disponibles pour modéliser leur dynamique au cours du temps. Dans une deuxième partie, nous présentons les études menées dans le cadre de cette thèse : d'une part, les travaux ayant porté sur la dynamique à court terme de souches résistantes aux antibiotiques et productrices de toxines de Shiga chez des bovins adultes en système semi-pastoral, et d'autre part, les travaux conduits sur le portage à long terme de souches résistantes aux antibiotiques chez des veaux de boucherie en élevage intensif. Enfin, dans une dernière partie, nous mettons en perspective les différents résultats présentés dans cette thèse afin de discuter des implications en termes d'écologie microbienne et de santé publique et de proposer des pistes d'exploration pour des travaux ultérieurs.

Étude bibliographique

I. Les communautés bactériennes fécales du bovin domestique

1. Transformations du microbiote fécal au cours de la vie d'un bovin

Dans cette partie, des études menées chez d'autres espèces sont également présentées afin de mieux comprendre les relations entre les communautés microbiennes et leurs hôtes.

a. Le fœtus et le veau nouveau-né

Les premiers articles dont le sujet d'étude porte sur la colonisation bactérienne initiale du tube digestif de nouveau-nés datent de la seconde moitié du XIX^{ème} siècle et concernent l'homme. A la fin des années 1880, Theodor Escherich observe que le méconium des bébés est stérile et que les premières bactéries qui colonisent leurs intestins proviennent du lait ingéré et de leur environnement (1, 2). Malgré la parution de plusieurs articles dans les années 1920 et 1930 attestant de la présence occasionnelle de bactéries dans le méconium¹ (3, 4), il était communément accepté que le tube digestif d'un nouveau-né, quelle que soit l'espèce, fût exempt de bactéries à la naissance, et que la colonisation initiale se faisait au contact de la flore vaginale et fécale de la mère au moment de la délivrance. Grâce à de nombreuses techniques autres que la culture bactérienne, comme la PCR, l'hybridation *in situ* en fluorescence et le séquençage d'ADN à haut débit, les observations de bactéries dans les annexes fœtales de femmes en bonne santé et dans le méconium de nouveau-nés se sont multipliées à la fin du XX^{ème} siècle (5, 6).

L'antériorité de la colonisation bactérienne à la naissance a également été observée chez les bovins. Des bactéries ont été détectées dans les caroncules placentaires² de vaches gravides sans troubles gestationnels (7), le méconium, et le rectum de veaux écouvillonnés 10 minutes après leur naissance (8, 9). D'après Alipour et ses collègues (8), l'intestin du fœtus en fin de gestation contient déjà une petite quantité de bactéries diverses, appartenant principalement aux phyla Firmicutes et Protéobactéries, et dans une moindre mesure des Actinobactéries et des Bacteroidetes. Un rappel des différents niveaux taxonomiques dans la

¹ Le méconium est la matière accumulée dans les intestins du fœtus et forme les premières selles du nouveau-né.

² Les caroncules placentaires sont les tissus maternels dans les zones d'échange entre la vache et son fœtus.

classification du vivant et un arbre phylogénétique représentant les différents phyla bactériens et certains genres retrouvés dans la flore fécale sont présentés dans l'annexe 1. Ces bactéries auraient pour origine la flore buccale ou la partie haute du tube digestif de la mère et auraient pu se transmettre *in utero* au fœtus (8). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que le microbiote fécal du nouveau-né est plus proche du microbiote buccal de la mère, que du microbiote vaginal, et ce malgré l'absence de contact physique entre le veau et sa mère avant le prélèvement. De plus, des travaux chez la souris ont montré qu'il existait une transmission *in utero* de bactéries commensales. Après inoculation par voie orale de souches d'*Enterococcus faecium* à des souris gravides, ces souches étaient isolées dans le méconium des fœtus nés par césarienne avant terme (10).

A la naissance, le tube digestif du veau est déjà colonisé par des bactéries aérobies (appartenant aux genres *Acinetobacter* et *Sphingomonas*) et anaérobies (appartenant aux genres *Ruminococcaceae*, *Clostridium* et *Romboutsia*) (8, 11). Toutes ces bactéries ne sont pas spécifiques du veau et ont également été retrouvées dans le méconium humain (5). Dans les 24 heures qui suivent la naissance du veau, on observe une augmentation importante des quantités d'*E. coli*, *Clostridium perfringens* et de *Streptococcus spp.*, qui sont multipliées plus de 1000 fois (12). Ceci se traduit par une augmentation du nombre de bactéries totales contenues dans le tube digestif, associée à un appauvrissement de la diversité microbienne et une dominance du microbiote par *E. coli* (8, 13). Le lait ne semble pas être un vecteur majeur de bactéries, puisqu'il a été observé que des veaux buvant du lait pasteurisé avaient une diversité microbienne similaire voire supérieure à des veaux buvant du lait cru (14).

b. Le veau avant sevrage

A partir du deuxième jour, des bactéries des genres *Bacteroides* et *Lactobacillus* émergent chez les veaux. Ces genres deviennent majoritaires dès la première semaine de vie, tandis que les populations fécales d'*E. coli*, de *C. perfringens*, et de streptocoques présentes le premier jour diminuent graduellement au cours du temps (13, 15, 16). Cette tendance n'est pas spécifique des bovins et s'observe également chez les bébés, les agneaux, les porcelets et les lapereaux (12, 16).

La plupart des études sur le microbiote fécal des veaux fait état de plusieurs centaines de genres détectés (en général entre 100 et 400 genres) répartis sur une dizaine de phyla (17).

Les bactéries du phylum Firmicutes représentent quantitativement plus de la moitié des bactéries du microbiote fécal du veau avant le sevrage (17–19). Le deuxième phylum majoritaire est celui des Bacteroidetes. Ces deux phyla représentent en abondance relative plus de 90% des bactéries (17). Si les Firmicutes représentent le plus souvent le phylum dominant, certaines études font état d'une dominance du microbiote du veau par les Bacteroidetes (13). On détecte également des Protéobactéries, des Fusobactéries et des Actinobactéries (18). L'ordre des phyla sous dominants peut varier d'un veau à l'autre (20). Parmi les Firmicutes, les genres les plus abondants sont *Lactobacillus*, *Sharpea*, *Faecalibacterium*, *Blautia* et *Clostridium* (14, 17, 21, 22). Parmi les Bacteroidetes, les genres les plus abondants sont *Bacteroides*, *Prevotella* et *Parabacteroides* (14, 21, 22).

La quantité de bactéries par gramme de fèces continue d'augmenter avec l'âge, passant en moyenne de 10^8 bactéries par gramme (bactéries/g) de fèces au bout d'une semaine à 10^{10} bactéries/g à sept semaines d'âge (22). Cette augmentation de la quantité absolue de bactéries avec l'âge chez le veau non sevré s'accompagne d'une augmentation de la diversité du microbiote fécal (13, 14, 18, 21)

c. Le veau après sevrage et le bovin adulte

Le sevrage chez le bovin est la transition entre une alimentation uniquement lactée à une alimentation composée uniquement de fibres végétales, et a lieu en général aux alentours de six à dix semaines d'âge. Le veau développe alors un appareil digestif polygastrique, avec notamment le développement du rumen, pré-estomac dans lequel a lieu la fermentation microbienne des fibres végétales (Figure 1). La diversité du microbiote fécal des veaux augmente de manière importante après le sevrage (13, 17). L'abondance relative des Firmicutes diminue au profit des Bacteroidetes, qui augmentent pour atteindre des proportions similaires voire légèrement supérieures à celles des Firmicutes après le sevrage. Ces deux phyla continuent de représenter en abondance relative plus de 90% des bactéries. Loin derrière, les Protéobactéries seraient le troisième phylum le plus abondant (aux alentours de 5%). Le sevrage profiterait également aux Spirochaetes, dont l'abondance serait multipliée par trois après le sevrage (17). Néanmoins, le schéma de sevrage, qu'il soit progressif (quelques semaines) ou brutal (quelques jours), n'a pas d'effet visible sur la diversité, ni sur la composition du microbiote des veaux (17). Ceci suggère l'existence d'une certaine résilience des communautés bactériennes aux variations alimentaires du veau.

D'après Meale et ses collègues, le sevrage exerce une pression différentielle au sein de chaque phylum : chez les Firmicutes, le genre dominant change au moment du sevrage ; *Blautia* décline et *Ruminococcus* devient dominant, atteignant des proportions similaires aux proportions avant sevrage de *Blautia* (10% environ). Les changements au sein des Bacteroidetes traduisent un enrichissement en types de nutriments disponibles, avec l'émergence de *Prevotella*, taxon capable de dégrader les fibres végétales (23) et un appauvrissement en *Bacteroides*, qui reste le genre dominant après sevrage, malgré une diminution significative de son abondance relative. Parmi les Protéobactéries, le genre *Succinivibrio* devient dominant (environ 2%) (17). Les populations d'*E. coli* ne sont pas impactées quantitativement par le sevrage et restent stables aux alentours de 1% (17). Le microbiote s'enrichit en plusieurs genres associés à un régime riche en fibres au moment du sevrage. Une augmentation des genres *Paraprevotella*, *Oscillibacter*, *Alistipes* a été rapportée (13). Beaucoup de genres présents chez l'adulte sont détectés bien avant le sevrage. L'introduction d'une petite quantité de nourriture solide durant la période d'alimentation lactée pourrait « préparer » les communautés bactériennes à de nouvelles sources de carbone et atténuer l'importance des changements survenant au cours du sevrage.

On retrouve les mêmes phyla dominants dans le microbiote fécal des bovins âgés de six à huit mois et des bovins adultes, avec par ordre décroissant d'abondance les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Protéobactéries et les Actinobactéries (24, 25). Les genres les plus souvent retrouvés chez le bovin adulte sont *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Blautia* et *Roseburia* parmi les Firmicutes, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Paraprevotella*, *Porphyromonas*, et *Alistipes*, parmi les Bacteroidetes, et *Succinivibrio*, *Pseudomonas* et *Campylobacter* parmi les Protéobactéries (25–27). On retrouve plus fréquemment les genres *Clostridium*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Alistipes*, et *Prevotella* dominant le microbiote (27). Les quantités d'*E. coli* chez le bovin adulte sont plus faibles que chez le veau, et sont de l'ordre de 10^4 à 10^6 bactéries/g (27, 28).

Le veau est exposé aux bactéries bien avant la naissance. Une fois né, il se retrouve en contact avec les bactéries contenues dans l'environnement, la salive, le vagin, et les fèces de sa mère. Il en résulte une augmentation de la densité bactérienne et de la diversité dès la première semaine de vie. Malgré des variations inter-individuelles et des fluctuations dans le

temps, le microbiote des bovins se compose principalement de bactéries appartenant aux phyla Firmicutes et Bacteroidetes. La plupart des genres détectés chez le bovin adulte sont déjà présent chez le veau dans les premières semaines de vie. La complexification du microbiote est le fait de l'augmentation de l'abondance de certains genres bactériens déjà présents dans le tube digestif du veau. Au moment du sevrage, la diminution de la consommation de lait concomitante avec l'augmentation de fibres végétales favorise notamment la prolifération de bactéries cellulolytiques telles que *Prevotella* et *Ruminococcus*. Les *E. coli* font partie des premières bactéries à coloniser le tube digestif à la naissance, et sont dominantes durant les premiers jours de vie du veau. Le nombre d'*E. coli* diminuent à mesure que le veau avance en âge, et est plus faible chez l'adulte.

Le tube digestif est colonisé sur toute sa longueur par des bactéries. Dans la mesure où les fèces résultent du transit du bol alimentaire tout au long du tube digestif, l'origine des bactéries qui composent le microbiote fécal peut donc varier. Ainsi, il est nécessaire de comprendre si le microbiote fécal du veau est représentatif d'une seule portion du tube digestif, ou s'il est un mélange de différents taxa retrouvés tout au long du tube digestif.

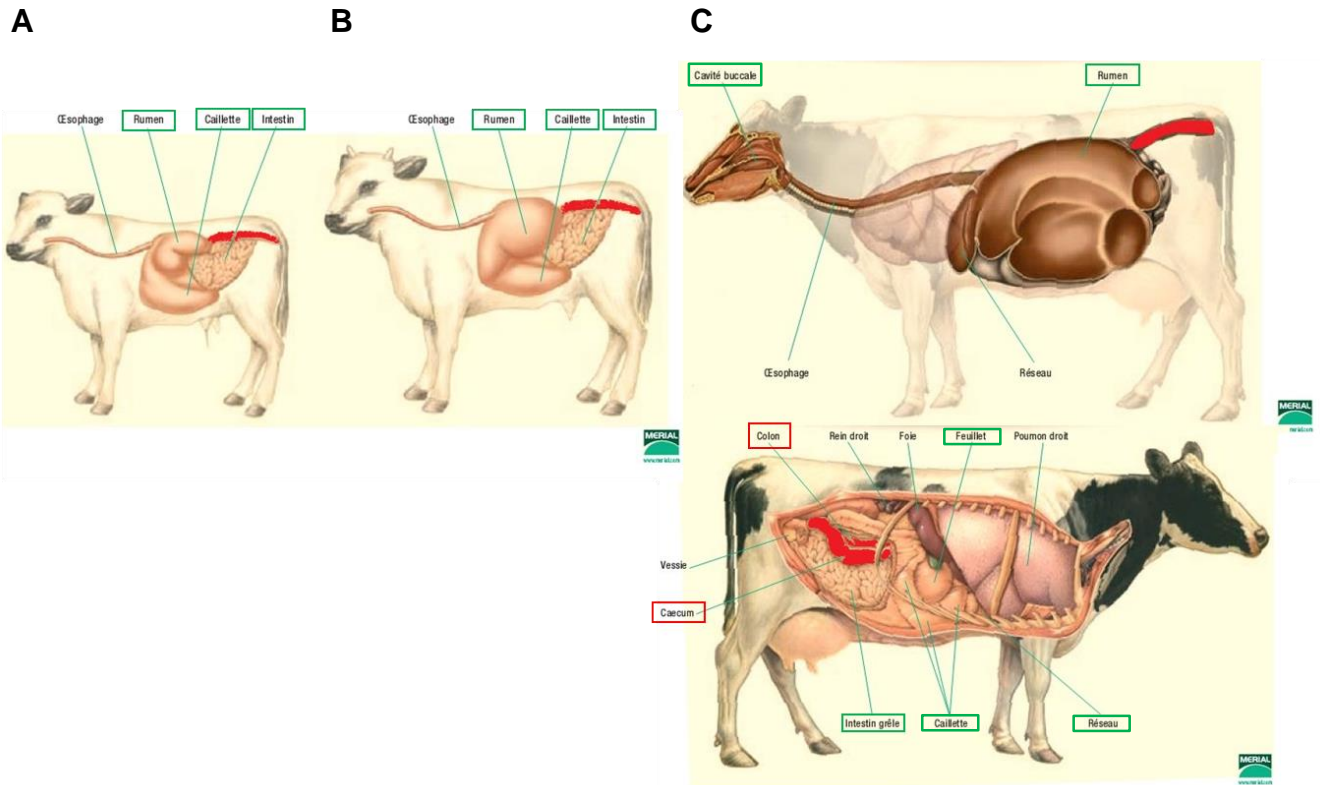
2. Les forces qui structurent le microbiote fécal

a. Les différentes communautés bactériennes au sein du tube digestif

(i) *Variations le long du tube digestif*

La Figure 1 présente l'anatomie digestive des bovins. Malmuthuge et ses collègues ont réalisé une étude comparative des communautés microbiennes le long du tube digestif de veaux mâles de race Holstein âgés de trois semaines, soit avant le sevrage (29). Ils ont remarqué des différences marquées entre les communautés microbiennes du rumen, de l'intestin grêle (jéjunum et iléon), et du gros intestin (caecum et colon). Les communautés du rumen et du gros intestin se distinguent de celles de l'intestin grêle par une plus grande diversité microbienne et une prédominance du phylum Bacteroidetes, tandis que le phylum Firmicutes domine au niveau de l'intestin grêle (29, 30). Ces caractéristiques communes au rumen et au gros intestin sont probablement en lien avec le fait que ces deux régions constituent des sites majeurs de fermentation microbienne, dans lesquels les temps de rétention du bol alimentaire sont plus longs, ce qui permet le développement de communautés plus complexes que dans l'intestin grêle. Seuls 39% des genres détectés dans la totalité des échantillons ont été retrouvés dans au moins deux régions et 12% étaient présents dans les trois régions, ce qui illustre les grandes différences qu'il existe entre les sites du tube digestif, et l'inféodation des communautés bactériennes aux conditions physico-chimiques et aux ressources nutritives de chaque site. Aucune différence de densité bactérienne chez le veau n'a été mise en évidence entre les trois régions du tube digestif (31).

Figure 1. Anatomie digestive du veau (A) avant sevrage, (B) en période de transition alimentaire et (C) de la vache adulte (source : laboratoire Mérial). Les régions du tube digestif pour lesquelles des communautés microbiennes ont été décrites dans la littérature sont encadrées en vert. Le côlon et le caecum constituent l'habitat primaire d'*E. coli* et sont colorés en rouge sur les dessins. La caillette est le lieu de digestion du lait par l'organisme du veau.



Dans la mesure où l'intestin grêle et le gros intestin représentent la portion distale du tube digestif, on peut s'interroger sur la contribution respective de leurs communautés microbiennes dans la composition du microbiote fécal. Chez des veaux de trois semaines, la distribution des genres bactériens varie entre ces deux régions. Les genres partagés représentent respectivement 46% et 55% des genres détectés dans l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle est majoritairement colonisé par des bactéries capables de fermenter le lactose, telles que *Lactobacillus* et *Sharpea*. Les genres dominants retrouvés dans le gros intestin sont *Bacteroides* et *Prevotella* (22, 29). Certains genres, comme *Blautia*, *Flavobacterium* et *Succinivibrio*, n'ont été détectés que dans le gros intestin (29). *E. coli* est établi sur toute la longueur du tube digestif, avec un maximum au niveau du gros intestin (32). D'autre part, les abondances relatives de *Blautia*, *Faecalibacterium* et *Lactobacillus* dans le gros intestin augmentent proportionnellement à l'âge des veaux non sevrés (étude menée sur des veaux âgés de 7, 28, 49 et 63 jours) (30). La tendance inverse s'observe pour les *Prevotella* et *Paraprevotella*. Les fluctuations des taxa bactériens au sein du gros intestin sont similaires

à celles que l'on observe dans le microbiote fécal, et certains genres bactériens du microbiote fécal ne se trouvent qu'au niveau du gros intestin. Cela montre que le microbiote fécal est principalement représentatif du microbiote présent dans le gros intestin des veaux.

Les différences de communautés microbiennes entre les régions du tube digestif persistent au cours du développement, et se retrouvent chez des veaux mâles Holstein âgés de 6 mois (31). Elles existent également chez le bovin adulte (33). Cette ségrégation le long du tube digestif se retrouve chez d'autres espèces (31, 34, 35), et illustre l'effet des conditions environnementales locales (morphologie, pH, sécrétions, temps de rétention, nutriments...) sur la structure des communautés microbiennes au sein d'un même hôte. Ainsi, les communautés microbiennes d'un individu dépendent de la région anatomique d'origine. Cela souligne l'importance de réaliser un échantillonnage adapté et localisé à la portion du tube digestif d'intérêt quand on recherche une association entre un biomarqueur et une altération du microbiote. L'échantillonnage de fèces ne peut être représentatif que du microbiote du côlon, voire uniquement du côlon distal et du rectum, et donc n'être étudié que pour des maladies ou agents pathogènes en lien avec ces sites. Toutefois, la prédominance des Firmicutes régulièrement rapportée dans les études sur le microbiote fécal pourrait résulter d'un apport en bactéries provenant à la fois de l'intestin grêle distal et du gros intestin.

Au sein même du colon, des différences de conditions physico-chimiques et d'interactions avec l'hôte existent entre les bactéries présentes dans la couche de mucus et celles dans la lumière du tube. Parmi ces différences, on peut citer le gradient d'oxygène décroissant de l'épithélium vers la lumière, une différence d'abondance de substrats en provenance de l'alimentation ou de l'hôte, telle que la mucine produite par les cellules caliciformes de l'épithélium (36). Des différences entre les communautés bactériennes associées aux muqueuses du gros intestin et celles présentes dans les résidus de digestion ont été mises en évidence chez le veau (31). Dès lors, on peut s'interroger sur la part de chacune de ces communautés dans la composition du microbiote fécal.

(ii) *Les communautés associées au mucus et dans la lumière du gros intestin*

Au niveau du gros intestin du veau, le phylum des Bacteroidetes prédomine aussi bien dans les communautés microbiennes présentes dans le lumen que dans celles associées aux muqueuses (29). Aucune différence de diversité n'a été mise en évidence entre les

communautés microbiennes associées au mucus et celles du lumen (31). Les genres bactériens *Bacteroides* et *Prevotella* ont été trouvés dominants aussi bien dans les communautés associées aux muqueuses que celles du lumen. Les genres bactériens uniquement retrouvés dominants dans les communautés associées aux muqueuses étaient *Faecalibacterium* et *Burkholderia*, tandis que *Lactobacillus*, *Clostridium* et *Sharpea* ont été trouvés dominants uniquement dans celles du lumen (31). La densité bactérienne était significativement différente entre les deux communautés chez les veaux âgés de six mois, alors qu'elle ne l'est pas chez ceux âgés de trois semaines (31).

Il semble que les différences entre les communautés bactériennes associées aux muqueuses ou aux résidus de digestion dans le gros intestin soient minimales d'un point de vue taxonomique, dans la mesure où elles contiennent les mêmes organismes et ne diffèrent que par leurs abondances relatives. Les différences d'abondances peuvent s'expliquer par des interactions de natures différentes avec l'hôte, les bactéries associées aux muqueuses telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Faecalibacterium prausnitzii* étant impliquées dans l'homéostasie de l'épithélium colique et la production de mucus (37). De plus, les bactéries associées aux muqueuses étant éliminées dans la lumière intestinale avec le mucus dégradé, il est difficile de considérer ces deux communautés comme des populations distinctes.

b. L'hôte et son environnement

Plusieurs études montrent un effet du régime alimentaire sur le microbiote fécal des bovins, les compositions étant plus proches chez des bovins partageant le même régime alimentaire (26). Une étude chez des bovins allaitants³ a montré une corrélation forte, respectivement négative et positive, entre les concentrations fécales d'amidon et les abondances relatives des Firmicutes et des Bacteroidetes (26), en favorisant notamment des bactéries du genre *Prevotella*.

D'autres facteurs de l'environnement semblent influencer sur la composition du microbiote, notamment des facteurs en lien avec le système d'élevage. Des conditions hygiéniques plus développées, comme retrouvées dans les systèmes d'élevage en intérieur, peuvent également influencer la composition du microbiote d'un animal. Chez le porcelet élevé dans un incubateur stérile, le microbiote intestinal se développe différemment du porcelet élevé en

³ Bovins élevés pour la production de viande, par opposition aux vaches laitières, élevées pour produire du lait.

extérieur, malgré un microbiote comparable à la naissance (38). Sous des conditions d'hygiène aussi excessives, le microbiote s'appauvrit en Firmicutes et s'enrichit en Bacteroidetes et Protéobactéries (38). Ainsi, les pratiques propres à chaque élevage, concernant notamment la propreté, peuvent moduler la composition du microbiote des animaux. A mesure que les veaux avancent en âge, il apparaît que les différences de pratiques entre les fermes influent sur la composition de leur microbiote fécal, et des variations peuvent s'observer entre veaux du même âge appartenant à des fermes différentes (14, 20). La castration modifie probablement le microbiote des bœufs par rapport aux taureaux entiers, cet acte ayant entraîné sur le microbiote de souris une augmentation du ratio Firmicutes : Bacteroidetes et de l'abondance du genre *Lactobacillus* après diminution de la concentration de testostérone dans l'organisme (39). En revanche, les caractéristiques spécifiques d'un site géographique, telle que l'humidité, l'altitude, les sources d'eaux ne semblent pas jouer de rôle majeur sur le microbiote fécal des bovins (26).

Une hétérogénéité inter-individuelle de communautés bactériennes a été observée entre des bovins de même âge, sexe, et race, et soumis exactement aux mêmes conditions environnementales telles que le régime alimentaire ou les conditions météorologiques (24). De plus, une volatilité du microbiote, c'est-à-dire le degré de changement du microbiote d'un même individu entre deux temps, s'observe au cours du temps. En l'absence de perturbations, l'ensemble du microbiote d'un individu est globalement stable, c'est-à-dire qu'il fluctue autour d'un état d'équilibre. Certains taxa se retrouvent dans tous les prélèvements. Ils sont regroupés sous le terme de « microbiote cœur » (« core microbiota »). Ce microbiote cœur constitue, en nombre de taxa, une proportion assez faible (40). Le reste du microbiote contient des taxa qui ne sont détectés que de manière transitoire, sur une courte période voire dans un seul prélèvement.

c. Relations écologiques au sein du microbiote fécal

Peu de choses sont connues sur le réseau des relations écologiques au sein du microbiote intestinal d'un individu. Cela tient à plusieurs facteurs, comme la large taille de population, sa grande diversité, et la difficulté de cultiver *in vitro* ces bactéries anaérobies. L'idéal serait de retirer une seule espèce ou genre pour observer les changements que cela induit et en déduire ainsi les interactions avec le reste de la communauté. Dans un environnement confiné où l'accès aux nutriments est limité par la présence de compétiteurs et la survie des bactéries

dépend de leurs capacités à surpasser l'élimination péristaltique, ces relations entre bactéries semblent importantes pour la stabilité du microbiote. Le recours à la modélisation permet d'explorer les mécanismes d'interaction au sein d'une communauté aussi complexe. La plupart des travaux sur le sujet se base sur le système d'équations de Lotka-Volterra, et décrit des réseaux d'interactions positives (par exemple, de mutualisme) et négatives (par exemple, de compétition) en termes de valeur sélective (41). On suppose souvent que le bon fonctionnement d'une communauté microbienne repose sur l'établissement pérenne d'« espèces clés » engagées dans un réseau métabolique coopératif. Cet état constitue un compromis favorable pour l'hôte et les bactéries commensales dont les effets bénéfiques se maintiennent au cours du temps. Bien qu'intuitif, cet argument néglige les effets négatifs possibles que des relations de coopération étroites peuvent avoir sur la stabilité écologique de ces communautés. Par exemple, si une espèce diminue en abondance à la suite d'une perturbation, elle aura tendance à entraîner avec elle les autres populations dans son effondrement, dans une réaction en chaîne qui déstabilisera tout le système. Ainsi, par la dépendance qui se construit entre des espèces qui s'entraident pour survivre, se répliquer, et renforcer leur colonisation, la coopération n'est pas forcément synonyme de stabilité. Coyte et ses collègues suggèrent que ce sont les relations de compétition qui assurent la stabilité du microbiote intestinal (42). En enrichissant le microbiote de bactéries compétitrices, on diminue par conséquent le nombre de bactéries impliquées dans un réseau coopératif, limitant ainsi la part de populations bactériennes qui s'effondreraient en cas de perturbations. Un suivi de la dynamique des populations bactériennes durant la colonisation du tube digestif de souris a montré que sur les 136 interactions possibles entre les 16 taxa les plus abondants et le reste du microbiote, 67% étaient des relations de compétition, et aucune d'entre elles n'impliquait une coopération (43). Dans une autre étude sur la souris, la proportion de relations bénéfiques entre espèces dans le microbiote était estimée à 10% (42). Le reste des interactions étaient de nature parasitique (16%), amensalistiques⁴ (12,5%), commensales (3%) et neutres (1,5%). Le type d'interaction variait également en fonction du phylum des bactéries. Les interactions au sein des Firmicutes étaient exclusivement des relations de compétition, alors que les relations étaient de nature plus variée chez les Bacteroidetes (compétition, parasitique, amensalistique, commensal et neutre) (43). Les données de cette étude indiquent

⁴ La relation est neutre pour l'une des espèces et négative pour l'autre.

que les populations bactériennes au sein du microbiote sont engagées dans un réseau de relations concurrentielles qui s'empêchent mutuellement de dominer l'ensemble de la communauté. Toutefois, ces études se concentrent sur les interactions de premier ordre entre les bactéries du microbiote, et ne disent rien des interactions impliquant plus de deux taxa.

Il est important pour l'hôte de maintenir des populations qui coopèrent afin de promouvoir une production métabolique nécessaire et optimale, tout en limitant le coût que cette coopération pourrait avoir sur la stabilité écologique. Coyte et ses collègues proposent trois mécanismes permettant à l'hôte de maintenir un nombre limité mais suffisant de relations mutualistes (42). Premièrement, face à l'augmentation rapide de l'abondance d'un ou de quelques taxa, une réponse immunitaire ciblée de l'hôte agirait comme une force stabilisatrice, évitant un emballement de l'ensemble du système. Deuxièmement, la ségrégation spatiale des bactéries au sein du tube digestif préviendrait la mise en place de réactions en chaîne massives dans le cas de l'effondrement de certaines populations. Troisièmement, l'hôte pourrait fournir une partie des nutriments. En augmentant les alternatives nutritives, les bactéries ne dépendraient plus de relations de coopération étroites pour survivre. Toutefois, rien ne nous permet de conclure sur l'existence d'un tel lien de causalité entre les caractéristiques de l'hôte et la structure des communautés microbiennes. L'ensemble des arguments présentés ne pourrait être que la conséquence de l'adaptation mutuelle de l'hôte et de son microbiote.

Ainsi, les études de modélisation des réseaux écologiques suggèrent que le microbiote se constitue de beaucoup d'espèces capables de coexister dans un système stable dominé par les relations de compétition et structuré par leur hôte. Ceci pourrait expliquer la grande variabilité que l'on observe dans la composition du microbiote fécal entre deux individus de la même espèce et partageant le même environnement.

3. Les populations commensales d'*E. coli*

a. Génétique de l'espèce *E. coli*

On estime le nombre total de cellules bactériennes constituant l'espèce *E. coli* à un temps donné à 10^{20} cellules, réparties sur tous les continents, qu'elles soient présentes dans le tube digestif d'un être vivant ou dans l'environnement (44). La diversité génétique entre les cellules est le fruit de mutations ponctuelles sur le chromosome. Des polymorphismes nucléotidiques sur une paire de bases (« Single Nucleotide Polymorphism » ou SNP) apparaissent au cours du temps le long du génome, conduisant peu à peu à l'éloignement génétique des cellules issues d'un même ancêtre. Ce mode de reproduction s'accompagne de recombinaisons homologues par transfert horizontal. Le transfert horizontal désigne l'échange de matériel génétique d'une cellule à une autre qui n'est pas de sa descendance. La prépondérance des mutations ponctuelles sur les phénomènes de recombinaison fait d'*E. coli* une espèce clonale (44, 45). Dans ce contexte, un clone se définit comme une cellule bactérienne à l'origine d'une population génétiquement identique ou très proche. Une souche est l'un des variants génétiques d'un clone. On définit un isolat bactérien comme une colonie bactérienne ayant poussé en milieu de culture dans un laboratoire à partir d'un prélèvement.

Le génome des bactéries peut également se modifier par acquisition de nouveaux gènes ou délétion de gènes présents. Le taux de transfert horizontal de gènes entre bactéries de l'espèce *E. coli* est élevé. Le nombre de gènes acquis ou perdus au cours d'un événement d'insertion ou de délétion varie. Il semblerait que lors d'acquisitions, les fragments d'ADN soient plus longs (porteurs de 4,3 gènes en moyenne contre 3 gènes lors de délétion) mais que les événements de délétion soient plus fréquents (46). Ce flux de gènes est borné à des régions très spécifiques du génome, appelées points chauds d'intégration et de recombinaison. Ainsi, l'organisation du génome, dont dépendent les fonctions essentielles à la vie d'une cellule bactérienne, n'est pas perturbée par ces modifications fréquentes. La position de ces points chauds le long du génome est systématiquement la même pour toutes les souches (46). Les deux points chauds principaux sont localisés d'une part au niveau de l'opéron *rfb*, impliqué dans la synthèse de l'antigène somatique O, et d'autre part au niveau du gène *leuX* impliqué dans la synthèse d'ARNt, et comprenant le gène *fimA*, codant pour une

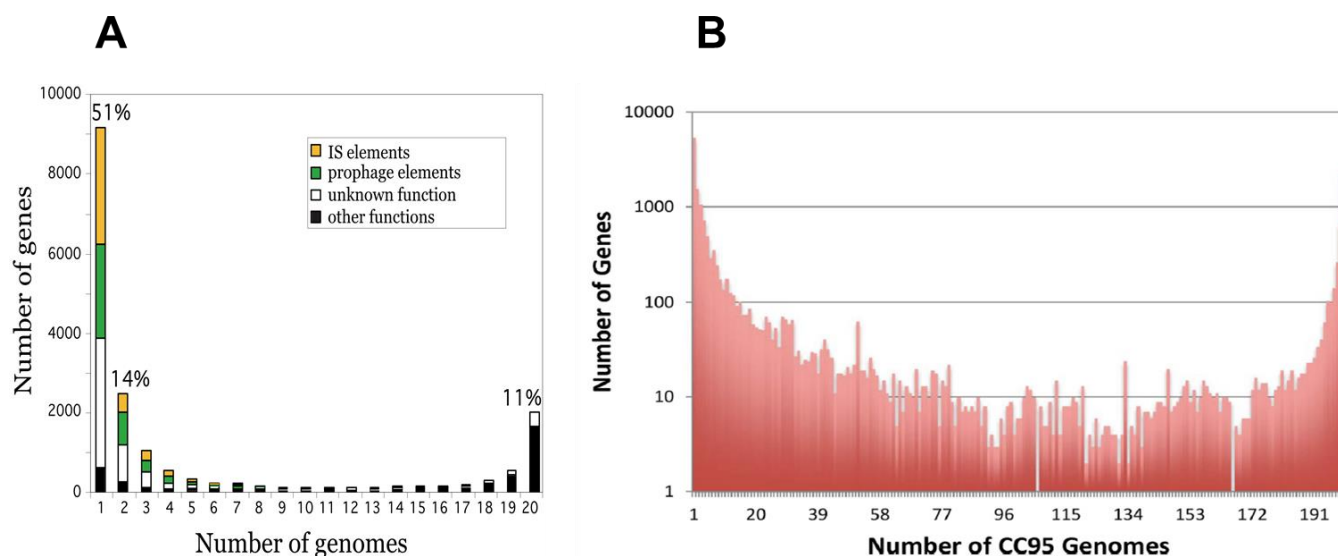
adhésine⁵ (46). Ces régions où le temps de résidence des gènes est court, avoisinent des régions de grande stabilité génique. Il est possible qu'un gène nouvellement intégré dans le génome dans un des points chauds puisse disséminer dans les régions flanquantes par recombinaison, et ainsi s'établir à long terme dans le génome d'une souche. Les autres points chauds ne sont pas répartis équitablement le long du chromosome. Le taux de recombinaison dans les régions proches du terminus de réplication est plus faible que dans le reste du chromosome. Cependant, les sites d'intégration de prophages γ sont plus abondants (47). Les prophages sont des virus n'infectant que des bactéries, et sont source de transferts géniques, car ils sont capables de transporter des gènes bactériens lors de leur passage d'une bactérie à une autre.

Le génome d'une souche contient un nombre de gènes variant de 4200 à 5400. Parmi ces gènes, moins de 2000 sont communs à tous les génomes de l'espèce (46). Ces gènes constituent le génome « cœur » de l'espèce, ou « core genome », et représentent un peu moins de la moitié des gènes portés par une souche. Ils codent pour une fonction connue dans la majorité des cas et sont principalement impliqués dans la synthèse d'acides aminés, de nucléotides, de cofacteurs enzymatiques et de protéines. Ils peuvent également jouer un rôle dans le métabolisme de l'ADN, des acides gras, des phospholipides, et de la traduction (46). Le reste des gènes appartient au génome dit « variable », c'est-à-dire qu'ils ne sont pas retrouvés dans toutes les souches. Ces gènes sont essentiellement des séquences d'insertion (IS), des gènes de prophages et des gènes de fonction inconnue. Le génome cœur et variable forment le pan-génome de l'espèce. La taille du pan-génome dépend du nombre de souches étudiées et de leur diversité phylogénétique. Dans une étude menée par séquençage Sanger sur le contenu génomique de 20 souches représentatives de la diversité phylogénétique à l'échelle de l'espèce (46), le pan-génome a été estimé à 18 000 gènes. Plus récemment, par séquençage Illumina, le pan-génome de 1500 isolats d'*E. coli* pathogènes, représentatifs de la diversité phylogénétique de l'espèce, a été estimé à 69 000 gènes (48). Cette taille serait en réalité encore plus grande, le nombre de nouveaux gènes comptés lors de l'ajout de génomes n'ayant pas encore atteint de phase de plateau. L'analyse du pan-génome montre que la structure génétique de l'espèce est fractale, c'est-à-dire que quel que soit le niveau phylogénétique considéré, on observe peu de gènes du pan-génome présents dans toutes les

⁵ Protéine permettant à la bactérie d'adhérer aux cellules de l'hôte.

souches, alors que beaucoup de gènes sont retrouvés dans une ou quelques souches (Figure 2). Cette distribution s'observe quand on compare les génomes à l'échelle de l'espèce mais également à une échelle plus fine, au sein du complexe clonal⁶ 95, dont les souches sont des pathogènes extra-intestinaux (Figure 2) (49).

Figure 2. Nombre de gènes partagés en fonction du nombre de génomes représentatifs de la diversité à l'échelle (A) de l'espèce, extrait de (46) et (B) d'un complexe clonal pathogène, extrait de (49).



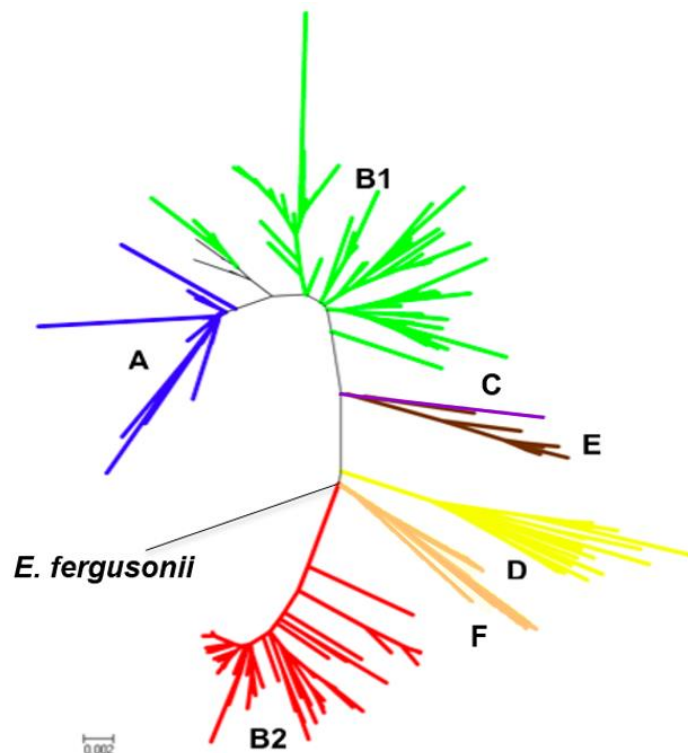
Un *E. coli* peut enrichir son génome variable par transfert horizontal de matériel génétique, les deux mécanismes principaux étant la conjugaison (transfert par contact direct entre une bactérie donneuse et une bactérie receveuse) et la transduction (transfert par l'intermédiaire d'un phage).

Ces phénomènes générateurs de diversité et de brassage génétique n'altèrent pas la phylogénie globale de l'espèce. En d'autres termes, il existe pour chaque souche un signal phylogénétique clair. D'abord l'analyse des variants protéiques par la technique du « MultiLocus Enzyme Electrophoresis » (MLEE) (50), puis l'analyse de l'ADN par la technique du « MultiLocus Sequence Typing » (MLST) (51) ont permis de subdiviser l'espèce *E. coli* en sept groupes phylogénétiques principaux dénommés A, B1, B2, C, D, E et F (Figure 3) (52, 53). On décrit également cinq clades appartenant au genre *Escherichia*, dont le phénotype est très proche voire identique à celui des *E. coli* mais dont les caractères génotypiques les différencient des souches d'*E. coli stricto sensu* (54). A l'heure actuelle, on estime que les

⁶ Groupe de souches d'*E. coli* dont les génotypes présentent un profil allélique proche voire identique.

souches du groupe B2 ont été les premières à émerger dans l'évolution, entre 30 et 23 millions d'années avant notre ère (55). Le groupe D puis le groupe E auraient ensuite émergé. Enfin, l'ancêtre commun des groupes frères C, A et B1 serait apparu il y a 3 millions d'années (Figure 3) (55, 56).

Figure 3. Arbre phylogénétique de l'espèce *E. coli*, raciné sur l'espèce *E. fergusonii*. Arbre construit par la méthode du plus proche voisin (« neighbor joining »), à partir de séquences nucléotidiques des gènes *icd* (1166 paires de bases), *papB* (1003 paires de bases), *polB* (1081 paires de bases), *putB* (906 paires de bases), *trpA* (727 paires de bases) et *trpB* (1140 paires de bases). Le groupe B2 est indiqué en rouge, le groupe F en orange, le groupe D en jaune, le groupe E en marron, le groupe C en violet, le groupe B1 en vert et le groupe A en bleu. Extrait de (57).



Plusieurs méthodes de typage existent pour différencier des souches d'*E. coli* à partir d'isolats. Une des plus anciennes consiste à déterminer les antigènes somatique et flagellaire (respectivement appelés « O » et « H », permettant de distinguer des sérotypes). Trois schémas de MLST existent à l'heure actuelle pour typer les souches d'*E. coli*, et utilisent le séquençage de plusieurs gènes de ménage⁷, dont la combinaison d'allèles permet de définir des « Sequence Type » (« ST ») (58). Les schémas Warwick, de l'Institut Pasteur et de l'Université du Michigan sont utilisés dans les études sur *E. coli*, mais on retrouve

⁷ Présent chez toutes les bactéries de l'espèce et dont la séquence est très conservée, car son produit d'expression est indispensable au bon fonctionnement de la cellule.

principalement le schéma Warwick. Ce schéma utilise les gènes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA* (59), et celui de l'Institut Pasteur les gènes *dinB*, *icd*, *pabB*, *polB*, *putP*, *trpA*, *trpB*, *uidA* (53). Si on dispose aujourd'hui des techniques pour connaître la totalité de la séquence du génome d'une souche, le recours à des marqueurs alléliques ciblés tels que les sérotypes et les ST restent des outils fiables et d'actualité pour suivre l'émergence de souches pathogènes au sein des populations bactériennes intestinales, et établir des rapprochements entre les études.

L'adaptation d'*E. coli* au tube digestif des animaux à sang chaud est considérée comme la principale force de sélection naturelle ayant dirigé son évolution depuis sa divergence avec le genre *Salmonella* il y a 120 et 160 millions d'années. Son émergence suit l'apparition des mammifères et de leur alimentation lactée. L'ancêtre d'*E. coli* devient capable de métaboliser le lactose grâce aux gènes portés sur l'opéron lactose, et donc à utiliser les ressources présentes dans le tube digestif de cette nouvelle classe d'animaux, amenée à connaître une explosion radiative majeure à l'âge tertiaire (60). La plasticité génomique d'*E. coli* est à la base de son adaptation rapide à des environnements variés, par l'apparition de mutations bénéfiques et l'acquisition de gènes conférant un avantage sélectif dans les nouvelles conditions que son cycle de vie lui impose.

b. Ecologie des populations commensales dans le tube digestif

(i) Composition des populations commensales au sein de l'hôte

E. coli est l'espèce aéro-anaérobie majoritaire du tube digestif des animaux à sang chaud, et la plus fréquemment retrouvée au sein du genre *Escherichia* et de la famille des entérobactéries. Cependant, elle est peu abondante par rapport à la flore anaérobie, puisque la quantité moyenne d'*E. coli* dans les fèces des bovins est estimée à 10^6 bactéries/g (28). Chez les bovins, mais également dans d'autres espèces, dont l'Homme, une population commensale d'*E. coli* est normalement constituée de plusieurs souches, et est établie sur toute la longueur du tube digestif à partir du duodénum, avec un maximum de concentration au niveau du côlon et du caecum (61–63). Il a été montré qu'un individu héberge au moins une souche d'*E. coli* dominante, c'est-à-dire qui représente plus de la moitié des isolats d'un échantillon (64). La composition des populations commensales d'*E. coli* existant au sein de l'hôte peut s'estimer par la prévalence des différents groupes phylogénétiques. On distingue 3 catégories : le groupe phylogénétique dominant, dont la prévalence est supérieure à 50%,

le ou les groupes intermédiaires, dont la prévalence est comprise entre 10% et 50% et les groupes mineurs, dont la prévalence ne dépasse pas 10% (65). Les clones appartenant à ces deux derniers groupes sont considérés comme sous-dominants dans l'échantillon. Cette structure a été mise en évidence chez l'homme (64), mais aussi dans plusieurs espèces animales, dont les bovins (64, 66, 67).

De manière générale, on peut séparer les facteurs influençant la structure génétique des populations d'*E. coli* en 2 catégories : les caractéristiques de l'hôte et celles de l'environnement. En effet, les particularités de l'hôte, telles que l'espèce à laquelle il appartient, sa masse corporelle, l'anatomie et la physiologie de son tube digestif, les temps de rétention du bol alimentaire, et le régime alimentaire sont des prédicteurs fiables de la distribution des groupes phylogénétiques au sein du spectre d'hôtes (68). Par exemple, l'écosystème intestinal des herbivores semble favoriser les souches des groupes phylogénétiques B1 et D (28, 69). Une étude à laquelle j'ai participé au cours de mon master 2 menée sur des bovins domestiques et des buffles sauvages au Zimbabwe a montré que les profils des populations d'*E. coli* étaient très similaires entre ces deux espèces qui partageaient les mêmes ressources et le même écosystème. Le groupe phylogénétique dominant était le groupe B1, suivi du groupe E. Une étude menée sur plus de 300 souches d'*E. coli* isolées chez des veaux, a montré la présence de tous les groupes phylogénétiques d'*E. coli*, avec une dominance du groupe phylogénétique dominant B1, suivi du groupe phylogénétique E comme groupe intermédiaire (67). La prévalence des autres groupes phylogénétiques était inférieure à 10% (67).

Les facteurs environnementaux de l'hôte, telle que la pression anthropique, influent sur la composition des populations d'*E. coli* chez les animaux. Une domestication favorise l'établissement de souches des groupes phylogénétiques A et B1. Cela a été observé dans plusieurs espèces sympatriques domestiques et sauvages (28, 69). Par exemple, dans l'étude sur les bovins domestiques et les buffles sauvages, une différence s'observait au niveau des groupes minoritaires. Chez les buffles, le troisième groupe phylogénétique était le groupe B2, qui est fréquemment retrouvé dans la faune sauvage (28). Chez les bovins domestiques, le troisième groupe phylogénétique le plus prévalent était le groupe A, qui est un groupe dominant chez les humains (70). Cela suggère une transmission de souches entre les humains et leur bétail, via des contacts fréquents et rapprochés (71). La transmission de souches entre l'homme et le bovin peut aussi avoir lieu dans l'autre sens. Les bovins peuvent également être

à l'origine de la colonisation du tube digestif des humains par de nouvelles souches et influencer sur la composition des populations humaines. Des souches bovines sont capables de coloniser d'autres espèces présentes dans l'environnement immédiat de leurs hôtes, comme des souris, des cochons et des hommes, et à s'établir durant le temps que dure le contact à hauteur de 10^4 - 10^6 bactéries/g de fèces chez l'homme (72). La quantité moyenne d'*E. coli* chez l'homme étant de 10^8 bactéries/g de fèces, les souches d'*E. coli* bovines peuvent donc s'établir dans la population commensale chez l'homme comme souche minoritaire, au moins durant la période où les deux hôtes sont en contact.

(ii) *Niche écologique d'E. coli au sein de l'écosystème digestif*

Dans le tube digestif, *E. coli* utilise principalement les sucres comme source de carbone, dont le gluconate principalement (73). Son métabolisme est adapté au mucus synthétisé par les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal (44). Elle bénéficie de la dégradation par des bactéries anaérobies de polysaccharides du mucus (74) ou des fibres alimentaires. *E. coli* optimise sa croissance en alternant une respiration aérobie⁸ et micro-aérophile⁹. Il en résulte une vitesse de croissance élevée, avec six à 21 générations par jour qui se succèdent *in vivo* (75), et un temps de génération estimé de l'ordre de 120 minutes (76). Cela lui confère un avantage par rapport à d'autres bactéries en compétition pour les mêmes nutriments. Du fait de la dégradation du mucus qui tapisse l'épithélium intestinal et de son élimination par le péristaltisme, les bactéries se retrouvent dans la lumière du tube digestif de leur hôte, et sont éliminées avec les matières fécales dans l'environnement (44), pouvant conduire à la colonisation de nouveaux hôtes (72).

Il est communément admis que la taille des populations commensales d'*E. coli* d'un individu est proportionnelle à la taille de sa niche écologique nutritionnelle (77), en d'autres termes, à la quantité des nutriments disponibles. Cependant, d'autres forces agissent sur ces populations commensales. Une compétition pour les ressources avec les autres souches en présence a lieu. Elles doivent augmenter leur efficacité à métaboliser les sucres présents dans le mucus pour se multiplier plus rapidement (78, 79). D'autres se spécialisent et deviennent capables d'explorer des niches nutritionnelles différentes (80, 81), comme la souche *E. coli*

⁸ Qui nécessite de l'oxygène pour produire de l'énergie.

⁹ Qui nécessite une concentration en oxygène inférieure à celle de l'air pour produire de l'énergie.

536 chez la souris, ayant acquis la capacité à croître plus rapidement en présence de D-galactonate (82). Barroso-Baptista et ses collègues ont suivi l'apparition de mutations bénéfiques dans deux lignées d'*E. coli* en compétition dans le tube digestif de souris (83). Ils ont estimé un taux moyen de mutations adaptatives à 7×10^{-7} mutations par génération. Plusieurs souches, porteuses de mutations bénéfiques à différents loci de leur génome ont émergé au cours de l'expérience. En quelques jours, des mutations sur l'opéron galactitol, dont les gènes permettent de métaboliser le galactitol, sont apparues dans des souches émergentes différentes. Des interférences clonales ont alors été observées (83). L'interférence clonale est la compétition de souches porteuses de mutations bénéfiques dans un environnement donné, et qui conduit à la disparition de l'une ou plusieurs d'entre elles. Ainsi, la souche dominante est généralement une souche généraliste¹⁰ qui s'est le mieux adaptée à son nouvel environnement grâce à l'accumulation de mutations bénéfiques. L'adaptation d'une souche au tube digestif est un phénomène complexe, car son taux d'évolution dépend de la taille de l'inoculum initial, du taux de mutations et de leurs effets sur l'adaptation de la souche à un environnement donné¹¹. Les mutations conférant un avantage sélectif se fixent dans la population avec une probabilité proportionnelle au bénéfice qu'elles apportent. Les souches peuvent également inhiber les autres souches avec lesquelles elles sont en compétition en produisant des protéines antimicrobiennes appelées colicines. Trente pour cent des souches d'*E. coli* seraient capables de produire une colicine (84). Il en existe de différents types, certaines étant responsables de la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible, du clivage de son ADN, de la dégradation de l'ARN ou encore de l'inhibition de la synthèse de peptidoglycanes (84).

Une concurrence pour les ressources a également lieu avec les protéines de l'organisme colonisé pour capter des molécules essentielles à leur survie, comme le fer (85). Les *E. coli* sont également les proies de prédateurs, comme les phagocytes mais également des protozoaires tels que *Dictyostelium discoideum* ou *Tetrahymena pyriformis*, contre lesquelles elles se sont adaptées pour résister (86, 87).

¹⁰ C'est-à-dire dont le spectre de sources de carbone est large.

¹¹ Les mutations qui apparaissent dans le génome d'une souche ne procurent pas forcément un avantage sélectif. Elles peuvent être bénéfiques, neutres, ou délétères.

c. Les souches productrices de toxines de Shiga

(i) Données épidémiologiques

Les *E. coli* producteurs de toxines de Shiga (« Shiga-Toxin producing *E. coli* » ou STEC), également appelés *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des pathogènes pour l'homme. Ces pathovars causent des diarrhées hémorragiques sévères, et sont la première cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant, du fait du syndrome hémolytique et urémique qu'elles provoquent. La forme épidémique de ces infections et leur gravité chez l'enfant en font un problème de santé publique important. La virulence des souches en cause est associée à deux phénomènes. D'une part, la colonisation du tube digestif par la souche, et d'autre part, la production par celle-ci de toxines appelées toxines de Shiga. Ces toxines produites dans le tube digestif traversent l'épithélium intestinal avant de rejoindre la circulation sanguine. Elles entraînent la mort des cellules endothéliales par arrêt de la synthèse protéique, ce qui induit des lésions de l'endothélium vasculaire, à l'origine des manifestations cliniques. Ces toxines sont codées par le gène *stx* porté par un phage lysogène¹². Deux classes de toxines de Shiga, peuvent être produites, codées respectivement par les gènes *stx1* et *stx2*. Trois variants de toxines Stx 1 et au moins six variants de toxines Stx 2 ont été identifiés à ce jour. Ils sont souvent associés à la consommation de viande, produits laitiers ou d'eaux contaminées par le fumier, les bovins, particulièrement les jeunes, étant un de leurs réservoirs. Parmi les différentes souches d'*E. coli* productrices de toxines de Shiga, on retrouve plus 400 sérotypes différents (88). Les sérotypes O157:H7, et O26:H11 sont les plus fréquemment retrouvés chez les bovins. *E. coli* O157:H7 est l'une des souches les plus impliquées dans les pathologies humaines. La prévalence des bovins porteurs asymptomatiques d'*E. coli* O157:H7 est comprise entre 0 et 50% (89–91). Cette fourchette d'estimation est à considérer avec précaution, du fait de la nature variable de ce portage, pouvant conduire à de nombreux faux négatifs. En effet, le portage d'*E. coli* O157:H7 peut persister sur de longues périodes chez un même individu ou dans un troupeau, ou par intermittence sur des périodes plus courtes, voire de manière très occasionnelle (90, 92, 93). Les quantités présentes dans les fèces peuvent également grandement varier d'un jour à l'autre (92). Ainsi, la prévalence dans le troupeau peut augmenter jusqu'à 100% quand l'effort d'échantillonnage et le suivi longitudinal

¹² Un virus de bactérie dont le matériel génétique est intégré au génome de la cellule hôte, et qui peut se transmettre aux cellules filles lors de la réplication.

augmentent (94). On décrit la présence dans des troupeaux de bovins « super-excréteurs », excréant à plus de 10^8 bactéries EHEC/g dans leurs fèces (92). Un suivi du portage d'EHEC au sein d'un troupeau de bovins sur une période de neuf mois a permis de mettre en évidence une dynamique très rapide de ces clones, avec des transmissions inter-individuelles répétées, une rotation rapide des clones EHEC détectés et une évolution de certains clones au sein du troupeau et d'un même individu (94).

(ii) *Données écologiques*

E. coli O157:H7 est capable de s'établir sur toute la longueur du tube digestif d'un veau sevré, depuis le rumen jusqu'au rectum (95, 96). Un tropisme particulier d'*E. coli* O157:H7 pour les follicules lymphoïdes proches de la jonction recto-anale a été relevé, sur une zone de trois centimètres de longueur environ (96). Si *E. coli* O157:H7 peut déclencher des diarrhées hémorragiques chez les veaux nouveau-nés (97), la plupart des études rapportent une absence de signes cliniques ou histologiques au niveau de la muqueuse du tube digestif chez l'animal lors du portage de souches productrices de toxines de Shiga (98). Ainsi, on considère ces souches comme des commensales des bovins. Pourtant, il a été montré qu'*E. coli* O157:H7 était capable d'induire des lésions histopathologiques au niveau de la muqueuse rectale chez le veau, associées à une infiltration de la muqueuse par des neutrophiles (99). *E. coli* O157:H7 est donc capable d'être à la fois à l'état de commensal et de pathogène chez les bovins.

En l'absence de compétiteurs, *E. coli* O157:H7 est capable de coloniser efficacement le tube digestif des souris en utilisant le gluconate (100). Une étude de compétition *in vivo* entre *E. coli* O157:H7 et *E. coli* K-12 a montré que *E. coli* O157:H7 diversifiait sa source de carbone en présence d'un compétiteur, devenant capable de métaboliser un certain nombre de carbohydrates supplémentaires par rapport à la souche K-12, qui est une bonne colonisatrice chez la souris (100, 101). L'hypothèse a été émise que leur capacité à se fixer aux cellules de l'épithélium intestinal et à induire des dommages pourrait être une autre source de nutriments, les autres souches d'*E. coli* n'y ayant pas accès car localisées dans la couche de mucus (100). Les *E. coli* O157:H7 sont sensibles aux colicines produites par certaines souches d'*E. coli* (95, 98, 102). Le gène *stx* permettrait aux souches d'*E. coli* d'augmenter leur taux de survie au sein des vacuoles de nourriture de *Tetrahymena pyriformis*, un protozoaire bactériophage (87). Dès lors, il est possible que la pathogénicité de ces souches soit un effet

collatéral de leur adaptation à un environnement intestinal où la prédation par des protozoaires joue un rôle de sélection.

4. Synthèse

Le tube digestif du veau est colonisé par des bactéries *in utero*. Après la naissance, une augmentation de la densité bactérienne et de la diversité du microbiote fécal s'observe dès la première semaine de vie. Malgré des variations inter-individuelles et des fluctuations dans le temps, le microbiote des bovins se compose principalement de bactéries appartenant aux phyla Firmicutes et Bacteroidetes. La complexification du microbiote est le fait de l'augmentation de l'abondance de certains genres bactériens présents très tôt dans la vie du veau.

Le microbiote fécal du veau est représentatif du microbiote situé au niveau de la partie distale du tube digestif. Il est donc peu probable qu'il soit représentatif de changements causés par des agents pathogènes ou autres troubles digestifs dont la localisation se situerait en amont de ce site.

Peu de choses sont connues des relations écologiques au sein du microbiote d'un individu. Les études de modélisation des réseaux écologiques suggèrent que le microbiote se constitue de beaucoup d'espèces capables de coexister dans un système stable dominé par les relations de compétition et structuré par leur hôte.

E. coli est l'espèce aéro-anaérobie majoritaire du tube digestif des animaux à sang chaud, et la plus fréquemment retrouvée au sein du genre *Escherichia* et de la famille des entérobactéries. Cependant, elle est peu abondante par rapport à la flore anaérobie. Les *E. coli* font partie des premières bactéries à coloniser le tube digestif du veau à la naissance, et sont dominantes durant les premiers jours de vie du veau. Le nombre d'*E. coli* diminue à mesure que le veau avance en âge. La plasticité génomique d'*E. coli* est à la base de son adaptation rapide à des environnements variés, par l'apparition de mutations bénéfiques et l'acquisition de gènes conférant un avantage sélectif dans les nouvelles conditions que son cycle de vie lui impose. La composition des populations commensales d'*E. coli* varie en fonction des caractéristiques de son hôte et de son environnement. D'autres forces au sein du microbiote et de l'espèce influent également sur sa composition, comme la compétition pour les ressources, la production de colicines, ou encore la prédation par des protozoaires.

Certaines souches d'*E. coli* productrices de toxines de Shiga sont responsables de troubles graves chez l'homme et sont adaptées à l'écosystème digestif des bovins. La prévalence de

portage de ces souches au sein d'un troupeau est fluctuante, avec un portage individuel souvent de courte durée, mais des transmissions inter-individuelles répétées.

II. Perturbations des communautés bactériennes fécales : le rôle des antibiotiques

1. Données épidémiologiques sur l'exposition aux antibiotiques en médecine vétérinaire

a. Exposition aux antibiotiques des animaux de production en France

L'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) suit la vente des médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France depuis 1999. Le dernier rapport publié présente les données de vente et d'exposition dans les différentes filières animales de l'année 2016 (103). Au cours de cette année, le volume total d'antibiotiques vendu en médecine vétérinaire s'élevait à 530 tonnes de principes actifs, toutes familles d'antibiotiques et filières animales confondues (103). Les prémélanges médicamenteux (antibiotiques mélangés à l'alimentation), les solutions et les poudres orales représentaient 81% du tonnage vendu. Il est important de rappeler que ce volume est destiné à des fins thérapeutiques, tout autre usage étant interdit depuis 2006 en Union européenne. Les trois familles d'antibiotiques les plus vendues étaient, par ordre décroissant, les tétracyclines, les sulfamides et les pénicillines. Ces trois familles représentaient à elles seules 70% du tonnage vendu en 2016.

Certaines familles considérées par l'OMS comme critiques pour la santé humaine, telles que les céphalosporines de troisième et quatrième générations et les fluoroquinolones, sont autorisées en médecine vétérinaire. Chez l'homme, ces antibiotiques peuvent constituer la dernière alternative de traitement dans des infections graves dues à des bactéries multi-résistantes (104). Les céphalosporines de troisième et quatrième générations (appartenant à la famille des β -lactamines) sont interdites chez les volailles et le lapin, et ne sont autorisées qu'en administration parentérale chez les bovins, les carnivores domestiques, les chevaux et les porcs, et en intra-mammaire chez les bovins (103). Les fluoroquinolones sont autorisées par voies orale et parentérale chez les bovins et les carnivores domestiques, par voie orale chez les volailles et le lapin, et par voie parentérale chez le porc. Ces deux familles représentaient 0,4% du tonnage vendu sur l'ensemble de ces filières en 2016 (103).

Le recours à des indicateurs prenant en compte la dose et la durée des traitements, ainsi que la masse de la population animale étudiée est nécessaire pour mesurer précisément l'exposition des animaux aux antibiotiques selon les familles et les voies d'administration. Un indicateur très utilisé est l'indicateur d'exposition animale aux antibiotiques (« Animal Level of Exposure to Antimicrobials » ou « ALEA »). Il s'agit du rapport entre la quantité de poids vif traité et la masse totale de population animale considérée. Par exemple, si le poids vif traité pour un antibiotique ou par une voie d'administration correspond au poids vif total de la population, l'ALEA est égal à 1. En 2016, l'ALEA était respectivement de 0,05, 0,175 et 0,157 pour les prémélanges médicamenteux, les solutions et poudres orales, et les formes injectables (103). L'exposition des animaux aux antibiotiques se fait d'abord via les poudres et solutions orales, puis par voie parentérale. Ces indicateurs ne rendent toutefois pas compte des disparités qui peuvent exister entre les filières, et fournissent une estimation très générale.

Il est important de signaler la mise en place entre 2012 et 2016 du plan national « écoantibio », visant à réduire de la consommation des antibiotiques en médecine vétérinaire, afin de limiter l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques chez les animaux de rente et les animaux de compagnie. L'objectif sur cinq ans était de réduire de 25% l'exposition des animaux aux antibiotiques. Cet objectif a été largement dépassé puisqu'en 2016, l'ANSES estimait la réduction de l'exposition des animaux à 37% (105). Cette réduction était encore plus marquée pour les antibiotiques critiques, puisque le nombre de prescriptions a diminué de 81% pour les céphalosporines de dernières générations et de 75% pour les fluoroquinolones. Un second plan écoantibio a été mis en place en 2017 et doit durer jusqu'en 2021 afin de faire perdurer cette baisse de la consommation (103, 105).

b. Exposition et usages antibiotiques dans la filière bovine en France

Cent vingt-quatre tonnes d'antibiotiques ont été vendus en 2016 dans la filière bovine, ce qui représente environ 23% du tonnage total vendu cette année (103). La filière bovine représente le deuxième tonnage le plus important derrière la filière porcine (36% du tonnage) et devant les volailles (20% du tonnage) (103). Les bovins sont traités principalement par voie parentérale, puis par voie orale, via des poudres et solutions orales. Le nombre moyen de jours de traitement par bovin en 2016 a été estimé à 2,6 jours, contre 4 jours en 2005 (103). Les traitements par voie orale durent généralement entre quatre et cinq jours et le nombre

de jours moyen par traitement parentéral est de 2,5 jours. Par ordre décroissant, les antibiotiques les plus vendus dans la filière sont les pénicillines, les tétracyclines, les aminosides, les macrolides, les sulfamides, le triméthoprim et les polypeptides. L'ALEA dans la filière bovine s'élevait à 0,25 en 2016 (103). En d'autres termes, les ventes d'antibiotiques à destination de cette filière ont permis de traiter 25 % du poids vif total de bovins en 2016, ce qui représente une baisse de 6,6 % depuis 1999.

La filière bovine est la filière la plus exposée aux céphalosporines de troisième et quatrième générations. L'ALEA chez les bovins est de 0,006, tandis qu'il est de 0,001 chez le porc (103). Il est à noter que l'exposition des bovins a baissé de 81,6% depuis 2013. Seuls les animaux de compagnie ont un ALEA supérieur pour les céphalosporines (et vaut 0,01).

Toutes ces données sont basées sur les déclarations de parts de vente des laboratoires pharmaceutiques dans les conditions d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Elles ne renseignent pas sur la réalité pratique des usages et de l'exposition aux antibiotiques, qui varient suivant les systèmes de production et l'âge des animaux. Parmi tous les systèmes de production, celui du veau de boucherie est un des systèmes où la consommation antibiotique par animal est l'une des plus élevée. L'exposition des communautés microbiennes digestives aux antibiotiques y est maximale (106).

c. Exposition et usages antibiotiques dans la production des veaux de boucherie

La production de veaux de boucherie en Europe est une production intégrée, c'est-à-dire que toute la chaîne de production est gérée par un intégrateur. L'intégrateur fournit l'aliment, le suivi technique, les médicaments et les frais vétérinaires. Les veaux sont placés chez un éleveur qui a la charge d'engraisser et de prendre soin des animaux durant toute la période d'engraissement. L'intégrateur rémunère l'éleveur en fonction du poids des veaux à l'abattage. La majorité des veaux sont collectés dans les élevages laitiers où ils sont nés, et ont entre deux et trois semaines d'âge. Ils sont acheminés en quelques heures dans des centres de tri où ils sont assemblés par lots homogènes en termes de race, de sexe, d'âge, de conformation. Ils sont ensuite conduits dans les fermes d'engraissement où ils grandissent

jusqu'à l'âge de six mois environ. La France est l'un des premiers pays producteurs et le premier consommateur de viande de veau de boucherie en Europe (107).

Chez le veau de boucherie, les pathologies majeures sont les diarrhées et les affections respiratoires, toutes deux fortement génératrices de prescriptions antibiotiques. Les traitements antibiotiques représentent 82% des traitements pharmaceutiques (106). La majorité des traitements antibiotiques est donnée dans un but curatif ou métaphylactique¹³. D'après une étude menée en 2013 et 2014 sur plus de 40 000 veaux de boucherie en France, un veau reçoit en moyenne 8,6 traitements antibiotiques sur l'ensemble de la période d'engraissement (108). L'exposition varie entre les élevages de 2,8 à 15,9 traitements par veau (108). En France, 95,8% des traitements antibiotiques sont collectifs, et quasi-exclusivement administrés par voie orale. Ils sont donnés au moment de la buvée du lait, deux fois par jour (106). En conséquence, la grande majorité des traitements antibiotiques sont presque exclusivement administrés par les éleveurs (106). Une étude a montré que les éleveurs suivaient les prescriptions vétérinaires avec soin (106).

La famille des tétracyclines est la plus utilisée chez le veau de boucherie (108), avec en moyenne 4,3 traitements par veau au cours de l'engraissement (108). Les autres molécules antibiotiques les plus utilisées sont la colistine, les macrolides et les sulfamides, représentant respectivement 1,6, 1 et 0,6 traitements par veau (108, 109). L'usage des céphalosporines de troisième et quatrième générations et des fluoroquinolones est marginal, avec une moyenne respective de 0,05 et 0,06 traitement par veau. Un tiers des traitements administrés est une combinaison de deux molécules antibiotiques, le plus souvent une association entre tétracycline, amoxicilline, tylosine et colistine (106).

Une pratique caractéristique de l'élevage du veau de boucherie est l'administration de traitements antibiotiques prophylactiques au démarrage. Durant les premières semaines d'engraissement, les veaux sont mis sous traitements antibiotiques. Cet usage prophylactique des antibiotiques à l'entrée est dû au risque infectieux élevé que courent les veaux pendant cette période où ils sont encore sensibles aux diarrhées infectieuses, dont *E. coli* est l'un des agents étiologiques, et commencent à développer des pathologies respiratoires. Cette pratique est quasi-universelle, et représente en moyenne 2,9 traitements par veau (108). Les

¹³ C'est-à-dire un antibiotique donné à titre préventif à la totalité du lot lorsqu'un veau ou quelques veaux présentent des signes cliniques évocateurs d'une infection.

tétracyclines et la colistine sont les familles antibiotiques majoritairement utilisées dans les traitements au démarrage (108, 109).

Les animaux de production, particulièrement les veaux de boucherie, reçoivent des quantités d'antibiotiques importantes, de différentes familles, sur des périodes prolongées et tout au long de leur vie. Cette exposition massive a des conséquences sur leurs communautés bactériennes digestives, et en font le lieu d'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, notamment au sein des populations d'*E. coli*.

2. Effets indésirables des antibiotiques sur le microbiote fécal

a. Le microbiote intestinal, épicerie de l'émergence de la résistance

L'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux molécules antibiotiques suit de peu leur introduction sur le marché. L'histoire de la streptomycine en est un bon exemple. Découverte en 1943, mise sur le marché en 1946, on décrit des résistances chez *Mycobacterium tuberculosis* dès 1948 (110). L'augmentation de la production industrielle de molécules antibiotiques au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, et l'élargissement de leur spectre d'hôtes aux animaux domestiques, ont été suivis d'une croissance de la proportion de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques, et ce pour de nombreuses espèces bactériennes (111). Dès lors, il paraît évident, à première vue, que l'émergence de bactéries à la fois pathogènes et résistantes résulte de la sélection de mutants résistants au niveau d'un foyer infectieux, suite à la pression exercée par les molécules antibiotiques délivrées sur le site (112).

A côté de cette sélection directe au foyer infectieux, connue depuis bien longtemps, on a négligé durant des décennies l'ampleur de la pression de sélection que ces traitements exercent sur les microbiotes des individus traités. La résistance aux antibiotiques n'est vue comme un problème majeur de santé publique que depuis la fin du XX^{ème} siècle, qui marque la fin de la période prolifique en nouveaux antibiotiques mis sur le marché. Aujourd'hui, on comprend mieux le lien entre un traitement antibiotique et la sélection de souches résistantes à distance du site d'infection, où on attend qu'il exerce son activité. Grâce à l'avènement des méthodes de séquençage de nouvelle génération, l'étude de la dissémination de mécanismes de résistance au niveau d'un métagénome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes présents dans une biocénose¹⁴, tel que le microbiote intestinal est devenu possible.

Le microbiote intestinal d'un individu peut être mis en contact direct avec un antibiotique de plusieurs manières. La voie la plus évidente est la voie orale, dans le cas d'infections localisées dans le tube digestif, ou pour la commodité d'administration. L'effet sur le microbiote dépend des propriétés pharmacocinétiques des molécules. Dans le cas d'une administration orale, une fraction de la dose non absorbée peut atteindre les communautés

¹⁴ Ensemble des êtres vivants d'un milieu donné.

microbiennes locales. Lors d'une administration parentérale, une fraction de la dose est éliminée par voie biliaire, possiblement sous une forme encore active, que ce soit sous la forme de la molécule mère ou de métabolites. Des molécules antibiotiques peuvent donc se retrouver à des faibles doses et de manière prolongée au contact des communautés microbiennes digestives, exerçant alors une pression de sélection non contrôlée sur ces communautés.

Le microbiote intestinal est constitué d'une communauté bactérienne dense et riche en taxa bactériens. On estime à environ 10^{10} à 10^{11} le nombre de cellules bactériennes contenues dans un gramme de matière fécale chez l'homme et l'animal. On suppose que l'ensemble des génomes des bactéries abrite un réservoir de gènes de résistance vaste et varié. Ainsi, la pression de sélection qu'exerce la fraction d'antibiotiques arrivant au niveau du tube digestif favorise les bactéries échappant à son mécanisme d'action et entraîne un effondrement des populations sensibles. De plus, cette densité phénoménale de bactéries dans un environnement confiné favorise les contacts directs entre cellules bactériennes, multipliant ainsi les possibilités d'échanges horizontaux de matériel génétique conférant une résistance (113). Cette dissémination de matériel génétique de résistance au sein du microbiote se fait principalement par transfert de plasmides¹⁵ (114).

Dès lors, l'acquisition de ces gènes de résistance par des bactéries pathogènes peut avoir lieu au sein de l'écosystème digestif de l'individu traité. Cette transmission au sein du tube digestif a été mise en évidence dès 1955, lors d'une épidémie de Shigellose au Japon. Akiba et ses collègues se sont rendu compte que les souches de *Shigella dysenteriae* responsables de la maladie et initialement sensibles étaient devenues résistantes à quatre familles d'antibiotiques au cours de l'épidémie (115). Ils font le rapprochement avec l'isolement de souches d'*E. coli* multi-résistantes dans les matières fécales de personnes travaillant dans des usines produisant de la tétracycline. Akiba a alors émis l'hypothèse que les souches d'*E. coli* multi-résistantes colonisant le tube digestif des humains pouvaient transférer leur résistance aux Shigelles quand elles coexistaient dans le tube digestif. Cette hypothèse a d'abord été confirmée par des mélanges de souches *in vitro*. Par la suite, Akiba a observé chez six patients, qui excrétaient dans leurs selles des *E. coli* antibiorésistants et des *Shigella* sensibles avant

¹⁵ Molécule d'ADN circulaire porteuse d'un ensemble de gènes et différente du chromosome. Un plasmide n'est pas essentiel à la vie d'une cellule bactérienne.

traitement, l'apparition de résistances chez *Shigella* quelques jours après l'induction d'un traitement antibiotique (115).

Une étude chez le volontaire sain a montré que lors de l'administration de quinolones, l'émergence de souches d'*E. coli* résistantes au sein du microbiote fécal était due soit à la présence à des niveaux indétectables de ces souches avant le traitement, soit à l'acquisition exogène de ces bactéries (116). Ainsi, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans le microbiote fécal serait le fait d'un nettoyage de niche par les traitements antibiotiques plutôt que l'apparition de mutations suivie d'une sélection des mutants par les antibiotiques, contrairement à ce qui se passe au niveau d'un foyer infectieux (112).

L'acquisition de gènes de résistance par des bactéries pathogènes peut également se faire en dehors des communautés microbiennes où ces gènes de résistance sont sélectionnés, après dissémination vers d'autres individus ou dans l'environnement proche. Ainsi, un individu peut aussi être infecté par des bactéries pathogènes déjà résistantes, sans avoir été exposé à l'antibiotique concerné. Par exemple, dans un hôpital de San Francisco, il a été observé que le nombre global d'infections du tractus respiratoire à germes résistants au cotrimoxazole avait manifestement augmenté à la suite de l'augmentation de l'utilisation de cette molécule uniquement chez des patients atteints du SIDA en prévention d'infections parasitaires (117).

L'exposition des flores commensales aux molécules antibiotiques est répandue dans les populations humaines et animales, puisqu'à chaque fois qu'un antibiotique est donné, que ce soit en prophylaxie ou en thérapeutique, une sélection au niveau de la flore commensale peut avoir lieu, et ce quel que soit l'état de santé de l'individu. A ceci s'ajoute l'absence de moyens préventifs à disposition du prescripteur, qu'il soit médecin ou vétérinaire, qui permettrait de limiter l'effet des antibiotiques prescrits sur ces flores. Un signe pathognomonique de ce dénuement est l'absence d'études systématiques sur les conséquences des schémas posologiques sur les flores commensales au moment du développement des médicaments antibiotiques. Malheureusement, les études menées à l'échelle des populations et des pays montrent clairement la corrélation forte entre la résistance des entérobactéries commensales et celles des entérobactéries pathogènes (118).

Le transfert de matériel génétique conférant résistance et l'émergence de bactéries pathogènes résistantes n'est pas le seul effet négatif des traitements antibiotiques sur le

microbiote d'un individu. De par l'effondrement des populations sensibles, les effets des antibiotiques sur le microbiote peuvent être multiples.

b. Les autres effets collatéraux sur la composition du microbiote fécal

La diminution de la diversité du microbiote fécal est l'un des effets secondaires les plus fréquemment rencontrés dans les études sur les effets d'une antibiothérapie sur le microbiote d'un individu. Cet effet peut se traduire par une diminution du nombre de taxa bactériens présents, ou de la surabondance de quelques genres, voire d'un seul, ou encore d'une combinaison de ces deux phénomènes (119). Cela a été montré chez plusieurs espèces hôtes (21, 120, 121). Une fois le traitement mis en place, la diminution est rapide et peut persister longtemps après l'arrêt du traitement (119). Elle est souvent rapportée avec la diminution de genres particuliers. Par exemple, chez le veau, l'exposition aux antibiotiques aurait un impact négatif sur les genres *Clostridium*, *Collinsella*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Papillibacter*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Roseburia* et *Streptococcus* (19, 21, 122). Une autre étude menée chez le veau rapporte un retard de colonisation de bactéries dégradant des fibres dans le microbiote fécal de veaux soumis à une pression antibiotique (22).

Les perturbations induites par les traitements antibiotiques modifient l'homéostasie du microbiote et favorisent la colonisation de l'hôte par certains pathogènes entériques. Il a été montré chez la souris qu'une seule injection de streptomycine en amont d'une infection expérimentale à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium multipliait par 10 les quantités retrouvées dans le côlon (123). La streptomycine induit la production par l'hôte de galactarate et de glucarate, qu'est capable de métaboliser *Salmonella enterica* (123). En induisant la production d'un substrat métabolisable par *Salmonella enterica*, le traitement à la streptomycine lui confère un avantage compétitif favorisant son expansion au sein du tube digestif. En supprimant certaines espèces commensales, les traitements antibiotiques peuvent augmenter la sensibilité de l'hôte à une infection par *Clostridium difficile*, comme par exemple la suppression de *Clostridium scindens*, capable de produire des molécules inhibant *C. difficile* à partir des sels biliaires (124). Il a également été montré que l'association entre les genres *Coprobacillus*, *Akkermansia* et *Blautia*, mise à mal lors d'un traitement à la clindamycine, protégeait de l'infection à *C. difficile* (41).

Les antibiotiques ont également un effet sur le phageome fécal. Le phageome fécal est l'ensemble des phages contenus dans les fèces d'un individu, et sont très nombreux dans le microbiote fécal. Ils peuvent apporter aux cellules qu'ils infectent des gènes leur conférant un avantage compétitif, en échange de leur propre survie et propagation dans le microbiote. Ainsi, il est probable que les phages jouent un rôle important dans l'adaptation des flores commensales à des stress environnementaux, tels que les antibiotiques. Une étude menée chez la souris a montré qu'après un traitement antibiotique donné par voie orale, le phageome s'enrichissait en gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de carbohydrates, comme par exemple l'amidon, la cellulose, et le lactose (125). Une autre étude a montré une augmentation du nombre de gènes codant pour une intégrase¹⁶ dans le phageome fécal de porcs traités par voie orale, ce qui suggère que les antibiotiques induisent l'intégration des prophages au sein des génomes bactériens de la flore (125, 126). Dans la mesure où un grand nombre de bactéries commensales possèdent un spectre d'enzymes métaboliques spécifique, l'acquisition de gènes augmentant leurs sources de carbohydrates depuis le phageome pourrait conférer un avantage sélectif et modifier les relations de compétition pour les ressources au sein de l'écosystème intestinal.

Le caractère à la fois commensal et pathogène d'*E. coli*, associé à sa grande plasticité génomique en font une espèce centrale dans l'émergence de la résistance aux antibiotiques au sein des communautés bactériennes digestives.

¹⁶ Protéine dont le gène est codé par un virus et dont l'expression permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte.

3. Effets indésirables des antibiotiques sur les populations commensales d'*E. coli*

a. Transformation des populations commensales d'*E. coli*

(i) *Modification de la composition des populations en fonction de leur phénotype de résistance*

L'administration de molécules antibiotiques chez un individu, qu'il soit malade ou sain, induit un effondrement de la quantité des populations d'*E. coli* sensibles. Une étude menée chez le porcelet a montré que l'initiation d'un traitement à la ciprofloxacine induisait une élimination des entérobactéries sensibles, avec une diminution d'environ trois \log_{10} Unité Formant Colonie/g de fèces (UFC/g) dans les 24 premières heures de traitement (127). L'élimination rapide des entérobactéries sensibles libère une niche permettant la prolifération de souches résistantes au même antibiotique qui persistent à un haut niveau dans les fèces pendant plus de trois semaines après le traitement. Une injection sous-cutanée de florfenicol à des bœufs induit une augmentation transitoire de l'excrétion fécale d'*E. coli* résistants (128). Après un certain laps de temps après la fin du traitement, on observe une réémergence de souches sensibles, comme cela a été montré chez le veau. Une étude a mis en évidence une augmentation de l'isolement de souches résistantes chez des veaux lors d'un séjour en ferme d'engraissement, où ils recevaient des antibiotiques comme promoteurs de croissance. Après un changement d'environnement et retrait de l'exposition antibiotique, les chercheurs ont observé dans les souches dominantes une diminution des déterminants de la résistance, puis un remplacement par des clones sensibles au bout de deux mois (63). Une diminution de la quantité totale d'*E. coli* peut s'observer dans certains cas, mais ne semble pas être un effet systématique des antibiothérapies (129, 130).

Il a souvent été observé que l'abondance relative des bactéries résistantes diminuait après l'arrêt d'un traitement antibiotique, tant dans le foyer infectieux que dans la flore commensale. La résistance est souvent associée à un coût pour la bactérie, diminuant sa capacité à survivre et croître dans un milieu (131). Il a été proposé qu'une réduction de la consommation d'antibiotiques diminuait la pression de sélection favorisant l'acquisition de résistances (131). Cela permettrait aux bactéries sensibles de concurrencer de manière efficace les souches résistantes et ainsi de diminuer l'abondance relative des bactéries

résistantes. Cependant, les bactéries peuvent limiter le coût de la résistance par des modifications de leur génome. Plusieurs mécanismes existent. Par exemple, des mutations adaptatives dites « compensatoires » peuvent apparaître (131). Des gènes conférant un avantage adaptatif dans un environnement donné peuvent également être acquis. Il a été montré que des souches d'*E. coli* résistantes aux quinolones étaient d'excellentes colonisatrices du tube digestif, et ce malgré des mutations apparues sur les gènes *gyrA* et *parC* impliqués dans la régulation de l'enroulement de l'ADN, qui est une fonction cruciale pour la survie d'une cellule (116, 132). Ces bactéries étaient adaptées à un style de vie commensal du fait de la présence d'un grand nombre de gènes impliqués dans la capture du fer et une activité élevée de RpoS, un régulateur important dans la résistance aux stress acide et oxydatif (132). Cela montre que les populations de bactéries résistantes peuvent se stabiliser en l'absence d'antibiotiques, devenant aussi adaptées à leur environnement que les souches sensibles via l'évolution de leur génome. Des souches pathogènes peuvent conserver leur pouvoir virulent et épidémique malgré la présence de gènes de résistances, telle que la souche d'*E. coli* productrice de toxines de Shiga O104:H4 responsable d'une épidémie de gastroentérites et de syndromes hémolytiques et urémiques en 2011 en Allemagne (133).

De plus, la co-sélection de résistances à différents antibiotiques se produit lorsque des gènes de résistance sont liés génétiquement, ce qui est fréquent lors de l'acquisition de résistance par transfert horizontal de gènes. Ces gènes sont portés par la même structure, qui peut être un plasmide ou un phage. La fréquence de la résistance à un antibiotique peut donc augmenter dans une population bactérienne sans que l'antibiotique en question ne soit présent (131).

(ii) *Dissémination de souches d'E. coli résistantes vers de nouveaux hôtes*

La colonisation des populations commensales d'*E. coli* par des souches résistantes peut également se faire sans exposition antibiotique directe de la flore digestive. Un exemple frappant est celui présenté dans l'étude menée sur des français métropolitains voyageant en zone tropicale. Cette étude a montré que 50% des individus revenant de pays tropicaux avaient acquis durant leur séjour à l'étranger des *E. coli* producteurs d'enzymes appelées « β -lactamases à spectre étendu » (BLSE), qui conféraient aux bactéries une résistance aux β -lactamines (dont les céphalosporines de dernières générations). Le taux d'acquisition variait de 31% chez les individus revenant d'Amérique Latine à 72% chez ceux de retour d'Asie (134).

La durée de portage au retour dépendait du pays qui avait été visité et était maximale chez ceux revenant de pays asiatiques (jusqu'à un an pour certains), où la prévalence en milieu communautaire est l'une des plus élevée dans le monde (134). Cette colonisation en l'absence de traitements antibiotiques peut se faire par l'acquisition de nouvelles souches résistantes (72), ou de matériel génétique par des souches déjà présentes (71). La transmission peut être directe, c'est-à-dire sans passer par l'intermédiaire d'un vecteur, ou indirecte, via l'environnement, dans lequel des souches résistantes peuvent être détectées (135). Une étude a montré une prévalence plus élevée de souches d'*E. coli* résistantes à l'ampicilline, à la streptomycine, et au cotrimoxazole chez des éleveurs de porcs comparée à des personnes n'exerçant pas de métier en lien avec des animaux, ce qui suggère que le contact avec les animaux de production est un facteur de risque (136). Les preuves de transmission indirecte sont nombreuses. La dissémination de la résistance vers la faune sauvage en est une bonne illustration. L'étude menée sur des buffles sauvages partageant ou ne partageant pas de zones de pâture avec des bovins domestiques (mais sans contact direct, c'est-à-dire ne pâturant pas aux mêmes heures) au Zimbabwe a montré un niveau de résistance des populations d'*E. coli* plus élevé chez les buffles avec contact, que chez les buffles sans contact (66). De plus, les résistances retrouvées chez les buffles sauvages étaient les mêmes que celles retrouvées chez les bovins domestiques, et concernaient les familles antibiotiques les plus utilisées chez les humains et le bétail dans cette zone rurale. D'autres études menées chez les animaux sauvages montrent un gradient de résistance des souches d'*E. coli* commensales en fonction de la pression anthropogène exercée sur l'hôte, maximal dans les zones urbaines, et qui diminue avec la densité humaine (71, 137, 138). Des preuves de transmission indirecte ont également été mises en évidence chez le bétail. L'homme pourrait servir de vecteur d'*E. coli* résistants entre les animaux. Dans l'élevage du veau de boucherie, les veaux des fermes dans lesquelles les soigneurs ne changent pas d'habits de travail tous les jours sont plus à risque de porter des *E. coli* résistants aux antibiotiques (109).

(iii) *La persistance à long terme de souches d'E. coli résistantes*

Sur le long terme et à l'échelle d'un cheptel, on observe une persistance d'entérobactéries fécales présentant des résistances à plusieurs antibiotiques, les plus inquiétantes étant les entérobactéries fécales productrices de BLSE. Ces entérobactéries ont largement diffusé au sein des cheptels et dans le milieu communautaire chez l'homme, à la fois par transfert

horizontal et association avec des clones ayant connu un succès épidémiologique majeur (139, 140). Les premières souches d'*E. coli* productrices de BLSE détectées en élevage bovin en France remontent à 2005 (141). Il s'agissait de BLSE de type CTX-M 1 et CTX-M 15, portées par un plasmide, dans des souches isolées dans l'urine et les fèces de vaches malades. La réussite épidémiologique de ces *E. coli* producteurs de BLSE est à rapprocher de celle des enzymes BLSE de la famille CTX-M, qui a largement supplanté les autres familles de BLSE en vingt ans (139). Les gènes CTX-M représentent 90% des gènes présents dans les *E. coli* producteurs de BLSE en situation commensale. En Suisse, la prévalence de portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE à l'abattoir en 2006 était de 8,6% chez les moutons, 13,7% chez les bovins adultes, 15,3% chez les porcs, 25,3% chez les veaux et 63,4% chez les poulets (142). Un exemple de succès épidémiologique de ces souches d'*E. coli* productrices de BLSE est celui du groupe clonal ST131, du groupe phylogénétique B2 et adapté au tube digestif de l'homme (143), qui est retrouvé associé au gène *bla*_{CTX-M 15}, codant pour une enzyme CTX-M. L'acquisition du gène *bla*_{CTX-M 15} s'est faite par le biais du plasmide IncF, inféodé à l'espèce *E. coli*. La captation de ce gène codant pour une BLSE a permis au ST131, responsable de nombreuses infections extra-intestinales, de résister aux traitements à base de céphalosporines de dernières générations (143, 144). Ce clone, à la fois pathogène et résistant à des antibiotiques critiques pour la santé humaine, a été isolé en situation d'infection mais également commensale, chez des individus en bonne santé de plusieurs espèces et dans de nombreux pays (145), à tel point que le terme pandémie est aujourd'hui utilisé pour désigner sa progression (144, 145). Si le clone ST131 semble principalement prévalent chez l'homme, d'autres clones résistants aux antibiotiques semblent également connaître un succès épidémiologique chez les animaux. C'est le cas des clones appartenant au complexe clonal 87 (CC87). Ce clone appartenant au groupe phylogénétique B1 est associé à une résistance à plusieurs familles d'antibiotiques, et possède une capacité élevée à acquérir et à transmettre du matériel génétique par transfert horizontal (146). Ils possèdent également une capacité importante à coloniser le tube digestif de souris, même en présence d'un clone compétiteur (146).

En présence d'une pression antibiotique, les populations commensales d'*E. coli* changent en profondeur, avec l'émergence de souches résistantes au sein des flores animales qui peuvent persister à long terme et diffuser vers de nouveaux hôtes, dont l'homme. De par la

forte prévalence dans les cheptels de souches porteuses de gènes codant pour des enzymes CTX-M, et l'émergence de lignées clonales multi-résistantes adaptées aux écosystèmes digestifs animaux, il apparaît nécessaire de comprendre la dynamique de ces populations d'*E. coli* résistantes au sein de leur réservoir animal, et notamment du réservoir bovin.

b. Résistances rencontrées au sein des populations commensales bovines

(i) Principales résistances détectées chez les souches d'*E. coli* bovines

Les résistances à de nombreuses familles antibiotiques ont été détectées dans différentes filières bovines. Une étude menée aux Etats-Unis en 2003 a permis de détecter au sein des flores commensales de vaches laitières et de bovins allaitants des souches d'*E. coli* résistantes aux aminosides, aux sulfamides, aux tétracyclines, aux β -lactamines, aux fluoroquinolones, et aux macrolides, avec des prévalences élevées pour les tétracyclines, les sulfamides, et les β -lactamines (147). Les mêmes niveaux de résistance se retrouvent dans des troupeaux en Corée la même année, où les résistances les plus fréquentes au sein des flores fécales concernaient les tétracyclines, les aminosides, et les β -lactamines (148).

En France, le réseau résapath est un réseau d'épidémiologie-surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes animales en France. Actif depuis 1982 chez les bovins, ce réseau collecte les données d'antibiogrammes des bactéries pathogènes animales réalisés dans les laboratoires d'analyses vétérinaires publics et privés. Comme pour les médecins, les vétérinaires praticiens réalisent dans le cas d'une suspicion de maladie infectieuse des prélèvements sur les animaux malades pour isolement bactérien et évaluation de leur sensibilité aux antibiotiques avant la mise en place d'un traitement. Au travers des souches d'*E. coli* pathogènes isolées, ce réseau nous renseigne sur la prévalence et la circulation de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques chez les bovins domestiques à l'échelle du territoire français. En 2016, la majorité des souches d'*E. coli* pathogènes pour lesquelles des informations sur la sensibilité antibiotique ont été collectées, concernait des souches responsables de gastro-entérites chez le veau (75% des antibiogrammes concernant *E. coli*) et d'infections de la mamelle (appelées mammites) chez la vache laitière (17%) (149). Les résistances aux antibiotiques étaient plus fréquentes dans les souches responsables de gastro-entérites que dans les souches responsables de mammites. Dix-sept pour cent des souches pathogènes digestives étaient résistantes aux fluoroquinolones, contre deux pour cent des souches isolées de mammites. La prévalence de souches résistantes à l'amoxicilline, à la

streptomycine, à la tétracycline, et à l'association sulfamides-triméthoprième parmi les isolats digestifs était respectivement de 85%, 83%, 76%, et 37%, alors que les niveaux de résistance chez les *E. coli* isolés de mammites étaient bien plus faibles (respectivement 32%, 20%, 19%, et 9%) (149). Les jeunes animaux représentent donc la source principale d'entérobactéries multi-résistantes et productrices de BLSE.

A l'abattoir, on estimait la prévalence de veaux de boucherie ayant une souche d'*E. coli* dominante sensible aux antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire entre 17% et 31% entre 2006 et 2012 (150, 151). En France, la majorité des veaux de boucherie, avait une souche d'*E. coli* dominante résistante à la tétracycline (80%), aux sulfonamides (68%), à l'amoxicilline (60%), et à la streptomycine (61%) (150). Ces prévalences élevées aux mêmes familles antibiotiques se retrouvaient également en Suisse, où 47% des veaux avaient une souche dominante résistante à au moins trois familles antibiotiques (151).

(ii) *Résistances aux céphalosporines de dernières générations*

La prévalence de portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE en France chez des bovins à l'abattoir a été estimée en 2008 à 6% (118). Cette prévalence est proche de celles observées dans d'autres pays, ainsi que de celle observée parmi des souches pathogènes isolées la même année chez des bovins malades (118, 147, 148). Un constat alarmant ressort du travail de veille mené par le réseau résapath. Dix pour cent des souches pathogènes digestives isolées chez le veau étaient résistantes aux céphalosporines de dernières générations, contre deux pour cent chez les souches responsables de mammites (149).

Ces *E. coli* pathogènes producteurs de BLSE peuvent être la manifestation clinique d'une situation encore plus alarmante au sein des élevages laitiers, dans lesquels naissent une partie du cheptel des veaux. En effet, le portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE au sein des flores fécales de ces veaux est fréquent et élevé. Au Royaume-Uni, des veaux porteurs de gènes codant pour des CTX-M ont été détectés dans 59% des élevages en 2010 (152). La prévalence de souches productrices de BLSE chez les veaux échantillonnés dans une ferme est très variable, allant de 11% en 2011 en Suède, à 81% en 2014 au Canada (153, 154). Elle diminue à mesure que le veau vieillit (153–155). Dès deux jours d'âge, les veaux peuvent être colonisés par des souches productrices de BLSE, ou dans les jours qui suivent (153, 155, 156) et en excréter à des niveaux élevés dans leurs fèces (157, 158), ce qui conduit à en retrouver dans leur environnement direct (158). De plus, une pratique répandue dans les élevages

naisseurs consiste à nourrir les veaux avec du lait contenant des résidus antibiotiques. Nourrir les veaux avec ce lait interdit à la vente permet de limiter les pertes économiques (159, 160). Une augmentation de la prévalence des souches productrices de BLSE a été mise en évidence dans les fermes où cette pratique avait lieu (122, 153, 158). Ainsi, les veaux peuvent jouer le rôle de réservoirs, à partir desquels peuvent se propager par transfert horizontal les gènes de résistance (161). Cette prévalence peut encore s'accroître en présence d'une exposition aux antibiotiques accrue, comme c'est le cas chez les veaux de boucherie.

c. Les souches d'*E. coli* productrices de BLSE chez les veaux de boucherie

La recherche d'*E. coli* producteurs de BLSE sur les animaux à l'abattoir présente l'avantage d'obtenir une photographie générale de la situation chez les animaux en bonne santé¹⁷. En effet, on peut y échantillonner des animaux de provenance diverse, et donc être représentatif, dans une certaine mesure et sous certaines conditions, de la situation à une échelle plus large que la ferme. Dans plusieurs pays européens, on constate qu'au moment de l'abattage, la prévalence de veaux de boucherie porteurs d'entérobactéries productrices de BLSE est de l'ordre de 20% à 30%, et en augmentation depuis plusieurs années (142, 150, 162). Entre 2007 et 2012, la prévalence de portage est passée de 6% à 30% en France (118, 150). Une augmentation de la prévalence a également été observée dans les fermes d'engraissement aux Pays-Bas, passant de 4% en 1998 à 39% en 2010 (162). Une étude a montré que la quantité d'antibiotiques reçue durant l'engraissement était le principal facteur de risque lié à la présence d'*E. coli* multi-résistants peu de temps avant le départ pour l'abattoir (109).

La prévalence de portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE lors des premiers jours d'engraissement chez le veau de boucherie est de 20% (163) puis diminue au cours des trois premiers mois d'engraissement (163). Les souches d'*E. coli* productrices de BLSE dans le tube digestif du veau de boucherie appartiennent principalement au groupe phylogénétique A (environ 40%), suivi des groupes phylogénétiques D ou E, et du groupe B1 (28%). Le groupe phylogénétique B2 est très rare (moins de 1%) (150). Plusieurs ST circulent au sein d'une ferme d'engraissement et entre les fermes d'engraissement (163). Au moment de l'abattage, les gènes codant pour des BLSE sont plus fréquemment portés par des souches d'*E. coli* sous-dominantes au sein des populations commensales et sont associés à des gènes conférant des résistances à d'autres familles antibiotiques (médiane de nombre de co-résistances portées

¹⁷ L'abattage d'un animal malade pour la consommation humaine étant interdit.

valant 4) (150). Ceci laisse supposer que l'usage d'antibiotiques autres que les β -lactamines peut aussi contribuer à l'émergence et la dissémination des souches productrices de BLSE. Plus de la moitié de ces souches présente des résistances à d'autres familles antibiotiques, notamment aux tétracyclines (93%), aux sulfonamides (87%), aux aminosides (74%) et au triméthoprim (73%) (150). Un tiers des souches productrices de BLSE sont résistantes aux fluoroquinolones (150). Il semble que ces co-résistances soient plus nombreuses chez les souches productrices de BLSE que dans le reste de la flore fécale des veaux (150). La résistance aux céphalosporines de dernières générations, aux fluoroquinolones, et à la colistine est faible voire absente de la flore dominante du veau de boucherie (150, 151).

Depuis 2005, la résistance aux céphalosporines de dernières générations chez le veau de boucherie est due à la présence d'une enzyme de type CTX-M. Quatre-vingt-dix-neuf pour cent des *E. coli* résistants aux céphalosporines de dernières générations produisaient une enzyme de type CTX-M (150, 162, 163). Les autres gènes, comme *bla_{SHV}*, sont détectés de manière sporadique (150). Il existe une grande diversité de gènes de CTX-M circulant dans les fermes, les plus fréquents étant *bla_{CTX-M 1}*, et *bla_{CTX-M 14}* (150, 163). D'autres gènes comme *bla_{CTX-M 15}*, *bla_{CTX-M 32}*, *bla_{CTX-M 57}*, *bla_{CTX-M 3}* et *bla_{CTX-M 79}* ont également été détectés (150, 162).

4. Synthèse

La filière bovine représente le deuxième tonnage d'antibiotiques vendus le plus important en France, et celle dans laquelle les animaux sont les plus exposés aux céphalosporines de troisième et quatrième générations. Le système de production du veau de boucherie est un des systèmes où la consommation antibiotique par animal est l'une des plus élevée. Une pratique courante est l'administration de traitements antibiotiques prophylactiques et collectifs au démarrage.

Ces expositions massives ont des conséquences sur les communautés bactériennes digestives des animaux, du fait de la grande diversité et la densité phénoménale de bactéries dans un environnement confiné qui favorisent les échanges horizontaux de matériel génétique conférant une résistance. Les bactéries échappant à leur mécanisme d'action sont favorisées, et un effondrement des populations sensibles s'observe rapidement. Le microbiote digestif est ainsi un lieu d'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, notamment au sein des populations d'*E. coli*. Les populations de bactéries résistantes peuvent se stabiliser après l'arrêt d'un traitement antibiotique, devenant aussi adaptées à leur environnement que les souches sensibles, via l'apparition de mutations compensatoires, ou l'acquisition de gènes conférant un avantage adaptatif dans cet environnement. La colonisation du tube digestif par des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques peut également avoir lieu en absence de traitement antibiotique.

Le caractère à la fois commensal et pathogène d'*E. coli*, associé à sa grande plasticité génomique en font une espèce centrale dans l'émergence de la résistance aux antibiotiques au sein des communautés bactériennes digestives, les plus inquiétantes étant les souches d'*E. coli* fécales productrices de BLSE. Les gènes CTX-M représentent la majorité des gènes présents dans les *E. coli* producteurs de BLSE en situation commensale.

Dans la filière bovine, le portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE au sein des flores fécales est fréquent et élevé chez les veaux. Il en résulte une prévalence de souches pathogènes productrices de BLSE supérieure chez les veaux par rapport aux bovins adultes. Ce constat est tout aussi alarmant dans la filière du veau de boucherie, où la présence de souches productrices de BLSE multi-résistantes rend l'usage d'antibiotiques autres que les β -lactamines un facteur de risque de l'émergence et la dissémination des souches productrices de BLSE.

III. Modélisation des données longitudinales : les modèles linéaires à effets mixtes

Modéliser l'évolution d'un phénomène permet de décrire, de fournir le résumé quantitatif d'un profil moyen en fonction du temps, avec un nombre limité de paramètres. Grâce à ce modèle, nous pouvons prédire le comportement des données en réponse à différentes conditions exercées, et émettre des hypothèses sur les mécanismes à l'origine du phénomène étudié.

1. Caractéristiques des données longitudinales

Les données longitudinales sont des données mesurées de façon répétée dans le temps chez un même individu ou groupe d'individus. Ces données sont plus complexes que des données uniques par individu, que ce soit au niveau de leur collecte ou de leur structure. On peut avoir des données manquantes à certains points de temps, mesurées à des dates différentes entre les sujets, et des intervalles qui varient entre les mesures. De plus, les mesures faites au sein d'un même individu auront tendance à être corrélées positivement (l'effet spécifique d'un individu se répétant sur toutes ses mesures). L'objectif des études longitudinales est d'estimer de façon non biaisée un profil moyen d'évolution, les effets de covariables, et la variabilité de ce profil dans la population. Ces particularités doivent donc être prises en compte pour éviter des biais d'estimation.

Plusieurs méthodes pourraient servir à contourner ces écueils. La plus simple serait de réaliser des comparaisons transversales successives des données collectées à chaque date (ou âge) à l'aide de tests simples, chaque individu ne contribuant qu'à une seule mesure. Cependant, on n'aurait la comparaison entre les groupes d'individus qu'à des dates précises, et aucune information concrète sur le profil « typique » au cours du temps ni sa variabilité dans la population. Une régression linéaire classique qui consiste à ajuster le modèle sur l'ensemble des données en oubliant les provenances individuelles n'est pas adapté non plus car elle ne prend pas en compte les corrélations au sein d'un même sujet ou groupe. Une autre manière de contourner ces difficultés serait le recours aux approches ANOVA, comme une ANOVA en mesures répétées. Malheureusement, ces méthodes ne traitent pas les données manquantes ou espacées de manière irrégulière dans le temps. Il est nécessaire que les

données soient complètes et dans un schéma équilibré. De plus, ces méthodes se concentrent sur la comparaison des moyennes entre les groupes et ne nous fournissent aucune information sur les tendances spécifiques de chaque sujet dans le temps. Si on ne s'intéressait qu'au profil spécifique des sujets, une approche pourrait consister à estimer les paramètres individuels en réalisant une régression sujet par sujet, puis faire un résumé statistique et conduire des tests sur les estimations. Cependant, la moyenne et la variance des paramètres dans la population seraient alors estimées à partir des estimations des paramètres individuels, sans tenir compte de leur erreur d'estimation, conduisant ainsi à une surestimation de leur variabilité. Cette approche nécessite un protocole qui soit suffisamment équilibré entre les individus, sans compter le côté fastidieux dès que le nombre de sujets devient grand.

Des outils et des méthodes dédiés aux données longitudinales sont donc nécessaires. La modélisation statistique à effets mixtes résout ces problèmes, en estimant les caractéristiques de la population, c'est-à-dire le profil moyen dans la population, et la variabilité inter-individuelle des paramètres.

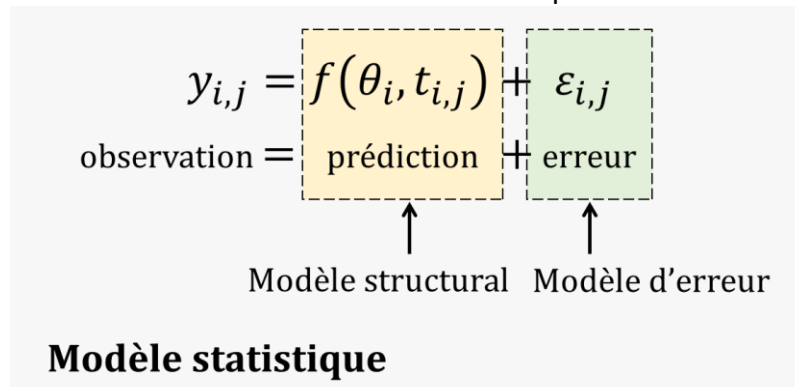
2. Composantes du modèle linéaire à effets mixtes

a. Structure générale

Avec l'introduction de l'analyse de variance dans le paysage des statistiques par Ronald Fisher en 1921, il devient possible d'étudier l'effet d'une variable aléatoire catégorielle sur la distribution d'une variable aléatoire numérique en comparant les moyennes de cette variable entre les niveaux de la variable catégorielle. La notion d'effet aléatoire est décrite pour la première fois en 1947, quand Churchill Eisenhart, dans le cadre de l'analyse de variance, explique qu'une variable catégorielle explicative peut avoir deux types d'effets sur la distribution de valeurs numériques et utilise les termes d' « effet fixe » et d' « effet aléatoire » (164). Il considère que les individus constituent des échantillons aléatoires issus d'une population de grande taille, et que, par l'aléa qu'ils représentent, ils introduisent une variabilité dans les données observées. On est donc moins intéressé par la comparaison des moyennes spécifiques de chaque individu que par la variabilité qu'il existe entre eux au sein d'un échantillon. Les modèles à effets mixtes, ou modèles mixtes, sont ainsi nommés car les variables utilisées pour expliquer les données observées sont un mélange d'effets fixes et d'effets aléatoires (165). Les effets fixes influencent la moyenne de la variable à expliquer. Les effets aléatoires décrivent sa variabilité.

La structure générale des modèles mixtes est la suivante :

Figure 4. Construction de la modélisation statistique à effets mixtes.

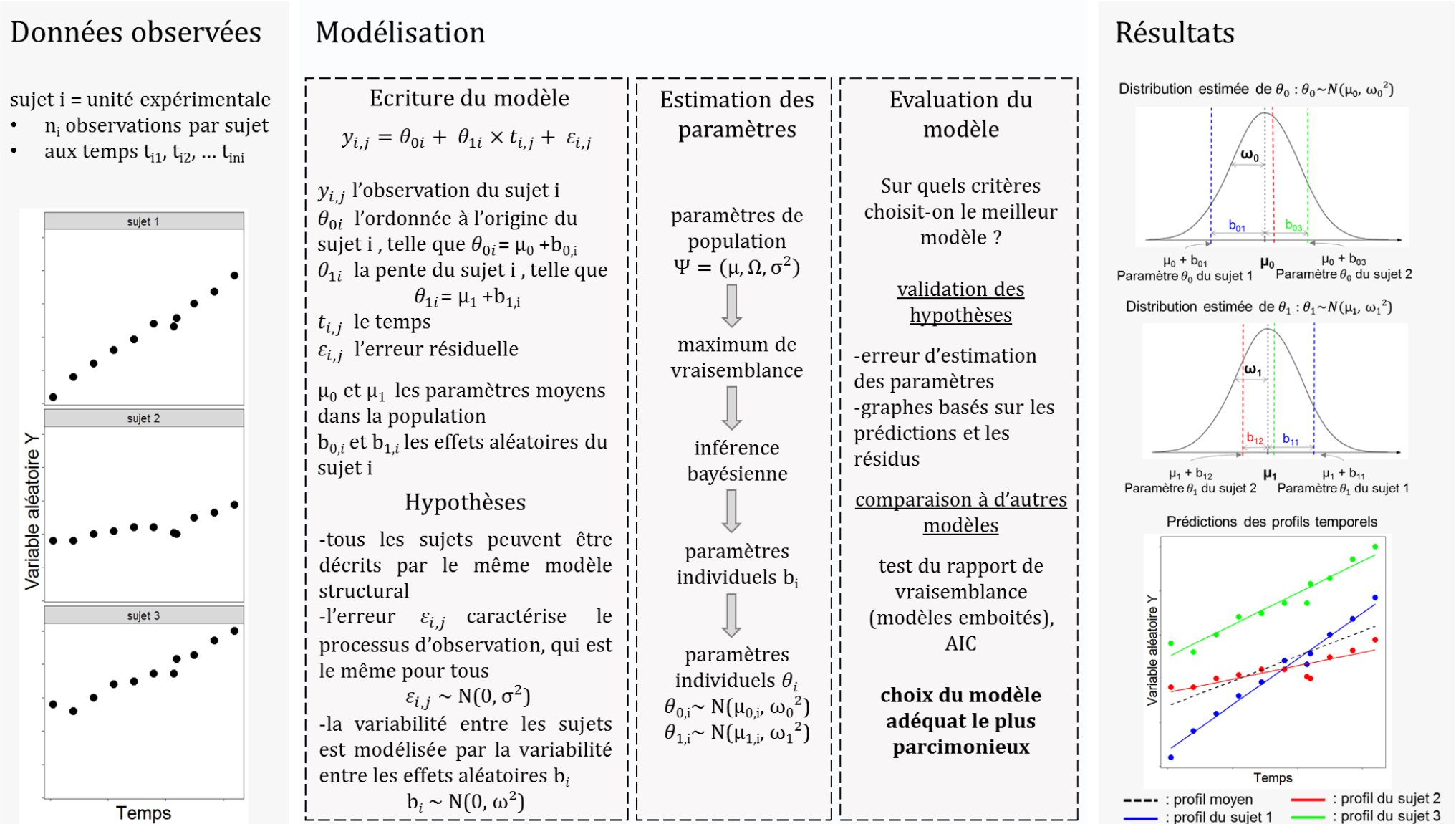


Dans la Figure 4, $y_{i,j}$ est l'observation pour le sujet i au temps t_{ij} , f est le modèle structural, qui permet de décrire l'évolution de la réponse y au cours du temps, θ_i est le vecteur des paramètres individuels, regroupant les effets fixes et les effets aléatoires, ϵ_{ij} est le terme d'erreur associé à l'observation $y_{i,j}$.

Chaque paramètre individuel θ_i peut être décomposé en une partie fixe μ , qui représente la valeur moyenne du paramètre dans la population, et en une partie aléatoire spécifique de chaque sujet et qui permet de quantifier l'écart du sujet par rapport au comportement typique de la population (166). Elle est notée b_i , $b_i \sim N(0, \Omega)$, où Ω est la matrice de variance-covariance. A l'échelle de la population, la variabilité entre les sujets est modélisée par la variabilité des paramètres. Les paramètres du modèle structural sont considérés comme des variables aléatoires et on s'intéresse donc à leur distribution dans la population. Les effets fixes représentent leur moyenne et les effets aléatoires leur variance dans la population.

Les composantes du modèle et les différentes étapes d'une modélisation, détaillées dans les paragraphes suivants, sont illustrées à travers l'exemple d'un modèle linéaire simple présenté dans la Figure 5.

Figure 5. Exemple de modélisation de données longitudinales à l'aide d'un modèle linéaire simple à effets mixtes. Le terme « AIC » désigne le critère d'information d'Akaike.



b. Modèle mathématique structural

Le modèle mathématique structural, ou fonction f , caractérise le processus biologique. Dans un modèle linéaire, f s'exprime comme une combinaison de paramètres pouvant s'écrire par exemple sous forme linéaire simple :

Équation 1. Modèle mathématique structural d'un modèle linéaire simple

$$\begin{aligned} f(\theta_i, t_{i,j}) &= \theta_{0i} + \theta_{1i} \times t_{i,j} \\ \theta_i &= (\theta_{0i}, \theta_{1i})^T \end{aligned}$$

Le vecteur des paramètres θ_i pour le sujet i varie d'un individu à l'autre dans la population. On peut chercher à améliorer l'adéquation de f aux données à l'aide d'un modèle linéaire plus complexe, en associant le temps à tous les degrés polynomiaux de 1 à k (où k est un entier naturel), mais dont la liaison avec le processus biologique reste linéaire. Dans une régression polynomiale, le coefficient du monôme de temps de degré l pour le sujet i serait $\theta_{l,i}$.

Il est parfois nécessaire d'introduire dans le modèle structural des covariables spécifiques du sujet (le poids, l'âge, ou le sexe par exemple) ou de l'étude (le groupe, le centre d'étude), connues pour avoir une influence sur le phénomène biologique que l'on cherche à modéliser. En d'autres termes, on inclut dans le vecteur des effets fixes μ des termes représentant l'influence des covariables sur ces paramètres. On compare ainsi des groupes d'individus au travers de leur effet sur les paramètres, ce qui nous permet de caractériser une part de la variabilité inter-individuelle en l'expliquant. Ces covariables peuvent également nous permettre d'introduire des facteurs dont l'effet sur les paramètres n'est pas connu et que l'on souhaite évaluer.

c. Modèle de l'erreur de mesure

Les erreurs résiduelles quantifient l'écart entre les données observées et les valeurs prédites par le modèle structural. Elles sont dues aux erreurs de mesures, aux erreurs de renseignement (temps de collecte, mesures imprécises) et la variabilité inter-occasion.

Les erreurs résiduelles sont supposées indépendantes et supposées suivre une distribution normale, de moyenne nulle et de variance σ^2 . La variance de l'erreur est supposée indépendante du niveau de y et constante quelle que soit la prédiction.

d. Hypothèses

Plusieurs hypothèses sont faites sur les différentes composantes de ce modèle (165) :

- tous les sujets peuvent être décrits par le même modèle structural, construit à partir d'hypothèses basées sur les connaissances du phénomène que l'on cherche à modéliser ou sur l'allure de la courbe,
- les paramètres du modèle sont supposés suivre une loi normale. Il faut alors déterminer leur moyenne et leur variance,
- les effets aléatoires sont supposés indépendants entre les sujets et indépendants des erreurs résiduelles.

3. Estimation des paramètres du modèle

On considère le vecteur des paramètres Ψ tel que $\Psi = (\mu, \Omega, \sigma^2)$, où μ représente les paramètres moyens dans la population, Ω est la matrice de variance-covariance des effets aléatoires, et σ^2 la variance de l'erreur résiduelle. L'étape d'estimation consiste à trouver les valeurs du vecteur de paramètres Ψ telles que les valeurs prédites par le modèle soient les plus proches possibles des valeurs observées, et donc les plus vraisemblables.

Une des méthodes d'estimation les plus courantes est l'estimation par maximum de vraisemblance. La vraisemblance d'une distribution observée est le produit des probabilités d'observer les valeurs sous une certaine loi hypothétique. Cette vraisemblance varie en fonction des paramètres de la loi en question. Plus elle est grande, et plus l'adéquation du modèle aux données observées est bonne. On cherche donc à déterminer les valeurs des paramètres de Ψ pour lesquelles la fonction de vraisemblance est maximale. Pour cela, un des algorithmes utilisés est l'algorithme « espérance-maximisation » (« Expectation-Maximization algorithm », « EM algorithm»). Cet algorithme est itératif et opère en deux étapes : dans un premier temps, la phase « espérance » où a lieu le calcul de la vraisemblance en tenant compte des valeurs observées ; dans un second temps, la phase « maximisation », où le maximum de vraisemblance des paramètres est estimé en maximisant la vraisemblance trouvée lors de l'étape précédente. Les valeurs obtenues à la fin de cette phase sont reprises comme point de départ d'une nouvelle phase « espérance » jusqu'à ce que l'algorithme converge. Cet algorithme est notamment implémenté dans la librairie « nlme » (167) dans le logiciel R (168).

On utilise une approche bayésienne pour estimer la partie aléatoire b_i des paramètres (165). Cette approche est empirique car on utilise la distribution des paramètres de population estimée par maximum de vraisemblance comme distribution *a priori*. Les valeurs observées pour chaque sujet sont utilisées afin d'estimer la distribution *a posteriori* des paramètres θ_i (tel que $\theta_i = \mu + b_i$) chez le sujet considéré. Les paramètres individuels représentent le mode ou la moyenne *a posteriori* de la distribution.

Le profil temporel « moyen » s'obtient en appliquant uniquement la partie fixe des paramètres estimés du modèle structurel (soit μ , Figure 5). Les profils temporels individuels s'obtiennent en appliquant la partie fixe et la partie aléatoire des paramètres estimés (soit $\mu + b_i$, Figure 5).

4. Evaluation du modèle

De nombreuses hypothèses ont été postulées au cours du développement du modèle, qu'il s'agisse du choix du modèle structural, du modèle de variabilité ou du modèle de l'erreur résiduelle. Ces hypothèses doivent être évaluées et validées avant de pouvoir interpréter les résultats. Différents critères numériques et graphiques sont utilisés pour l'évaluation (166). L'erreur standard, associée à l'estimation de chaque paramètre du modèle, quantifie la précision de cette estimation. Un des résultats mesurant la précision d'estimation généralement reporté est l'intervalle de confiance à 95%. Une faible précision d'estimation, qui se traduit par une erreur standard élevée, est due à un manque d'information, c'est-à-dire à un manque de données, pour estimer correctement un 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. Il n'existe pas de test formel pour savoir si un paramètre est bien estimé, cependant, on considère qu'un intervalle de confiance ne contenant pas zéro est le signe d'une estimation correcte.

L'évaluation graphique des modèles comprend des évaluations basées sur les prédictions et d'autres basées sur les résidus. L'examen de ces graphiques dits « diagnostics » permet d'examiner les déficiences du modèle, et de donner des indications sur la façon de l'améliorer. Les diagnostics graphiques les plus simples sont basés sur la comparaison des observations aux prédictions du modèle. De la même manière, les graphiques des résidus en fonction du temps ou des prédictions individuelles permettent de détecter des anomalies de modèle structural ou de modèle d'erreur résiduelle. Les résidus représentant des aléas, on s'attend à une dispersion des résidus centrée sur zéro et homogène dans le temps ou sur l'ensemble du spectre des valeurs prédites. Le diagramme quantile-quantile permet de comparer la distribution des résidus avec celle d'une loi normale. Les résidus doivent s'aligner suffisamment sur les valeurs construites sous l'hypothèse que leur distribution est normale.

Afin de tester différentes hypothèses sur le phénomène d'intérêt, plusieurs modèles sont construits et évalués. Parmi ceux qui décrivent le mieux les données, il faut alors trouver le modèle le plus parcimonieux, c'est-à-dire qui compte le moins de paramètres. La sélection se fait avec le test du rapport de vraisemblance dans le cas de modèles emboîtés, c'est-à-dire,

quand l'un est un cas particulier de l'autre (retrait d'un paramètre ou de l'ajustement d'un paramètre par une covariable par exemple). Le test du rapport de vraisemblance consiste à calculer le logarithme du rapport entre la vraisemblance du modèle le plus simple et celle du modèle alternatif. La statistique du test correspond à l'opposé du double de cette valeur. Sous l'hypothèse nulle où le modèle le plus simple est le meilleur modèle, la probabilité d'observer cette statistique suit une loi du χ^2 dont le nombre de degrés de liberté est égal à la différence du nombre de paramètres entre les modèles. Une probabilité inférieure à 5% signifie que le modèle alternatif prédit significativement mieux les données observées que le modèle le plus simple.

D'autres critères existent pour choisir entre deux modèles non emboîtés, comme le critère d'information d'Akaike (AIC) ou le critère d'information bayésien (BIC) qui pénalisent l'ajout de paramètres et la taille de l'échantillon. L'AIC est égal à $2 \times k - 2\ln(L)$ où k est le nombre de paramètres du modèle, et L sa vraisemblance.

Le test de Wald est utilisé pour tester la valeur du paramètre dans la population d'origine, en se basant sur l'estimation dans l'échantillon. Dans le cas univarié, il consiste à calculer le rapport entre le carré du paramètre estimé et sa variance. Si la probabilité d'observer cette valeur sous une loi du χ^2 est inférieure à 5%, alors le paramètre est significativement différent de zéro.

Ainsi, les modèles mixtes permettent de quantifier l'évolution au cours du temps d'un phénomène biologique grâce à un nombre réduit de paramètres et leur distribution entre les individus.

IV. Description des questions scientifiques

On a encore du mal aujourd'hui à prévenir certaines épidémies graves dues à des *E. coli* pathogènes. A une échelle plus large, notre incapacité à limiter la dissémination des souches résistantes aux antibiotiques et du matériel génétique conférant une résistance rend les prévisions de santé publique alarmantes. Certains chercheurs estiment que le nombre de morts attribuables à la résistance aux antimicrobiens en 2050 atteindra le seuil de 10 millions (169). Le portage transitoire voire erratique des souches productrices de toxines de Shiga, et variable des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques rend le recours à des études longitudinales nécessaire pour bien estimer le risque sanitaire. On a donc un besoin urgent de comprendre les forces écologiques qui régissent le portage et le partage de ces souches d'intérêt pour la santé publique au sein des populations commensales d'*E. coli* dans leurs réservoirs bovins. Ces populations représentent une fraction minime du microbiote fécal des bovins, et dépendent des caractéristiques intrinsèques de leur hôte et de son environnement. Afin de mieux détecter les facteurs de risque liés au portage de ces souches, nous avons choisi de caractériser au mieux ces populations commensales en nous intéressant à :

- la part de variabilité attribuable à l'environnement des bovins. Pour cela, il est nécessaire d'étudier leur composition dans des systèmes de production différents. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux populations commensales de bovins adultes vivant en semi-liberté, et de veaux de boucherie industriels vivant en système clos. Les données sur les populations commensales d'*E. coli* chez ces derniers ont été générées mais restent encore à analyser. Ainsi, cette partie ne sera pas développée dans le présent manuscrit.

- la part des variabilités inter-individuelle et intra-individuelle, en comparant les populations d'*E. coli* de bovins vivants ensemble dans les mêmes conditions. C'est ce à quoi nous nous sommes intéressés dans le premier travail présenté. Nous avons suivi des bovins adultes pour lesquels l'impact des activités humaines sur leurs communautés bactériennes était aussi faible que possible, dans la mesure où le degré d'anthropisation d'un écosystème influence les communautés bactériennes des animaux. De plus, l'occupation de la niche nutritionnelle de l'espèce par les souches d'*E. coli* nécessite une adaptation permanente de ces dernières à l'écosystème digestif. Le temps de génération d'*E. coli* étant très court chez son hôte, il est nécessaire de caractériser la dynamique des clones à court terme. Dans ce

premier travail, l'objectif était de fournir une description approfondie des variations quotidiennes des populations fécales d'*E. coli* chez des bovins adultes exposés à une pression anthropique faible.

Le microbiote fécal est un lieu majeur d'émergence de la résistance. L'exposition des communautés bactériennes digestives aux antibiotiques a des conséquences sur leur composition, et favorise l'émergence et la persistance de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques, même après l'arrêt du traitement. Les veaux semblent jouer un rôle important de réservoir de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques. Leurs communautés bactériennes évoluent et se transforment avec l'âge de l'animal. Nous avons choisi le veau de boucherie industriel pour comprendre l'émergence et la sélection des souches résistantes aux antibiotiques au sein du microbiote intestinal, chez qui le portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE est avéré mais pour lequel nous manquons de données longitudinales. Nous nous sommes intéressés aux déterminants génétiques des souches productrices de BLSE circulantes dans ce système clos, et à l'implication des traitements antibiotiques dans :

- leur émergence dans un contexte de changements physiologiques des communautés bactériennes,
- le risque de dissémination au cours de la vie d'un veau en fonction de leur pouvoir de persistance et de diffusion au sein du troupeau,

Les objectifs des travaux présentés dans cette partie sont donc (i) de décrire les transformations à long terme du microbiote fécal du veau de boucherie dans les conditions réelles d'exposition aux antibiotiques et (ii) de caractériser les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés dans les fèces de veaux de boucherie et leur dynamique de portage sur toute la durée de l'engraissement.

Dans les différents travaux présentés, nous avons mené un suivi longitudinal des populations bactériennes étudiées. Du fait de l'arrivée constante de nouveaux micro-organismes de l'extérieur, et des interactions écologiques au sein des communautés et avec l'hôte, ces communautés peuvent être considérées comme des systèmes dynamiques ouverts. Nous avons caractérisé leur cinétique en utilisant des modèles statistiques à effets mixtes. Grâce à eux, nous pouvons estimer le profil moyen d'évolution au cours du temps des populations bactériennes, ainsi que la variabilité inter-individuelle des paramètres servant à décrire le phénomène étudié.

Études expérimentales

V. Dynamique quotidienne des populations commensales d'*E. coli* chez des bovins adultes

1. Résumé

A l'heure actuelle, les fluctuations des populations commensales d'*E. coli* chez les bovins domestiques en l'absence de toute perturbation de nature anthropique sont mal connues, et leur impact sur la présence et la persistance de souches d'intérêt pour la santé humaine reste à caractériser. Dans ce premier travail, l'objectif était de fournir une description approfondie des variations quotidiennes des populations fécales d'*E. coli* chez des bovins adultes exposés à une pression anthropique faible. L'étude s'est déroulée dans le village de Magoli, aux abords du parc national de Hwange au Zimbabwe. Dans cette zone, la production agricole est essentiellement une agriculture de subsistance basée sur la culture du maïs et du sorgho et l'élevage de bovins et de caprins. Les exploitations sont de petites tailles, avec une moyenne de cinq têtes par troupeau. Le bétail se déplace durant la journée sous la conduite d'un vacher pour trouver des pâtures sur lesquelles se nourrir, et rentre à la nuit tombée dans un enclos pour limiter les risques de prédation par la faune sauvage (Figure 6).

Figure 6. Troupeau de vaches de race Nguni rentrant après une journée de pâturage en liberté.



a. Matériel et méthodes

(i) Récolte des échantillons

Dans le cadre d'un projet collaboratif avec le docteur Alexandre Caron du Cirad, j'ai effectué une mission au Zimbabwe. J'y ai prélevé les fèces de quatre vaches domestiques de

race Nguni pendant 25 jours, tous les jours à la même heure (Figure 7). Nous avons choisi les vaches présentant le plus de similarités compte-tenu des conditions de terrain : elles appartenaient au même troupeau, avaient vêlé deux mois auparavant, et n'avaient pas reçu de traitement antibiotique durant les trois mois précédant l'étude. Trois vaches étaient âgées de quatre ans, la dernière avait 13 ans.

Figure 7. Les quatre vaches dont les populations fécales d'*E. coli* ont été suivies pendant 25 jours. Les vaches étaient désignées sous les numéros C765 (en haut à gauche), C767 (en haut à droite), C1403 (en bas à gauche) et C1458 (en bas à droite).



(ii) Comptages bactériens et isolement des souches d'*E. coli*

Nous avons estimé le nombre d'*E. coli* dans chaque échantillon par des séries de dilutions et étalements sur milieu sélectif des entérobactéries. Une colonie d'*E. coli* était prélevée au hasard pour chaque prélèvement. Puis, les comptages aux 2^{ème}, 15^{ème} et 25^{ème} jours ont été répétés quatre fois. Sur ces étalements supplémentaires, nous avons prélevé cinq colonies d'*E. coli* par boîte.

Résistance aux antibiotiques

Trois protocoles ont été mis en place pour étudier la résistance aux antibiotiques. Dans un premier temps, la sensibilité de chaque isolat à l'amoxicilline, au chloramphénicol, à la kanamycine, à la streptomycine, aux sulfamides, à la tétracycline et au triméthoprime a été testée à l'aide de la méthode de diffusion en gélose. Ces sept antibiotiques sont les plus fréquemment utilisés en médecine humaine et animale dans le district de Hwange (données personnelles suite à une prospection que nous avons réalisée dans les centres de soins et postes de santé vétérinaire durant la mission). Dans un second temps, nous avons recherché

la présence de souches résistantes aux pénicillines et à la tétracycline en étalant les fèces sur milieux sélectifs des entérobactéries contenant une pénicilline ou de la tétracycline. Enfin, nous avons recherché les déterminants génétiques de la résistance à la tétracycline, aux pénicillines et au triméthoprimé par PCR et séquençage.

(iii) *Phylogénie des souches d'E. coli isolées, sérotypage et recherche des gènes stx*

Nous avons établi une phylogénie entre les isolats en combinant trois méthodes de typage génétique à partir de leur ADN : tout d'abord, leur groupe phylogénétique a été identifié par PCR (170). Ensuite, nous avons déterminé l'allèle du gène *trpA* d'après la base de données de « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) de l'Institut Pasteur par séquençage Sanger. Enfin, nous avons réalisé une amplification aléatoire d'ADN polymorphe par PCR (« Random Amplified Polymorphic DNA » PCR, ou PCR RAPD), qui consiste en une amplification aléatoire de l'ADN génomique des souches, suivie d'une électrophorèse des fragments amplifiés, qui conduit à un profil propre à chaque génome.

Par ailleurs, nous avons recherché la présence des gènes caractéristiques des *E. coli* producteurs de toxines de Shiga *stx1*, *stx2* et *eae* et leurs sérogroupes principaux par PCR.

(iv) *Analyses statistiques*

Nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes pour décrire la dynamique des quantités d'*E. coli* au cours du temps. Nous avons testé des polynômes de temps de degrés 0 à 4 afin de détecter la présence d'une tendance dans l'évolution des quantités d'*E. coli*. Nous avons introduit comme covariable dans le modèle le nombre de cycles de congélation/décongélation qu'avaient subi les échantillons. Afin d'évaluer la trajectoire spécifique des quantités de chaque vache, un effet aléatoire de la vache sur l'ordonnée à l'origine et dans le temps a été introduit.

b. Résultats et discussion

(i) *Les populations d'E. coli sont multiclonaux et dominées par les groupes phylogénétiques A et B1*

Trois cent dix-neuf souches ont été isolées à partir de 98 échantillons. Les groupes phylogénétiques les plus fréquents étaient A et B1 (respectivement 48,9% [43,5 ; 54,4]_{IC95%} et 37,6% [32,5 ; 43,1]_{IC95%} des isolats). Parmi les 319 souches d'*E. coli*, nous avons distingué 32 clones. Sept, huit, neuf et onze clones ont été détectés chez chacune des vaches sur

l'ensemble de la période d'échantillonnage. Aux 2^{ème}, 15^{ème} et 25^{ème} jours, nous avons constaté que plusieurs clones cohabitaient au sein de chaque vache, et dont l'un était dominant, c'est-à-dire représentant plus de 50% des isolats de l'échantillon dans la plupart des cas.

(ii) *La composition des populations dépend de l'hôte mais l'expression de leur dynamique temporelle est similaire*

Seuls trois clones étaient partagés par deux vaches et aucun n'était partagé par trois ou quatre vaches. Par ailleurs, quelle que soit la vache considérée, aucun clone dominant aux 2^{ème}, 15^{ème} et 25^{ème} jours n'a été trouvé dominant sur l'ensemble de ces trois jours.

(iii) *Les clones résistants aux antibiotiques sont rares et sous-dominants*

Aucun des clones isolés sur milieu sans antibiotique ne présentait de résistances aux molécules testées. Des résistances à la tétracycline, aux pénicillines, et au triméthoprim ont été observées chez trois clones ayant poussé sur milieu contenant des antibiotiques. Ces clones ont été isolés chez deux vaches. Les gènes de résistance identifiés étaient *tet(A)*, et *tet(B)* pour la tétracycline, *bla_{TEM}* pour les pénicillines et *dfrA14* et *dfrA17* pour le triméthoprim. Leur isolement s'est fait de façon intermittente et toujours à des niveaux faibles (de l'ordre de 100 à 200 UFC/g). Deux des clones ont été isolés plusieurs fois, l'un trois fois sur une période de six jours, et l'autre trois fois sur une période de 13 jours.

L'absence de résistance chez les clones dominants et sous-dominants, la présence de clones résistants aux antibiotiques en faible nombre, à des niveaux faibles, et sur des périodes bien inférieures à la période d'échantillonnage illustrent la faible valeur sélective des clones résistants, cohérent avec l'absence de traitement antibiotique chez ces vaches et plus largement dans le troupeau.

(iv) *Les clones producteurs de toxines de Shiga sont répandus et capables de persister plusieurs semaines à bas niveaux*

Les gènes *stx1* et *stx2* ont été retrouvés chez cinq clones ayant poussé sur milieu ne contenant pas d'antibiotiques. Aucun ne présentait le gène *eae* et aucun des sérotypes classiques d'*E. coli* entérohémorragiques n'a été retrouvé. Toutes les vaches étaient porteuses d'au moins un clone producteur de toxines de Shiga. Ces clones ont été isolés de façon

intermittente sur des périodes allant d'un à vingt-quatre jours, et l'un d'eux était présent chez deux vaches le même jour.

Bien que rarement isolés et excrétés à des niveaux faibles, les clones producteurs de toxines Shiga étaient présents chez toutes les vaches et certains étaient capables de persister sur plusieurs semaines.

(v) *La taille des populations d'E. coli est stable au cours du temps*

Les quantités d'*E. coli* étaient différentes entre les vaches, avec une moyenne sur l'ensemble de la période allant de $10^{2,6}$ UFC/g pour la vache ayant la charge la plus faible, à $10^{4,6}$ UFC/g pour celle ayant la plus forte charge.

Le meilleur modèle décrivant les quantités observées d'*E. coli* ne comportait pas d'effet significatif du temps. Le seul effet retenu dans le modèle final était le nombre de cycles de congélations/décongélations, associé à une diminution significative de la quantité d'*E. coli*. Dans ce modèle, la quantité d'*E. coli* était estimée à $10^{3,84}$ UFC/g [3,06 ; 4,62]_{IC95%}. La variabilité observée entre les comptes d'*E. coli* était due principalement aux variations inter-individuelles.

c. Conclusion

Les résultats de ce travail ont permis dans un premier temps de confirmer qu'à un jour donné, les populations commensales d'*E. coli* de vaches sont des populations constituées de plusieurs clones appartenant principalement aux groupes phylogénétiques A et B1, avec un ou deux clones dominants. Dans un second temps, ils ont permis de montrer que la quantité d'*E. coli* chez le bovin adulte était constante d'un jour à l'autre en l'absence de perturbations du régime alimentaire ou de traitements antibiotiques. La diversité clonale de ces populations chez les vaches était spécifique de leur hôte, malgré certains traits communs dans leur dynamique et d'autres propres à chaque vache. On observe une succession de clones dominants au fil des jours, ce qui suggère des changements rapides dans les relations de dominance au sein de la flore. Ceci pourrait expliquer les profils individuels uniques et très dynamiques de ces populations bactériennes. Nous avons observé un portage intermittent et à bas niveaux des clones d'*E. coli* producteurs de toxines de Shiga ou résistants aux antibiotiques. Les fluctuations globales associées à la faible valeur sélective de ces clones d'intérêt chez des bovins d'un même troupeau pourraient diminuer la sensibilité des études


dont le but est la recherche d'associations épidémiologiques entre le portage de ces clones et certains facteurs environnementaux ou caractéristiques de l'hôte.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Applied and Environmental Microbiology* en 2017.

2. Article



Day-to-Day Dynamics of Commensal *Escherichia coli* in Zimbabwean Cows Evidence Temporal Fluctuations within a Host-Specific Population Structure

Ménil Massot,^a Camille Couffignal,^{a,b} Olivier Clermont,^a Camille D'Humières,^{a,c} Jérémie Chatel,^a Nicolas Plaut,^a Antoine Andremont,^{a,c}  Alexandre Caron,^{d,e} France Mentré,^{a,b} Erick Denamur^{a,f}

IAME, UMR 1137, INSERM, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France^a; AP-HP, Service de Biostatistique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France^b; AP-HP, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France^c; UPR AGIRs, Cirad, Montpellier, France^d; UPR AGIRs, Cirad RP-PCP, Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Mozambique^e; AP-HP, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France^f

ABSTRACT To get insights into the temporal pattern of commensal *Escherichia coli* populations, we sampled the feces of four healthy cows from the same herd in the Hwange District of Zimbabwe daily over 25 days. The cows had not received antibiotic treatment during the previous 3 months. We performed viable *E. coli* counts and characterized the 326 isolates originating from the 98 stool samples at a clonal level, screened them for *stx* and *eae* genes, and tested them for their antibiotic susceptibilities. We observed that *E. coli* counts and dominant clones were different among cows, and very few clones were shared. No clone was shared by three or four cows. Clone richness and evenness were not different between cows. Within each host, the variability in the *E. coli* count was evidenced between days, and no clone was found to be dominant during the entire sampling period, suggesting the existence of clonal interference. Dominant clones tended to persist longer than subdominant ones and were mainly from phylogenetic groups A and B1. Five *E. coli* clones were found to contain both the *stx*₁ and *stx*₂ genes, representing 6.3% of the studied isolates. All cows harbored at least one Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strain. Resistance to tetracycline, penicillins, trimethoprim, and sulfonamides was rare and observed in three clones that were shed at low levels in two cows. This study highlights the fact that the commensal *E. coli* population, including the STEC population, is host specific, is highly dynamic over a short time frame, and rarely carries antibiotic resistance determinants in the absence of antibiotic treatment.

IMPORTANCE The literature about the dynamics of commensal *Escherichia coli* populations is very scarce. Over 25 days, we followed the total *E. coli* counts daily and characterized the sampled clones in the feces of four cows from the same herd living in the Hwange District of Zimbabwe. This study deals with the day-to-day dynamics of both quantitative and qualitative aspects of *E. coli* commensal populations, with a focus on both Shiga toxin-producing *E. coli* and antibiotic-resistant *E. coli* strains. We show that the structure of these commensal populations was highly specific to the host, even though the cows ate and roamed together, and was highly dynamic between days. Such data are of importance to understand the ecological forces that drive the dynamics of the emergence of *E. coli* clones of particular interest within the gastrointestinal tract and their transmission between hosts.

KEYWORDS *Escherichia coli*, antibiotic resistance, cattle, commensal, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Received 20 March 2017 Accepted 11 April 2017

Accepted manuscript posted online 14 April 2017

Citation Massot M, Couffignal C, Clermont O, D'Humières C, Chatel J, Plaut N, Andremont A, Caron A, Mentré F, Denamur E. 2017. Day-to-day dynamics of commensal *Escherichia coli* in Zimbabwean cows evidence temporal fluctuations within a host-specific population structure. *Appl Environ Microbiol* 83:e00659-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00659-17>.

Editor Charles M. Dozois, INRS—Institut Armand-Frappier

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

Address correspondence to Erick Denamur, erick.denamur@inserm.fr.

The bacterium *Escherichia coli* has the noteworthy characteristic of being both a gut commensal of a broad range of vertebrates, making its habitat very large (1), and a versatile and ubiquitous pathogen (2). Whether it is a pathogen (3) or not (4), *E. coli* passes from one host to another and settles in a new host via the fecal-oral route, either directly or indirectly via the environment. Although pathogenic strains have been extensively investigated and tracked to prevent health issues, key features of the gut commensal populations from which they emerge remain to be investigated.

As an example, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) isolates are enteric pathogens in humans and are responsible for bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome, which is the most frequent cause of acute renal failure in children (5). STEC strains are primarily found in the gastrointestinal tract of ruminant animals, where they mainly live as commensals. Cattle feces are regarded as the main source of infection through the contamination of water or meat during the food chain process (6, 7). However, the high degree of variability in the prevalence, duration, and level of shedding among cattle herds prevents us from defining a proper risk of human exposure to STEC isolates (8, 9).

It has also been shown that gut commensal populations are implicated in the emergence and persistence of antibiotic-resistant pathogenic clones (10). When the gut microbiota is exposed to antibiotic molecules, resistant *E. coli* clones are selected (11). The rise in the incidence of carriage of these specific clones increases the resistance gene pool that may be transmitted to opportunistic pathogenic clones present in the gut.

Moreover, knowledge about commensal *E. coli* populations would be of particular interest to understand the epidemiology of pathogens that use the same routes as *E. coli*. It would help us to predict which pathways of transmission between host populations that these pathogens are most likely to use (12–14). Commensal *E. coli* strains are exchanged between hosts of the same or different species, and their exchange has already been regarded to be a proxy for pathogen dissemination (15, 16). The use of an indicator of pathogen transmission would be of great interest in some complex ecosystems where the high degree of ecological overlap between humans, domestic animals, and wild animals leads to a greater risk of interspecies pathogen spillover (17–19).

Nonetheless, the population structure of commensal *E. coli* isolates is driven by multiple factors, leading to different patterns among individuals between and within species (20). Furthermore, most of the few studies that have aimed to obtain an understanding of the temporal dynamics of *E. coli* populations show that a high degree of clonal diversity exists over years (21), months (22, 23), or weeks (24, 25). Combined with the already known intermittent nature of the shedding of STEC in cattle (9, 26), these studies highlight the fact that a precise description of the dynamic pattern at the clonal level requires shorter sampling intervals. Individual-level sources of heterogeneity need to be untangled in upstream studies of the shedding and transmission patterns of clones of interest, such as STEC or antibiotic-resistant clones. The purpose of this study was to provide an in-depth baseline depiction of the temporal fluctuations in the gastrointestinal populations of *E. coli* in domestic cattle living at a well-studied wildlife/livestock interface. We describe the daily variations, over a period of 25 days, in the total *E. coli* counts, the clonal diversity, and the population structure, with a focus on STEC and antibiotic-resistant *E. coli* strains, in cows living in a region where the antibiotic pressure is controlled and low.

RESULTS

The between-individual variability in *E. coli* counts was higher than the within-individual variability. We performed viable *E. coli* counts on the 98 fecal samples from 4 cows over 25 consecutive days (25 samples each from two cows, labeled cows C1 and C2, and 24 samples each from the two other cows, labeled cows C3 and C4). All four cows shed *E. coli* in their feces, and clones were detected on each day of the sampling period, except in the feces from cow C4 on day 17. The total mean *E. coli* count was 3.7

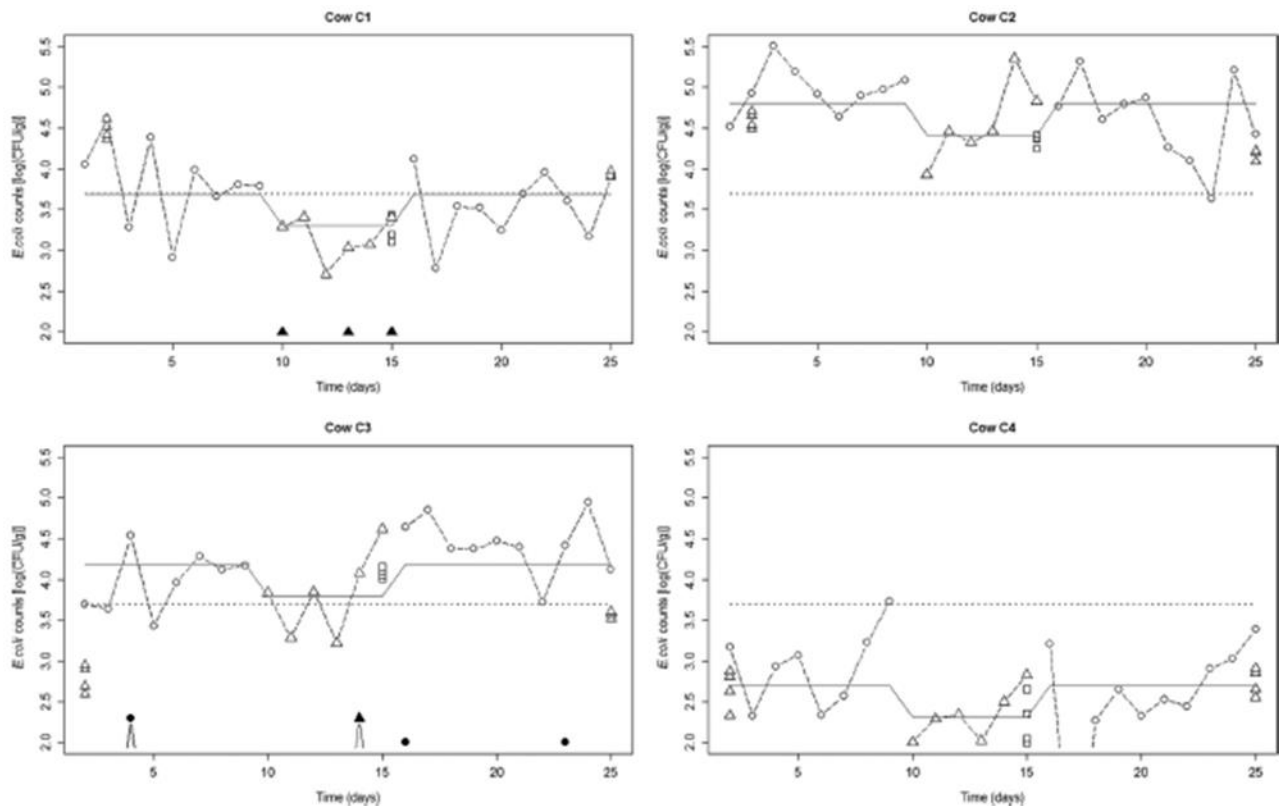


FIG 1 Plots of observed counts of commensal *E. coli* isolates in the four cows over a 25-day period, cow-specific predicted profiles, and counts of antibiotic-resistant *E. coli* clones. Each symbol represents the observed *E. coli* counts. Circles, triangles, and squares, one, two, and three freeze-thaw cycles, respectively. For each cow, the three dashed lines joining the symbols represent the three sets of observed viable *E. coli* counts made after the different freeze-thaw cycles. The drop in the counts between days 10 and 15 compared to that on the other days is due to the additional freeze-thaw cycle. White symbols, counts of total viable *E. coli* isolates; black symbols, counts of *E. coli* isolates resistant to tetracycline or penicillins; dotted lines, the overall mean of the total viable *E. coli* counts; continuous curves, cow-specific predicted profiles of shedding.

log CFU/g of feces. The mean *E. coli* counts for cows C4, C1, C3, and C2 were 2.6 log CFU/g, 3.7 log CFU/g, 3.9 log CFU/g, and 4.6 log CFU/g, respectively. The range of the *E. coli* counts ran from 2 log CFU/g to 5.5 log CFU/g (Fig. 1). Within the cows, the range was narrower. Indeed, for each of the four cows, the *E. coli* counts comprised a range of 2 log units.

Using a linear mixed-effects model, we assessed whether the *E. coli* counts changed over time and how they differed between hosts. No time trend was found during the sampling period. The number of freeze-thaw cycles that a sample underwent had a significant effect on *E. coli* counts (Table 1). *E. coli* counts were reduced by 0.39 log CFU/g (95% confidence interval [CI], $-0.51, -0.27$) (number of CFU per gram divided by 2.5; 95% CI, 1.9, 3.2) after 2 freeze-thaw cycles (samples from days 10 to 15 and restreaked samples from days 2 and 25). They were reduced by 0.78 log CFU/g (95% CI, $-0.99, -0.56$) (number of CFU per gram divided by 6.0; 95% CI, 3.6, 9.8) after 3 freeze-thaw cycles (restreaked samples from day 15).

On the basis of our model (Table 1), the between-individual and within-individual variability contributed to 69% and 28% of the total variability, respectively, with the residual variability being 3%. Therefore, there was more variation in *E. coli* counts between samples taken from different cows than among samples taken from the same animal. Thus, the cow host contributes more to the diversity of the *E. coli* counts than the day-to-day fluctuations within cows.

Commensal *E. coli* clones were specific to their host and fluctuated over the course of several days and weeks. (i) Characteristics of the clones detected. We randomly picked one *E. coli* isolate from all plated fecal samples and five isolates per

TABLE 1 Fixed and random estimated parameter values for the final linear mixed-effects model

Parameter	Estimate	95% CI ^a		P value
		Lower limit	Upper limit	
Fixed effects				
Intercept (no. of log CFU/g)	3.84	3.06	4.62	
Two freeze-thaw cycles (no. of log CFU/g)	-0.39	-0.51	-0.27	<10 ⁻¹⁶
Three freeze-thaw cycles (no. of log CFU/g)	-0.78	-0.99	-0.56	<10 ⁻¹⁶
SD of random effects (no. of log CFU/g)				
Cow level	0.78	0.38	1.58	
Time level	0.50	0.42	0.58	
Residual	0.17	0.14	0.21	

^aNormal approximation to the distribution of the maximum likelihood estimators.

plated fecal sample from days 2, 15, and 25 that had been restreaked four times. Of the 319 *E. coli* isolates, a total of 32 distinct clones were detected using a combination of quadruplex PCR phylogrouping, determination of the *trpA* allele, random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR, and detection of the *stx* and *eae* genes by PCR (see Table S1 in the supplemental material). Over the sampling period, 11, 8, 7, and 9 clones were detected in cow C1, cow C2, cow C3, and cow C4, respectively.

We detected all the main *E. coli* phylogenetic groups during the sampling, except for phylogenetic groups C and F. The phylogenetic groups most often recovered from among the isolates were phylogenetic groups A and B1 (48.9% and 37.6% of the isolates, respectively), followed by E (7.5%), B2 (4.4%), and D (1.6%). Of the 32 detected clones, 14 were assigned to phylogenetic group B1, 6 belonged to phylogenetic group A, 8 belonged to phylogenetic group E, 3 belonged to phylogenetic group B2, and 1 belonged to phylogenetic group D. In cow C1, 5 clones (45.5% of the clones) from 78 isolates belonged to phylogenetic group A and 4 clones (36.4%) from 5 isolates belonged to phylogenetic group B1. For cows C2, C3, and C4, the clones mainly belonged to phylogenetic groups B1 and E (50.0% and 25.0% of the clones for cow C2, respectively; 28.6% and 42.9% of the clones for cow C3, respectively; and 55.6% and 22.2% of the clones for cow C4, respectively). However, the only clones belonging to phylogenetic group A that were isolated from cows C3 and C4 were highly prevalent, as these clones were most often isolated from cow C3 (62.7% of the isolates) and were the second most often isolated from cow C4 (39.4% of the isolates) (Fig. S1).

(ii) The clonal compositions of the *E. coli* populations varied among cows. The dominant clone on days 2, 15, and 25 was different between cows. In cow C1, two clones belonging to phylogenetic group A were successively dominant on days 2 and 15 (90.0% and 65.0% of the isolates for the dominant clone on day 2 and the dominant clone on day 15 in this cow, respectively; Fig. S1). In cow C2, a clone belonging to phylogenetic group E and one belonging to phylogenetic group B1 were codominant on day 2 (45.0% and 30.0% of the isolates on day 2 in this cow, respectively). Then, the phylogenetic group B1 clone was found to be dominant on day 15 (60.0% of the isolates on day 15). On day 25, it was replaced by two other B1 clones that were codominant (35.0% and 30.0% of the isolates on day 25; Fig. S1). In cows C3 and C4, dominant B1 clones on day 2 (42.0% and 37.0% of the isolates for the codominant B1 clones in cow C3 and 56.0% of the isolates for the dominant clone in cow C4) were replaced by clones belonging to phylogenetic group A between days 2 and 15 (95.0% and 86.0% of the isolates on day 15 in cows C3 and C4, respectively).

We detected only three clones shared between cows. Cow C1 shared a clone belonging to the B2 phylogenetic group with cow C3 (clone B2-122-1) and a clone belonging to the B1 phylogenetic group with cow C2 (clone B1-1-1-*stx*) (Table S1 and Fig. S1). Clone A-185-1, which was found to be dominant in cow C4 at days 15 and 25, was also found in cow C1, but it was subdominant (4.7% of the isolates in cow C1) (Table S1 and Fig. S1). No clone was shared by three or four cows.

TABLE 2 Diversity measurements of *E. coli* clones within cows on days 2, 15, and 25

Cow	Shannon's index (H')				Pielou's evenness (J')			
	Day 2	Day 15	Day 25	Mean (SD)	Day 2	Day 15	Day 25	Mean (SD)
C1	0.39	0.86	1.16	0.80 (0.39)	0.36	0.78	0.65	0.60 (0.22)
C2	1.40	1.06	1.57	1.34 (0.26)	0.78	0.77	0.88	0.81 (0.06)
C3	1.18	0.20	0.71	0.70 (0.49)	0.85	0.29	0.51	0.55 (0.28)
C4	1.12	0.41	0.84	0.79 (0.36)	0.81	0.59	0.76	0.72 (0.12)

We calculated Shannon's index (H') and Pielou's evenness (J') for each sample on days 2, 15, and 25 to compare the clone richness and their distribution between cows (Table 2). Neither Shannon's index nor Pielou's evenness was found to be significantly different between cows ($P = 0.5$ when both Shannon's index and Pielou's evenness were corrected using the Benjamini and Hochberg method [27]). The clones were specific to their hosts, but clone richness and evenness were not significantly different between cows.

(iii) **The *E. coli* populations were highly dynamic over a few days.** Of the 25 clones detected on days 2, 15, and 25, 15 were persistent (Table S1). We found three persistent clones in cows C1, C3, and C4. Cow C2 had six persistent clones (Fig. 2). Among these 15 persistent clones, 10 were dominant on at least 1 day and belonged to phylogenetic groups A and B1. The five remaining clones were subdominant and belonged to phylogenetic groups A, B1, B2, D, and E. The mean prevalence was not high for all persistent clones. The maximum mean prevalence was 59.3% of the isolates on days 2, 15, and 25 for clone A-108-1 in cow C3, which was absent on day 2 but

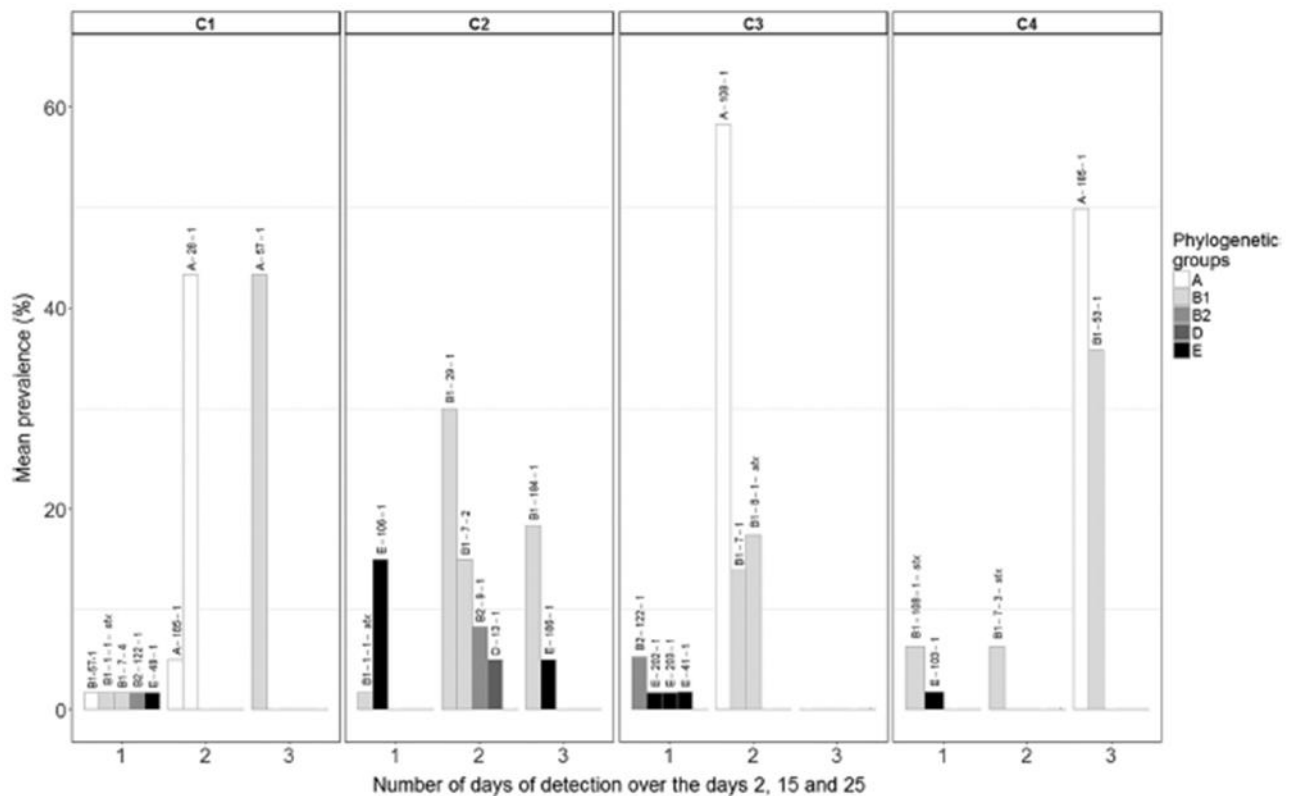


FIG 2 Mean prevalence of *E. coli* clones on sampling days 2, 15, and 25 according to the number of days of detection over these 3 days. Only the prevalences of clones that were detected at least once on these 3 days are represented. The clone nomenclature code was constructed as follow: XX-YYY-Z, where XX is the phylogenetic group, YYY is the *trpA* allele of the Pasteur Institute MLST database (67), and Z is the RAPD PCR pattern within each combination of phylogenetic group and *trpA* allele. When *stx*₁ and *stx*₂ genes were detected, the suffix *stx* was added to the clone nomenclature code. When the patterns differed by at least one genotyping technique, clones were considered to be different.

reached a prevalence of 95.0% and 80.0% of the isolates on days 15 and 25, respectively. The prevalence of the less abundant persistent clones was 5.0% of the isolates on days 2, 15, and 25 (clone A-185-1 in cow C1, clones D-13-1 and E-186-1 in cow C2; Fig. 2). This finding points out that the abundance of these clones undergoes fluctuations over intervals of several days. Indeed, no clone was found to be dominant within each cow during the entire study period. The prevalence of the most abundant clone on day 2 significantly changed over the resampling days in cows C1, C2, and C3 but not in cow C4 ($P = 4 \times 10^{-6}$, 7×10^{-5} , 1×10^{-3} , and 0.1, respectively, by Fisher's exact test with correction using the Benjamini and Hochberg method [27]; Fig. S1). For three of the four cows, the dominant clone on day 15 remained dominant on day 25 (clone A-28-1, clone A-108-1, and clone A-185-1 in cows C1, C3, and C4, respectively) but disappeared or was present at levels under the limit of detection for cow C2 (clone B1-29-1). Some of the subdominant clones were found to be persistent in cows C1 and C2 (one and three clones, respectively). We found transient clones in all cows (Fig. 2). Of the 13 transient clones, 12 were subdominant. They belonged to phylogenetic groups A, B1, B2, and E. Thus, the population of *E. coli* that persisted over a few days was multiclonal, was phylogenetically diverse, was dominated by clones belonging to phylogenetic groups A and B1, and changed substantially over several days.

We did not find any significant difference in Shannon's index and Pielou's evenness between days of sampling within cows ($P = 0.5$ and 0.8 , respectively, when the values were corrected using the Benjamini and Hochberg method [27]). Thus, the clone richness and evenness of the commensal *E. coli* populations were not significantly different over a period of 25 days within a given host.

STEC strains were widespread but not dominant. Both the *stx*₁ and *stx*₂ genes were found in five *E. coli* clones, representing 6.3% of all isolates. Four clones belonged to the B1 phylogenetic group and one clone belonged to the A phylogenetic group (Table S1). All cows harbored at least one STEC isolate. Four clones were subdominant, whereas the B1-8-1-*stx* clone was codominant with a non-STEC clone on day 2 in cow C3. Cows C1 and C4 excreted two distinct STEC clones (clones A-1-2-*stx* and B1-1-1-*stx* in cow C1 and clones B1-7-3-*stx* and B1-108-1-*stx* in cow C4). Two of the STEC clones were found to be persistent, as the B1-8-1-*stx* clone was found on day 2 and day 25 in cow C3 and the B1-7-3-*stx* clone was found on day 2 and day 15 in cow C4 (Fig. 2). The B1-1-1-*stx* clone was isolated on day 25 in both cows C1 and C2 (one isolate in cow C1 and two isolates in cow C2). All STEC isolates were *eae* negative, and none exhibited the classical enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O types.

Even though they were mainly rare and excreted at low levels, STEC isolates were present in all cows, and some were able to persist over a long period.

Antibiotic-resistant *E. coli* clones were detected at low levels. We detected very few *E. coli* clones resistant to tetracycline and penicillins in the 98 fecal samples plated on Drigalski agar containing tetracycline and ticarcillin, respectively. We found resistant clones in two cows, cows C1 and C3 (Fig. 1; Table S1). Only one clone resistant to tetracycline [due to the presence of the *tet(A)* gene] and penicillins (due to the presence of the *bla*_{TEM} gene) was found in the cow C1 on days 10, 13, and 15. It was a subdominant clone, as we found it to be present at a level that was at the limit of detection (2 log CFU/g) (Fig. 1), and it belonged to phylogenetic group E. This clone was also resistant to sulfonamides and trimethoprim (due to the presence of the *dfrA14* gene). We found two clones resistant to antibiotics in cow C3. One clone was resistant to tetracycline [due to the presence of the *tet(B)* gene], sulfonamides, and trimethoprim (due to the presence of the *dfrA17* gene) and was present at a level that was at the limit of detection. It belonged to phylogenetic group A (clone A-1-3-R, Table S1). We isolated this clone once, on day 23. The second clone was resistant to penicillins (due to the presence of the *bla*_{TEM} gene) and sulfonamides and was found in two isolates on both days 4 and 14 and in one isolate on day 16 (Fig. 1). It belonged to phylogenetic group D (clone D-11-1-R, Table S1; Fig. 1). All resistant clones were distinct from the other detected clones, which were susceptible to all the tested antibiotics.

Thus, despite the absence of antibiotic treatment in the herd in the previous 3 months, we detected resistant clones in two cows at a very low level. These clones were able to persist for at least a few days and harbored different molecular supports for resistance to tetracycline and trimethoprim (28).

DISCUSSION

Several studies have shown the existence of a temporal variability in the incidence of commensal *E. coli* populations at the year level (21), month level (23), or week level (25), mostly in humans but also in cattle and horses (29). This study followed on a daily basis and over a 25-day period the commensal *E. coli* populations of healthy adult cows in an extensive small-scale farming system with a focus on subpopulations of interest. This study (i) will allow the proposal of hypotheses for the basic mechanisms of *E. coli* adaptation as a commensal and its population dynamics between and within hosts and (ii) will serve as a basal reference of the normal temporal patterns and variability for later studies to interpret changes in clonal populations of interest, such as STEC and antibiotic-resistant clones or commensal *E. coli* populations, in the context of the identification of a transmission network.

The commensal *E. coli* population was host specific and highly dynamic. The most striking feature of our work was the important variability in the characteristics of the *E. coli* populations among cows. Despite the fact that we selected cows from the same herd and with high degrees of genetic and environmental similarity (e.g., the cows fed and drank from the same sources), the main source of variability for the *E. coli* counts was the between-individual variability, meaning that the *E. coli* population structure was host specific. For example, during the entire sampling period, cow C4 had very low *E. coli* counts, whereas cow C2 had almost twice as many *E. coli* organisms on a given day (Fig. 1). Moreover, very few clones were shared among the cows, with only 9% of the detected clones (3 of 32) being found to be shared, and none of the clones detected was found in all four cows.

However, we found several trends shared by the four cows: (i) the counts of *E. coli* were in the range of 10^2 to 10^6 CFU per g of feces, consistent with estimates of *E. coli* population sizes in cattle obtained by plating of fresh feces (30) or by PCR-based assays (31, 32); (ii) the phylogenetic groups recovered the most often were A and B1, which have been found to be associated with domestic cattle (28, 32, 33), and E, so the *E. coli* population pattern was close to that of the buffaloes living in the same area (28); (iii) the intestinal *E. coli* population of each cow was constituted of several persistent and transient clones, as previously described (34) (we also found that dominant clones persisted in the intestinal tract longer than subdominant clones [34]); and (iv) moreover, we observed switches of the dominant clones in all four cows during the sampling period. These shared trends suggest the existence of common mechanisms that control the ecological relationships among commensal *E. coli* populations.

Emergent dominant clones could be present in the gut at levels under the limit of detection for extended periods before they increase in abundance and are detected. Alternatively, they could be acquired exogenously and their number could rise quickly, as has been hypothesized in an experiment where healthy volunteers received ciprofloxacin for 14 days and quinolone-resistant *E. coli* emerged in their feces a few days after the end of the treatment (35). In agreement with our data (see Fig. S1 in the supplemental material), it has been shown in mice that the establishment of a dominant clone within the gut took a few days (36, 37), depending on its capacity to adapt its metabolism to the available carbon sources, which were mainly sugars (36, 38). The adaptation of a clone to its environment is driven by a combination of periodic selection and clonal interference, which is the competition of clones carrying different beneficial mutations at the population level (37, 39) and convergence and epistatic interactions at the genotype level (39, 40). Furthermore, a high level of polymorphism in the ability of the *E. coli* species to use carbon sources (41, 42) could explain the diversity of the observed clones. Other forces could be involved in the competition

between clones, such as the production of colicins and/or bacteriophages (42, 43) or resistance to grazing by protozoan predators, such as *Dictyostelium discoideum* (44).

Nonetheless, it should be remembered that the diversity and distribution of the *E. coli* genotypes are different among the different regions of the gastrointestinal tract, as environmental conditions are not the same in each of these regions (45–47). Thus, we cannot exclude the possibility that the clones detected were present in different parts of the gastrointestinal tract of their host, and their prevalence at days 2, 15, and 25 could have been the result of a bloom of a specific clone in a given fraction of the gastrointestinal tract.

STEC clones behave like other nondominant commensal clones. All cows shed STEC isolates but carried different clones and did not excrete them on the same days. These results highlight the intermittent and variable nature of STEC shedding and are in accordance with the findings in the literature dealing with STEC shedding in cattle (9, 26). The capacity of STEC strains to survive as subdominant clones in the intestinal environment could be the result of opposite pressures. Our results indicate that STEC clones do not have a better fitness than other clones for overgrowth of the gastrointestinal tract of cattle, as shown in mice (48). Nevertheless, STEC strains are able to occupy niches distinct from those of resident strains, which have a greater ability to metabolize glycolytic substrates, by exploiting other carbon sources, such as gluconeogenic substrates (48). Moreover, it has been shown that the presence of *stx* genes protects STEC clones against predation by grazing protozoa by enabling the survival of the clones in food vacuoles (49). Hence, the conjunction of these fitness advantages and disadvantages results in the presence of STEC clones at a low level but a high prevalence in cattle. Recently, Jones et al. characterized by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis and genome sequencing a set of O157:H7 isolates from a beef herd (50). They showed that four different lineages were present in the herd over a 9-month period and detected clonal replacement events over time and cross transmission between cows (50). Our results are in accordance with those of that study; however, no information on the prevalence of non-STEC clones was given.

***E. coli* antibiotic-resistant clones are rare and subdominant.** We focused our study mainly on tetracycline and ticarcillin, because tetracycline is the most commonly used antibiotic in cattle and penicillins are the most commonly used antibiotics in human medicine in Zimbabwe and because very few cases of antibiotic resistance were previously found in cattle from the same cattle herd from which the cows that we studied were obtained (28). We detected only three *E. coli* clones that were resistant to antibiotics, which is consistent with the absence of antibiotic treatment of these cows in previous weeks. Two of these clones were able to persist at a low level for several days. Nevertheless, they did not seem to be present in their host during the entire sampling period, meaning that their clearance was fast, as it has been shown that the clearance of resistant clones was slower for clones with a high relative abundance (10). Moreover, we did not observe the spread of antibiotic resistance genes between clones. Therefore, under such ecological conditions, the fitness cost of resistance did not seem to be compensated for by others mechanisms, such as fitness-compensatory mutations and genetic coselection (51), and, consequently, did not allow the transmission of antibiotic resistance support among clones and among hosts.

Concluding remarks. Our data, summarized in Fig. 3, which is based on the phylogenetic reconstruction of the *trpA* gene of the studied clones over time, highlight (i) the important phylogenetic diversity of commensal *E. coli* isolates within a cow at a sampling point and between cows from the same herd, (ii) the shedding of different clones on a given day, (iii) the maintenance of a few clones throughout the course of the sampling period, and (iv) the intermittent shedding of STEC and antibiotic-resistant clones. The intestinal *E. coli* microbiota is host specific and may result from two types of pressure: common pressures affecting all cows caused by factors that shape ecological niches, such as body mass, diet, and gastrointestinal tract morphology (1, 33), and pressures specific to each individual, which could be due to interactions within its

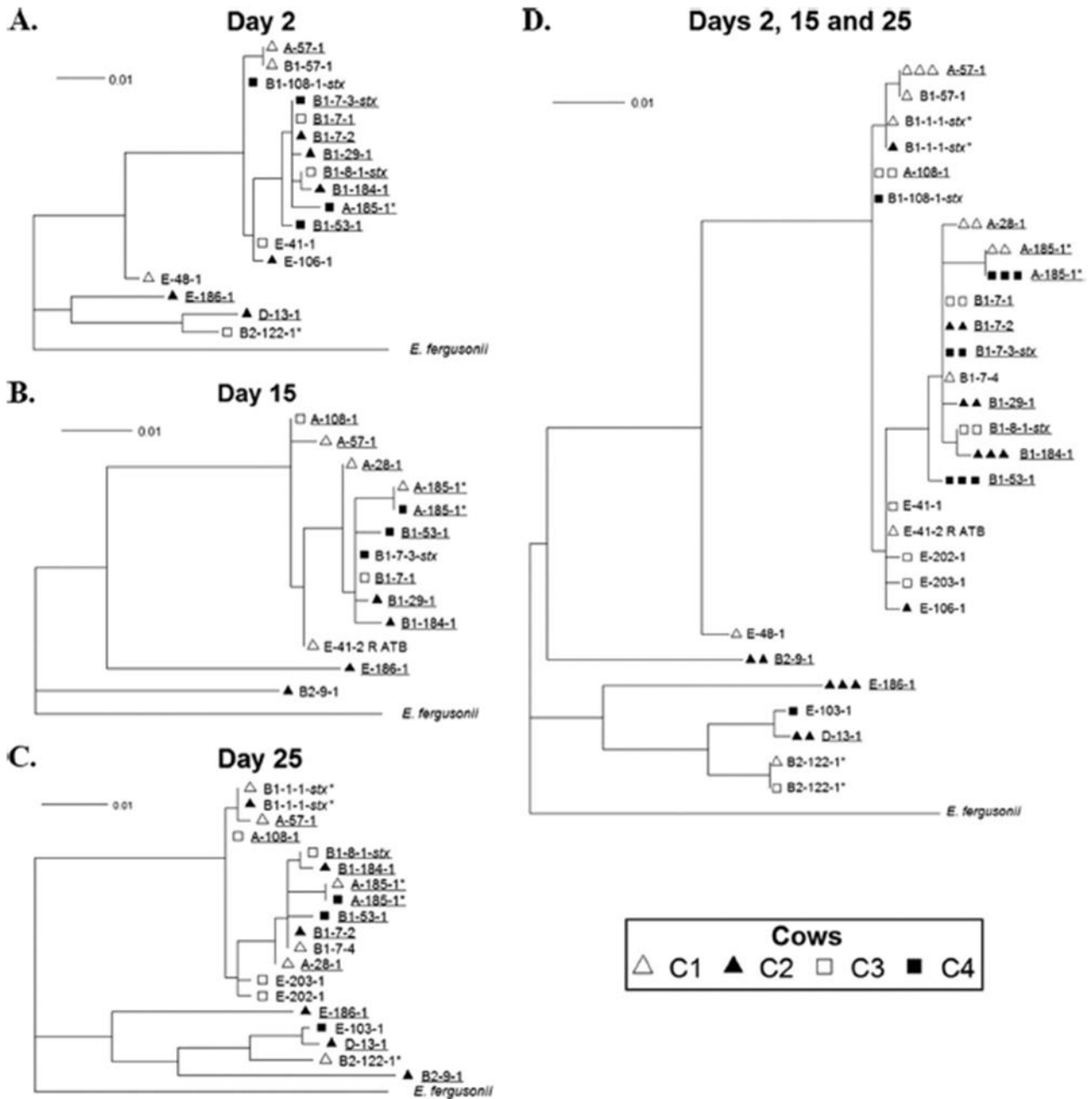


FIG 3 Phylogenetic trees of the *E. coli* clones isolated on days 2 (A), 15 (B), and 25 (C) and days 2, 15, and 25 (D) reconstructed from the sequences of the *trpA* gene by the PhyML program (73) and rooted on *Escherichia fergusonii*. For the clone nomenclature code, see the legend to Fig. 2. Persistent clones are underlined. The three shared clones A-185-1, B1-1-1-*strx*, and B2-122-1 are indicated with an asterisk. Antibiotic-resistant clone E-41-2, isolated on days 10, 13, and 15, is indicated on the phylogenetic trees in panels B and D by R ATB. On the tree in panel D, the number of symbols in front of each clone represents the number of times that it was isolated over the 3 days.

own microbiota (52) and with the host immune system (53), resulting in an *E. coli* population with a unique individual pattern at a given time point. The environment of the host may also have an impact on the observed fluctuations. Finally, STEC clones are submitted to the same ecological pressures as non-STEC clones. Such heterogeneity between individuals and over time should be taken into account in further studies that aim to use *E. coli* as a proxy for modeling the transmission network at a population level.

MATERIALS AND METHODS

Study design and experimental setting. (i) Study site and sample collection. The study was conducted in the Hwange District of Zimbabwe, Africa. The Hwange National Park and its periphery are part of the Kavango-Zambezi Transfrontier Conservation Area (KAZA TFCA) (54). In this area, diverse wild African ungulates run alongside (without any physical separation) communal land, where small-scale farmers raise livestock (55) in a semiarid ecosystem (average rainfall, 600 mm per year). Approval by the Governmental Veterinary Services of Zimbabwe was obtained for sampling animals within the ANR SAVARID project ANR-11-CEPS-003. Sample collection ran from 25 March 2014 to 18 April 2014, at the end of the rainy season. A protocol of daily sampling of four Nguni cattle, named cows C1, C2, C3, and C4, for the detection of *E. coli* was implemented for 25 days. We chose females from the same herd, comprising approximately 20 heads, that were genetically closely related and that had the highest similarities, considering the field conditions. No animal from the herd had received antibiotic treatment in the 3 months preceding the sampling period. All cows had calved 2 months before. Three of the four cows were 4 years old. Cow C1 was 13 years old. Two of the cows were related, with cow C4 being the aunt of cow C2. All four cows roamed daily and returned to the kraal (i.e., an enclosure located close to the homestead) before sunset, where they stayed overnight. Moreover, we tried to limit the variations that may have been introduced by the sampling protocol by implementing it each day at the same hour, immediately after the return of the herd to the kraal. The feces were obtained either directly from the rectum or from the ground immediately after defecation and loaded in 1 ml of a solution of brain heart infusion containing 20% glycerol. Tubes containing fecal samples were labeled with a unique identifying code and transported from the field to a tank containing liquid nitrogen in less than 2 h in the research camp, where they were kept at -180°C until shipment by plane in dry ice to the IAME laboratory, INSERM, in Paris, France, at the end of the sampling period.

(ii) Bacterial counts and isolation of *E. coli* strains. Fecal samples were stored at -80°C upon their arrival at the IAME laboratory. A volume of 200 μl of stool-containing suspensions was cultured on Drigalski agar plates at 37°C for 24 h for the isolation of *Enterobacteriaceae*. Samples from days 1 to 9 and days 16 to 25 underwent one freeze-thaw cycle before plating, whereas samples from days 10 to 15 underwent two freeze-thaw cycles. All *Enterobacteriaceae* with different morphotypes that grew were identified to the species level by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis (MALDI Biotyper; Microflex; Bruker). On the basis of the quantity of feces (1 mg) in each sample, we estimated the lower limit of detection of *E. coli* strains to be 10^2 CFU per gram of feces. The number of CFU per plate was determined, and a colony identified to be *E. coli* was randomly picked for further analyses. Then, all samples collected on days 2, 15, and 25 were restreaked on Drigalski agar plates four times, after an additional freeze-thaw cycle, to enhance the accuracy of bacterial counts. In order to study the clonal distribution, five *E. coli* isolates were randomly picked from each plate so that on each of the three days, 21 isolates were obtained from each cow. All *E. coli* isolates were stored at -80°C in a solution of 80% glycerol for further analyses. We assessed our ability to detect a minor clone, defined as a clone present at a frequency of 10% in the population of *E. coli* isolates (25) randomly selected on days 2, 15, and 25, by calculating the probability that at least one representative would be picked using the binomial formula $1 - (1 - p)^n$, where p is the frequency of the minor clone ($p = 0.10$) and n is the number of isolates picked (56). We estimated that the chance of detecting a minor clone on days 2, 15, and 25 was 88%.

(iii) Antibiotic resistance. Antibiotic resistance was studied both phenotypically and genotypically. First, global antibiotic resistance was analyzed by plating fecal samples on Drigalski agar plates containing 32 mg/liter ticarcillin, which was selective for penicillin-resistant isolates (57), and Drigalski agar plates containing 20 mg/liter tetracycline, which was selective for tetracycline-resistant isolates (58). The lower limit of detection was 10^2 CFU/g of feces. The species forming the colony was identified by MALDI-TOF mass spectrometry analysis and, when it was *E. coli*, was stored at -80°C for further analyses. Second, all the *E. coli* isolates were tested for susceptibility using the disk diffusion method according to the 2013 recommendations of the French Society for Microbiology (<http://www.sfm-microbiologie.org/>). Susceptibility to the following seven antimicrobial agents was tested: amoxicillin (25 μg), chloramphenicol (30 μg), kanamycin (30 IU), streptomycin (10 IU), trimethoprim (5 μg), sulfonamides (200 μg), and tetracycline (30 IU). Third, genetic determinants of tetracycline, penicillin, and trimethoprim resistance were determined by PCR assays. Detection of efflux pump-encoding genes [*tet(A)* to *tet(E)*] conferring tetracycline resistance was performed on the tetracycline-resistant *E. coli* isolates by using a multiplex PCR (59). Penicillin resistance was assessed by a PCR based-method (for the *bla_{TEM}* gene) on the penicillin-resistant *E. coli* isolates (60). Multiplex detection of the dihydrofolate reductase-encoding genes *dfrA1*, *dfrA5* and *dfrA14*, *dfrA7* and *dfrA17*, and *dfrA12* was performed on the trimethoprim-resistant *E. coli* isolates. Differentiation between the *dfrA5* and *dfrA14* genes, on the one hand, and the *dfrA7* and *dfrA17* genes, on the other hand, was performed by sequencing (28).

(iv) *E. coli* phylogenetic grouping, clone relatedness, and virulence gene and O typing. We attempted to determine the phylogeny between *E. coli* and *Escherichia* clade clones by combining three genotyping methods. First, all *E. coli* and *Escherichia* clade isolates were assigned to one of the seven main *E. coli* phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, and F) or to an *Escherichia* clade using the Clermont quadruplex PCR (61) and the PCR assay reported elsewhere (62). Second, we compared the nucleotide sequences of their *tpaA* genes (807 bp). We chose this housekeeping gene because its phylogeny is known to be congruent with the phylogeny of *E. coli* species (63). Nucleotide sequences were obtained by Sanger sequencing and aligned using BioEdit software (64). The quality of sequencing was assessed by visual inspection of the chromatograms. We compared the sequences to those in the multilocus sequence typing (MLST) database of the Pasteur Institute (Paris, France) (65) and assigned the sequence

to the corresponding allele in the database. Third, we performed random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR using primer 1254 (5'-CCGAGCCAA-3') (35) and compared the RAPD PCR profiles of clones belonging to the same phylogenetic group and having the same *trpA* sequence. Two clones were considered to have distinct RAPD PCR profiles when the number of RAPD band differences was two or more (66). We constructed a clone nomenclature code to characterize all the detected genotypes as follows: XX-YYY-Z, where XX is the phylogenetic group, YYY is the *trpA* allele of the Pasteur Institute MLST database (67), and Z is the RAPD PCR profile within each combination of phylogenetic group and *trpA* allele. When the patterns differed by at least one genotyping technique, clones were considered to be different. To confirm that we correctly discriminated the clones with our combined genotyping techniques, we sequenced the housekeeping gene *gnd* (1,335 bp) for two representative clones of each pattern (or one clone, when we isolated only a single clone) and compared the nucleotide sequences as described above for the *trpA* gene. The *gnd* gene is known to be the target of frequent recombination events (63, 68), rendering it a good marker to check for genetic divergence between related clones. In all cases, the *gnd* sequences confirmed the delineation of the clones (data not shown).

The *stx* and *eae* genes were detected by PCR (69). The main O types associated with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC; O26, O103, O104, O111, O157) were detected using a PCR-based approach (69, 70). When one of these genes was detected, the name of the gene was added to the clone nomenclature code.

Statistical analyses. (I) Bacterial counts. A linear mixed-effects model was used to assess whether the *E. coli* counts changed over time. The response variable was the decimal log-transformed *E. coli* counts. We used the following explanatory variables for the fixed effects: a polynomial function of time for the temporal characterization of the *E. coli* counts and the number of freeze-thaw cycles that a sample underwent before plating. The last variable was included in the model in order to take into account the repetition of heat shocks caused by freezing and thawing, which could bias the effect of the other explanatory variables. Cow-specific random intercepts (b_i) were included in the model, allowing variations between the log-transformed *E. coli* counts at the cow level. The day of sampling was assessed as a cow-specific random effect. The equation of the full model is presented below:

$$y_{i,j} = \sum_{k=0}^K \alpha_k \times t_{i,j}^k + \beta_c \times c_{i,j} + b_i + \kappa_{i,j} + e_{i,j}$$

where $y_{i,j}$ is the decimal log-transformed *E. coli* count for cow i on the j th day; α_k is the coefficient of the polynomial function of degree k ; $t_{i,j}$ is the j th day for cow i ; β_c is the coefficient associated with the fixed effect of the number of freeze-thaw cycles, with one freeze-thaw cycle being the reference; $c_{i,j}$ is the qualitative variable representing the number of freeze-thaw cycles of the sample from cow i on the j th day; b_i is the coefficient associated with the random effect of cow i ; $\kappa_{i,j}$ is the coefficient associated with the random effect of time on the j th day for cow i ; and $e_{i,j}$ is the residual error.

We assumed that the cow-level random effect, the time-level random effect, and the residual errors were independent and had a normal distribution with a mean of 0 and variances of σ_b^2 , σ_κ^2 , and σ_e^2 , respectively. Explanatory variables were selected using a backward approach and the Akaike information criterion (AIC), by starting with all candidate variables and testing the deletion of each variable one by one. We started with a quartic function of time to detect nonlinear trends ($K = 4$). The suppression of covariates was stopped when no further decrease of the AIC was obtained. Then, we confirmed the significance of our model terms using the Wald test for single fixed effects.

The between-individual variability was defined as the difference in the *E. coli* counts between cows. The percentage of the total variability attributable to the between-individual variability was expressed as $\sigma_b^2/\sigma_{\text{tot}}^2$, where σ_{tot}^2 is the total estimated variation, which was expressed as $\sigma_{\text{tot}}^2 = \sigma_b^2 + \sigma_\kappa^2 + \sigma_e^2$. The within-individual variability is defined as the change in the *E. coli* counts within each cow between measurements. The percentage of the total variability attributable to the within-individual variability was expressed as $\sigma_e^2/\sigma_{\text{tot}}^2$.

(II) Dominant *E. coli* clones and diversity indices. For a given sample collected on days 2, 15, and 25, we defined the dominant clone to be the one that was the most abundant with a proportion of greater than 50%, as adapted from a previous study (25). In the absence of a dominant clone, codominant clones were defined as the most abundant clones for which the sum of the proportions was greater than 50%. Subdominant clones were other clones detected in the sample. Within each cow, we considered the dominant clone on day 2 and compared its prevalence between days 2, 15, and 25 using Fisher's exact test. The four P values were adjusted using the Benjamini and Hochberg method (27), as we performed multiple comparisons. Significance was determined at a P value of <0.05 . To assess the persistence of the clones within their host, we defined persistent clones, based on the samples from days 2, 15, and 25, as clones detected in two or three samples. A transient clone was defined as a clone that was detected on 1 day (either the 2nd, the 15th, or the 25th day). Mean prevalences within each cow over days 2, 15, and 25 were calculated for the clones detected on these days.

For each cow, we also estimated diversity indices to assess the structure of the *E. coli* population in samples from days 2, 15, and 25. Two different but related indices were calculated: (i) Shannon's index (H'), which was calculated as

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \times \ln(p_i)$$

where p_i is the proportion of isolates found for the i th clone of a sample of s different clones (29, 71), and (ii) Pielou's evenness (J'), which was calculated as $J' = H'/\ln(s)$, where $\ln(s)$ is the maximum value of Shannon's index for the given community (72). It is interesting to use both of these indices, as these two

indices incorporate differently the richness and evenness of a community in one number. Shannon's index weighs heavily the clone richness of a sample by quantifying the uncertainty in predicting the clone identity of an individual that is taken at random from the sample, whereas Pielou's evenness measures the distribution of clones in a sample. Diversity indices were calculated separately for each cow on days 2, 15, and 25, and means for each cow were calculated by averaging the index for the 3 days. Shannon's indices were compared between cows by a one-way analysis of variance. One-way analysis of variance with repeated measures was used to compare Shannon's indices between days within cows. The same was done for Pielou's evenness. The four *P* values were adjusted using the Benjamini and Hochberg method (27).

All statistical analyses were performed using R software (R, version 3.0.2).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AEM.00659-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Bertrand Picard for helpful discussions and manuscript review and Lucie Brisson and Romain Fernandes for the technical help that they provided. We also thank the two anonymous reviewers for their helpful comments. We thank the ANR SAVARID (ANR-11-CEPS-003) project for supporting this study.

This study was implemented within the framework of the Research Platform Conservation and Production in Partnership (www.rp-pcp.org) and in collaboration with CNRS within the framework of the Zone Atelier in the Hwange area.

This work was supported in part by grants from La Fondation pour la Recherche Médicale to M.M. (thèse medico-scientifique, grant number FDM20150633309) and to E.D. (équipe FRM 2016, grant number DEQ20161136698).

REFERENCES

- Gordon DM, Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149:3575–3586. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>.
- Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8:26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>.
- Johnson JR, Clabots C, Kuskowski MA. 2008. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *J Clin Microbiol* 46:4078–4082. <https://doi.org/10.1128/JCM.00980-08>.
- Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Estoff EL, Chapman CA. 2008. Forest fragmentation as cause of bacterial transmission among nonhuman primates, humans, and livestock, Uganda. *Emerg Infect Dis* 14:1375–1382. <https://doi.org/10.3201/eid1409.071196>.
- Pennington H. 2010. *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376:1428–1435. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60963-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60963-4).
- Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E. 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect* 111:439–447. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057162>.
- Midgley J, Desmarchelier P. 2001. Pre-slaughter handling of cattle and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Lett Appl Microbiol* 32:307–311. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00912.x>.
- Lammers GAC, McConnel CS, Jordan D, Ayton MS, Morris S, Patterson EI, Ward MP, Heller J. 2015. Synchronization of *E. coli* O157 shedding in a grass-fed beef herd: a longitudinal study. *Epidemiol Infect* 143:3244–3255. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000588>.
- Lammers GAC, Jordan D, McConnel CS, Heller J. 2016. Daily shedding dynamics of *E. coli* O157 in an Australian grass-fed beef herd. *Epidemiol Infect* 144:2948–2955. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001588>.
- Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny P-H, El Mniai A, Bousadia Y, Goujon C, Ralaimazava P, Campa P, Girard P-M, Wyplosz B, Vittecoq D, Bouchaud O, Le Loup G, Pialoux G, Perrier M, Wieder I, Moussa N, Esposito-Farèse M, Hoffmann I, Coignard B, Lucet J-C, Andre-mont A, Matheron S. 2015. High rate of acquisition but short duration of carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after travel to the tropics. *Clin Infect Dis* 61:593–600. <https://doi.org/10.1093/cid/civ333>.
- Berge ACB, Epperson WB, Pritchard RH. 2005. Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. *Vet Res* 36:723–734. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005027>.
- Goldberg TL, Gillespie TR, Rwego IB, Wheeler E, Estoff EL, Chapman CA. 2007. Patterns of gastrointestinal bacterial exchange between chimpanzees and humans involved in research and tourism in western Uganda. *Biol Conserv* 135:511–517. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.10.048>.
- Rwego IB, Gillespie TR, Isabirye-Basuta G, Goldberg TL. 2008. High rates of *Escherichia coli* transmission between livestock and humans in rural Uganda. *J Clin Microbiol* 46:3187–3191. <https://doi.org/10.1128/JCM.00285-08>.
- van den Broek PJ, Bernards AT, van der Reijden TJ, van Strijen B, Dijkshoorn L. 2009. Can *Escherichia coli* be used as an indicator organism for transmission events in hospitals? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:169–173.
- VanderWaal KL, Atwill ER, Isbell LA, McCowan B. 2014. Quantifying microbe transmission networks for wild and domestic ungulates in Kenya. *Biol Conserv* 169:136–146. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.11.008>.
- VanderWaal KL, Atwill ER, Isbell LA, McCowan B. 2014. Linking social and pathogen transmission networks using microbial genetics in giraffe (*Giraffa camelopardalis*). *J Anim Ecol* 83:406–414. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12137>.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451:990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.
- Caron A, Morand S, de Garine-Wichatitsky M. 2012. Epidemiological interaction at the wildlife/livestock/human interface: can we anticipate emerging infectious diseases in their hotspots? A framework for understanding emerging infectious diseases processes in their hotspots, p 311–332. *In*

- Morand S, Beaudeau F, Cabaret J (ed), New frontiers of molecular epidemiology of infectious diseases. Springer, Dordrecht, Netherlands.
20. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8:207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>.
 21. Sears HJ, Brownlee I. 1952. Further observations on the persistence of individual strains of *Escherichia coli* in the intestinal tract of man. *J Bacteriol* 63:47–57.
 22. Jenkins MB, Hartel PG, Olexa TJ, Stuedemann JA. 2003. Putative temporal variability of *Escherichia coli* ribotypes from yearling steers. *J Environ Qual* 32:305–309. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.3050>.
 23. Blyton MDJ, Banks SC, Peakall R, Gordon DM. 2013. High temporal variability in commensal *Escherichia coli* strain communities of a herbivorous marsupial. *Environ Microbiol* 15:2162–2172. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12088>.
 24. Caugant DA, Levin BR, Selander RK. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics* 98:467–490.
 25. Schlager TA, Hendley JO, Bell AL, Whittam TS. 2002. Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect Immun* 70:1225–1229. <https://doi.org/10.1128/IAI70.3.1225-1229.2002>.
 26. Williams KJ, Ward MP, Dhungyel OP. 2015. Daily variations in *Escherichia coli* O157 shedding patterns in a cohort of dairy heifers at pasture. *Epidemiol Infect* 143:1388–1397. <https://doi.org/10.1017/S0950268814002374>.
 27. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol* 57:289–300.
 28. Mercat M, Clermont O, Massot M, Ruppe E, de Garine-Wichatitsky M, Miguel E, Valls Fox H, Cornelis D, Andremont A, Denamur E, Caron A. 2015. *Escherichia coli* population structure and antibiotic resistance at a buffalo/cattle interface in southern Africa. *Appl Environ Microbiol* 82:1459–1467. <https://doi.org/10.1128/AEM.03771-15>.
 29. Anderson MA, Whitlock JE, Harwood VJ. 2006. Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. *Appl Environ Microbiol* 72:6914–6922. <https://doi.org/10.1128/AEM.01029-06>.
 30. Sawant AA, Hegde NV, Straley BA, Donaldson SC, Love BC, Knabel SJ, Jayarao BM. 2007. Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 73:156–163. <https://doi.org/10.1128/AEM.01551-06>.
 31. Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré J, Corthier G. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 68:351–362. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x>.
 32. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David A, Daubié A-S, Hignard C, Loison O, Picard B, Denamur E. 2015. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *Microbiol Open* 4:604–615. <https://doi.org/10.1002/mbo3.266>.
 33. Escobar-Páramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D, Denamur E. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* 8:1975–1984. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x>.
 34. Sears HJ, Janes H, Saloum R, Brownlee I, Lamoreaux LF. 1956. Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in man and dog under varying conditions. *J Bacteriol* 71:370–372.
 35. de Lastours V, Cambau E, Guillard T, Marcade G, Chau F, Fantin B. 2012. Diversity of individual dynamic patterns of emergence of resistance to quinolones in *Escherichia coli* from the fecal flora of healthy volunteers exposed to ciprofloxacin. *J Infect Dis* 206:1399–1406. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis511>.
 36. Ozawa A, Freter R. 1964. Ecological mechanism controlling growth of *Escherichia coli* in continuous flow cultures and in the mouse intestine. *J Infect Dis* 114:235–242. <https://doi.org/10.1093/infdis/114.3.235>.
 37. Barroso-Batista J, Sousa A, Lourenço M, Bergman M-L, Sobral D, Demengeot J, Xavier KB, Gordo I. 2014. The first steps of adaptation of *Escherichia coli* to the gut are dominated by soft sweeps. *PLoS Genet* 10:e1004182. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004182>.
 38. Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS, Conway T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7427–7432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307888101>.
 39. Lourenço M, Ramiro RS, Güleresi D, Barroso-Batista J, Xavier KB, Gordo I, Sousa A. 2016. A mutational hotspot and strong selection contribute to the order of mutations selected for during *Escherichia coli* adaptation to the gut. *PLoS Genet* 12:e1006420. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006420>.
 40. Lescat M, Launay A, Ghalayini M, Magnan M, Glodt J, Pintard C, Dion S, Denamur E, Tenaillon O. 2017. Using long-term experimental evolution to uncover the patterns and determinants of molecular evolution of an *Escherichia coli* natural isolate in the streptomycin-treated mouse gut. *Mol Ecol* 26:1802–1817. <https://doi.org/10.1111/mec.13851>.
 41. Sabarly V, Bouvet O, Glodt J, Clermont O, Skurnik D, Diancourt L, de Vienne D, Denamur E, Dillmann C. 2011. The decoupling between genetic structure and metabolic phenotypes in *Escherichia coli* leads to continuous phenotypic diversity. *J Evol Biol* 24:1559–1571. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02287.x>.
 42. Bleibtreu A, Gros P-A, Laouénan C, Clermont O, Le Nagard H, Picard B, Tenaillon O, Denamur E. 2013. Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81:2733–2742. <https://doi.org/10.1128/IAI.01329-12>.
 43. Schamberger GP, Phillips RL, Jacobs JL, Diez-Gonzalez F. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Appl Environ Microbiol* 70:6053–6060. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6053-6060.2004>.
 44. Adiba S, Nizak C, van Baalen M, Denamur E, Depaulis F. 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* 5:e11882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.011882>.
 45. Schierack P, Römer A, Jores J, Kaspar H, Guenther S, Filter M, Eichberg J, Wieler LH. 2009. Isolation and characterization of intestinal *Escherichia coli* clones from wild boars in Germany. *Appl Environ Microbiol* 75:695–702. <https://doi.org/10.1128/AEM.01650-08>.
 46. Abraham S, Gordon DM, Chin J, Brouwers HJM, Njuguna P, Groves MD, Zhang R, Chapman TA. 2012. Molecular characterization of commensal *Escherichia coli* adapted to different compartments of the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 78:6799–6803. <https://doi.org/10.1128/AEM.01688-12>.
 47. Gordon DM, O'Brien CL, Pavli P. 2015. *Escherichia coli* diversity in the lower intestinal tract of humans. *Environ Microbiol Rep* 7:642–648. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12300>.
 48. Miranda RL, Conway T, Leatham MP, Chang DE, Norris WE, Allen JH, Stevenson SJ, Laux DC, Cohen PS. 2004. Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect Immun* 72:1666–1676. <https://doi.org/10.1128/IAI72.3.1666-1676.2004>.
 49. Steinberg KM, Levin BR. 2007. Grazing protozoa and the evolution of the *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding prophage. *Proc Biol Sci* 274:1921–1929. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0245>.
 50. Jones M, Octavia S, Lammers G, Heller J, Lan R. 27 January 2017. Population and evolutionary dynamics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in a beef herd: a longitudinal study. *Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13679>.
 51. Andersson DI, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8:260–271. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2319>.
 52. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. 2015. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science* 350:663–666. <https://doi.org/10.1126/science.1262602>.
 53. Franssen F, Zagato E, Mazzini E, Fosso B, Manzari C, El Aidy S, Chiavelli A, D'Erchia AM, Sethi MK, Pabst O, Marzano M, Moretti S, Romani L, Penna G, Pesole G, Rescigno M. 2015. BALB/c and C57BL/6 mice differ in polyreactive IgA abundance, which impacts the generation of antigen-specific IgA and microbiota diversity. *Immunity* 43:527–540. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.08.011>.
 54. Miguel E, Grosbois V, Caron A, Boulinière T, Fritz H, Cornelis D, Foggin C, Makaya PV, Tshabalala PT, de Garine-Wichatitsky M. 2013. Contacts and foot and mouth disease transmission from wild to domestic bovines in Africa. *Ecosphere* 4:1–32.
 55. de Garine-Wichatitsky M, Miguel E, Mukamuri B, Garine-Wichatitsky E, Wencelius J, Pfukenyi DM, Caron A. 2013. Coexisting with wildlife in transfrontier conservation areas in Zimbabwe: cattle owners' awareness of disease risks and perceptions of the role played by wildlife. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36:321–332. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.10.007>.
 56. Lautenbach E, Bilker WB, Tolomeo P, Maslow JN. 2008. Impact of diversity of colonizing strains on strategies for sampling *Escherichia coli* from

- fecal specimens. *J Clin Microbiol* 46:3094–3096. <https://doi.org/10.1128/JCM.00945-08>.
57. Grall N, Barraud O, Wieder I, Hua A, Perrier M, Babosan A, Gaschet M, Clermont O, Denamur E, Catzeflis F, Decré D, Ploy M-C, Andremont A. 2015. Lack of dissemination of acquired resistance to β -lactams in small wild mammals around an isolated village in the Amazonian forest. *Environ Microbiol Rep* 7:698–708. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12289>.
 58. Lester SC, del Pilar Pla M, Wang F, Perez Schael I, Jiang H, O'Brien TF. 1990. The carriage of *Escherichia coli* resistant to antimicrobial agents by healthy children in Boston, in Caracas, Venezuela, and in Qin Pu, China. *N Engl J Med* 323:285–289. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008023230501>.
 59. Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan AA, Steele R. 2006. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environ Microbiol* 72:6461–6466. <https://doi.org/10.1128/AEM.00271-06>.
 60. Pitout JDD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Coudron P, Sanders CC. 1998. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 42:596–600.
 61. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5:58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>.
 62. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ Microbiol* 13:2468–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x>.
 63. Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E. 1998. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol* 15:1685–1695. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025895>.
 64. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999:95–98.
 65. Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9:560. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>.
 66. Nielsen KL, Godfrey PA, Stegger M, Andersen PS, Feldgarden M, Fridt-Møller N. 2014. Selection of unique *Escherichia coli* clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD): evaluation by whole genome sequencing. *J Microbiol Methods* 103:101–103. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.018>.
 67. Clermont O, Gordon D, Denamur E. 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology* 161:980–988. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000063>.
 68. Bisercic M, Feutrier JY, Reeves PR. 1991. Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolates of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. *J Bacteriol* 173:3894–3900. <https://doi.org/10.1128/jb.173.12.3894-3900.1991>.
 69. Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, Glodt J, Picard B, Oswald E, Denamur E. 2011. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol* 11:654–662. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005>.
 70. Clermont O, Johnson JR, Menard M, Denamur E. 2007. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.007>.
 71. Mills AL, Wassel RA. 1980. Aspects of diversity measurement for microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 40:578–586.
 72. Pielou EC. 1966. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J Theor Biol* 10:370–383. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90133-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90133-0).
 73. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. 2005. PhyML online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:W557–W559. <https://doi.org/10.1093/nar/gki352>.

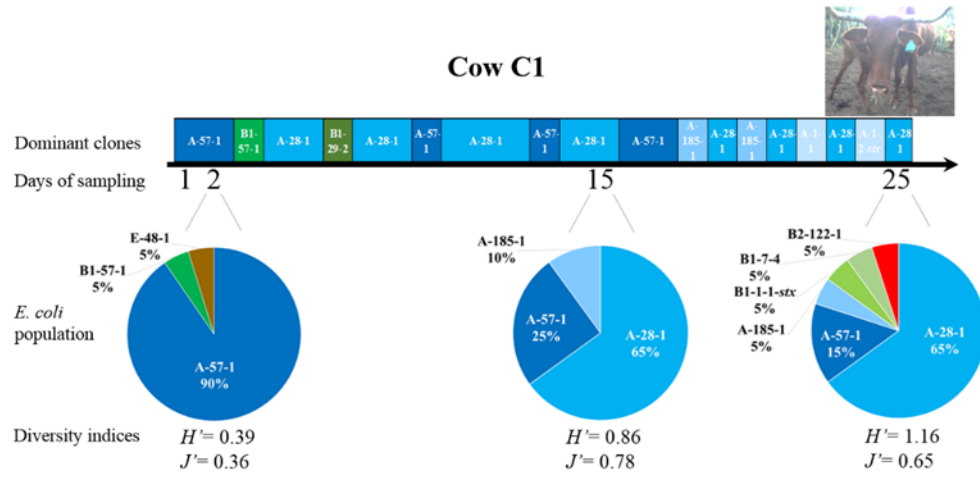
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Characteristics of the *E. coli* clones detected during the sampling period and their presence in the different cows. Clone nomenclature code is a combination of the phylogenetic group–*trpA* allele–RAPD PCR pattern. The suffix ‘R’ was added when at least one antibiotic resistance was observed. When *stx1* and *stx2* genes were detected, the suffix ‘*stx*’ was added to the clone nomenclature code.

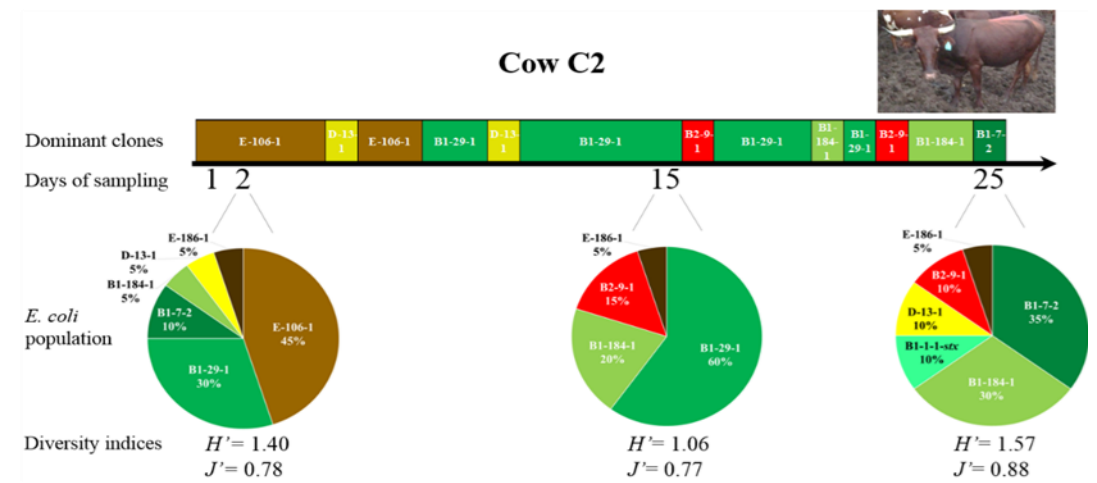
Fig. S1. Evolution of the dominant and subdominant *E. coli* clones over the sampling period in each cow. (A), (B), (C) and (D) represent the *E. coli* population dynamics in the cows C1, C2, C3 and C4, respectively. Clone nomenclature code is a combination of the phylogenetic group–*trpA* allele–RAPD PCR pattern. The suffix ‘R’ was added when at least one antibiotic resistance was observed. When *stx1* and *stx2* genes were detected, the suffix ‘*stx*’ was added to the clone nomenclature code. Clones belonging to the phylogenetic group A are colored in blue, B1 in green, B2 in red, D in yellow and E in brown. Clones in bands were determined from isolates picked after the first plating on Drigalski agar of all the samples. Each pie chart represents the distribution of the clones determined from 20 randomly picked isolates in a cow in a given day. Shannon’s index (H') and Pielou’s evenness (J') are indicated below pie charts. A picture of each cow is given in the top right corner of each figure.

Fig. S1

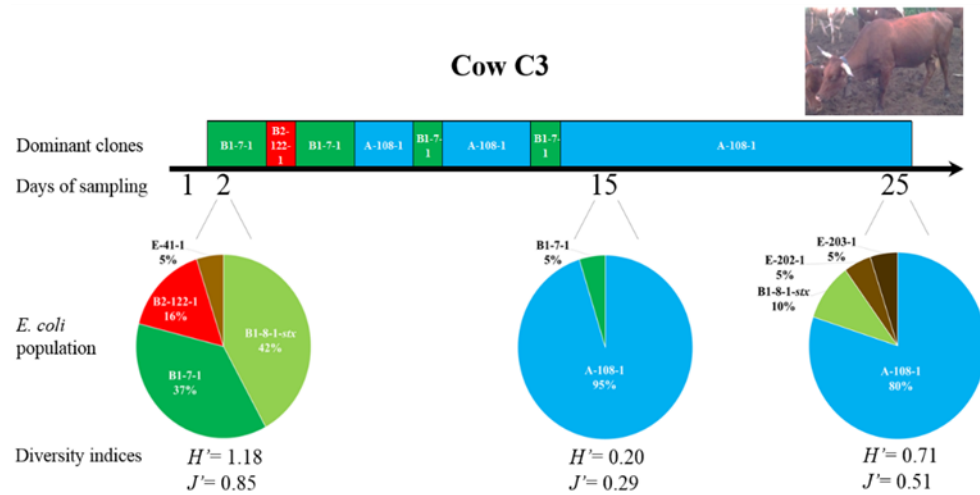
A.



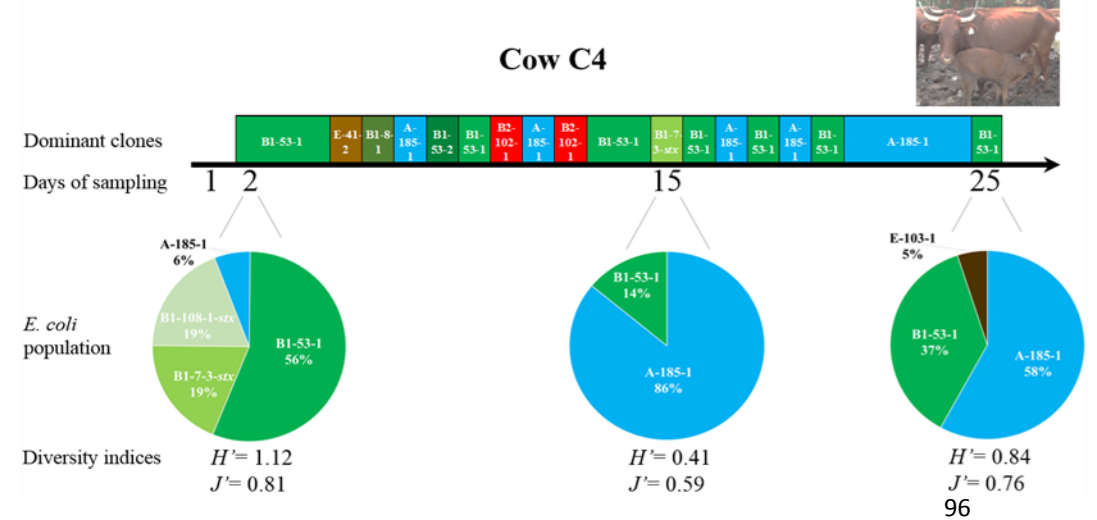
B.



C.



D.



VI. Dynamique des populations bactériennes chez des veaux de boucherie durant la période d'engraissement

1. Présentation du projet et collection des échantillons

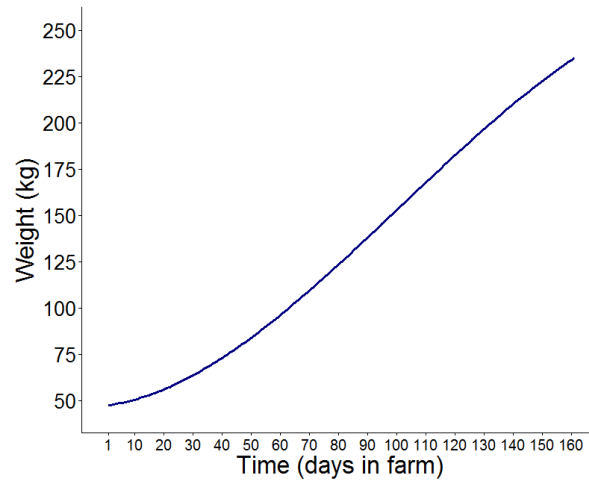
a. Contexte

Le portage fécal d'entérobactéries productrices de gènes codant pour des β -lactamases à spectre étendu chez le veau de boucherie au moment de l'abattage a été rapporté dans plusieurs pays européens et concerne 20% à 30% des animaux (142, 150). Une diminution de la fréquence de portage de ces souches a été observée entre les premiers jours et les derniers jours de l'engraissement (communication personnelle de JY Madec, données non publiées). Cette tendance à la diminution a également été montrée dans une étude où des veaux de trois fermes hollandaises ont été suivis durant les 10 premières semaines d'engraissement (163). A notre connaissance, aucune autre étude longitudinale n'a décrit la dynamique de portage de souches d'*E. coli* productrices de BLSE au cours de l'engraissement du veau de boucherie, et n'a exploré le lien avec la dynamique du microbiote fécal.

Le veau de boucherie industriel constitue un sujet d'étude modèle pour comprendre l'émergence et la sélection de souches d'*E. coli* à potentiel pathogène et résistantes aux antibiotiques au sein du microbiote intestinal. Cette assertion repose sur plusieurs facteurs :

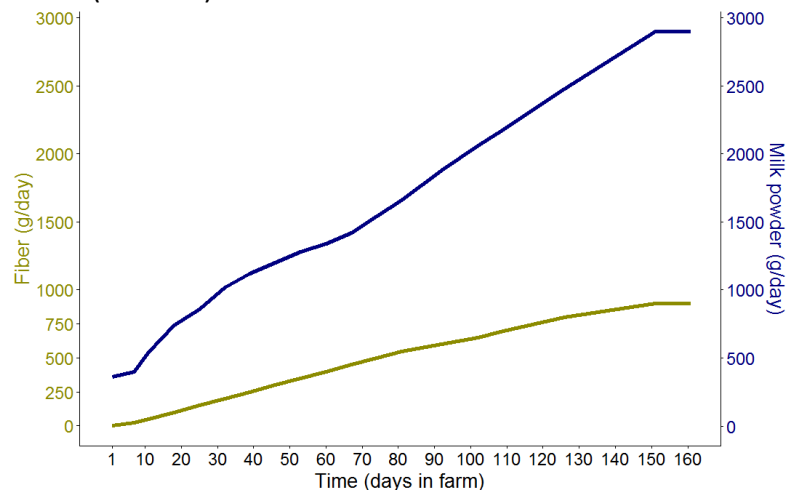
1. Ces animaux sont élevés en lots d'individus homogènes en termes d'âge, de race, de sexe et de poids, dans des parcs collectifs, dans des bâtiments fermés aux conditions d'ambiance contrôlées. A l'âge de six mois, la totalité du lot quitte l'élevage pour l'abattoir. Un vide sanitaire est effectué, puis un nouveau lot arrive pour être engraisé. Ces veaux pèsent en moyenne 47,5 kg au premier jour d'engraissement (âgés alors de 14 jours) et 235 kg au 161^{ème} et dernier jour d'engraissement (âgés de cinq mois). Une courbe de croissance que nous avons estimée à partir des moyennes et des variances de poids mesurés tous les mois pendant six mois chez 154 veaux, obtenues auprès de l'équipe de recherche de la station d'élevage du Rheu est présentée à titre d'exemple dans la Figure 8.

Figure 8. Courbe de croissance de veaux de boucherie mâles de race Holstein estimée à partir de moyennes et variances de poids mesurés tous les mois pendant six mois chez 154 veaux.



2. Un lait reconstitué est l'aliment principal jusqu'à la fin de l'engraissement. Pauvre en fer, il permet d'obtenir une viande de couleur dite blanche ou rosée. Ce substitut de lait reste l'aliment principal durant tout l'engraissement. Il est reconstitué à partir de poudre de lait et d'eau chaude et est servi en deux repas par jour. Pour des raisons de bien-être, un apport en fibres végétales sous forme de muesli de céréales et de paille est fourni dès les premières semaines d'engraissement. La consommation de lait et de fibres est contrôlée durant tout l'engraissement, afin de limiter l'apport en fer à l'organisme. Un exemple de l'évolution de la ration quotidienne de fibres et de poudre de lait dans une des fermes où nous avons réalisé l'étude est présenté dans la Figure 9 ci-dessous.

Figure 9. Evolution de la ration quotidienne de fibres et de poudre de lait dans une des fermes où nous avons réalisé l'étude (ferme B).



3. De par la production très spécifique, les pratiques zootechniques et les conduites d'élevage (densité animale, ambiance du bâtiment, alimentation, âge d'abattage) sont homogènes entre les fermes. La Figure 10 illustre les conditions de vie des veaux de boucherie.

Figure 10. Veaux de boucherie en ferme d'engraissement. (A) Veaux âgés de 14 jours, à leur arrivée dans la ferme, (B) veaux âgés de 115 jours, au troisième mois d'engraissement. Les veaux présents sur ces photos ne sont pas ceux qui ont été inclus dans l'étude.



4. Le recours aux traitements antibiotiques prophylactiques et métaphylactiques sur la totalité des lots rend leur exposition à plusieurs familles d'antibiotiques prolongée et répétée dès le plus jeune âge. Cela favorise l'émergence et le portage à long terme, voire durant toute la vie, de clones d'*E. coli* multi-résistants (150).

Les objectifs des travaux présentés dans cette partie sont donc (i) de décrire les transformations à long terme du microbiote fécal du veau de boucherie dans les conditions réelles d'exposition aux antibiotiques et (ii) de caractériser les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés dans les fèces de veaux de boucherie et leur dynamique de portage sur toute la durée de l'engraissement.

b. Présentation du projet et collection des échantillons ayant servi aux deux études

Une étude de suivi longitudinal du microbiote fécal et du portage de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE chez des veaux de boucherie a été réalisée dans trois fermes

d'engraissement localisées en Bretagne (nommées A, B et C). L'organisme financeur est l'association nationale interprofessionnelle du bétail et des viandes (INTERBEV). L'investigateur principal de l'étude est le Docteur Jean-Yves Madec, directeur scientifique à l'ANSES. Le prélèvement des veaux a fait l'objet d'un accord avec les éleveurs et INTERBEV. Un comité de suivi a été créé pour ce projet. La campagne de prélèvement a eu lieu du 12 octobre 2015 au 14 mars 2016 dans les fermes A et B et du 9 novembre 2015 au 28 mars 2016 dans la ferme C.

Les fèces de 50 veaux dans chaque ferme ont été prélevées par écouvillonnage rectal sept jours après leur arrivée, et la présence d'entérobactéries productrices de BLSE a été recherchée par étalement sur milieu sélectif. Quinze veaux par ferme ont été inclus au début de l'étude. Dans chaque ferme, dix veaux porteurs et cinq veaux non porteurs ont été sélectionnés au hasard pour poursuivre l'étude. Les veaux ont été regroupés dans des parcs collectifs (une illustration de parcs collectifs est donnée dans la Figure 10) en fonction de la détection ou de l'absence de détection d'entérobactéries productrices de BLSE dans le premier prélèvement. Les fèces des veaux inclus dans l'étude ont ensuite été prélevées par écouvillonnage rectal deux fois par mois jusqu'à leur départ pour l'abattoir (Figure 11).

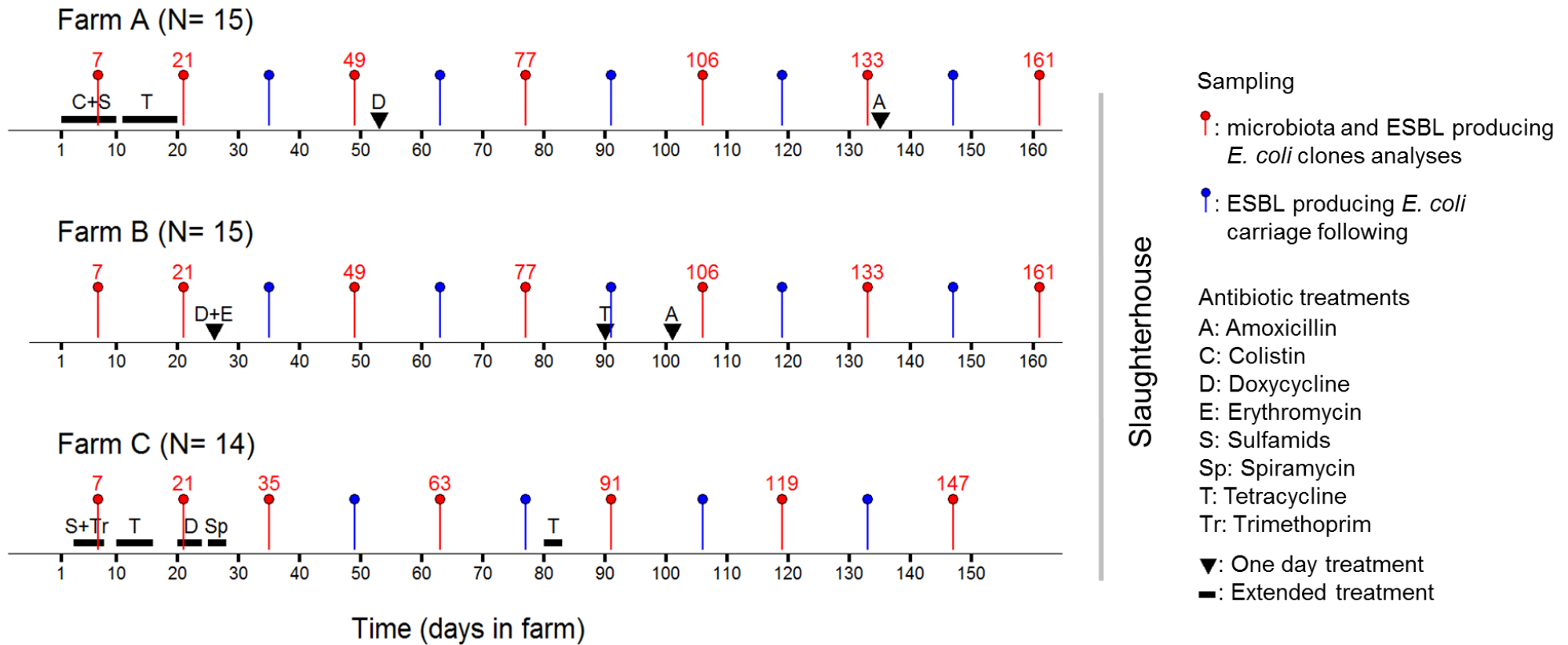
Le nombre total de veaux ayant participé est de 44, à raison de 15 veaux dans les fermes A et B et 14 veaux dans la ferme C, du fait de la mort d'un des veaux en cours d'étude. Les veaux sont des mâles de race Prim' Holstein âgés de 14 jours à leur arrivée dans les fermes. Ils proviennent d'exploitations laitières de la région Bretagne. La durée de participation à l'étude correspond à leur durée de séjour en ferme d'engraissement, soit 161 jours dans les fermes A et B et 147 jours dans la ferme C (Figure 11). Les veaux ont été abattus au bout de cinq mois. Les veaux des fermes A et C ont reçu plusieurs traitements antibiotiques durant les premières semaines, avec une durée d'exposition et une succession de molécules propres à chaque ferme (Figure 11). Les veaux de la ferme B n'ont reçu aucun traitement antibiotique à l'entrée. Au cours de l'engraissement, les veaux des fermes A et B ont reçu plusieurs traitements antibiotiques ponctuels et ceux de la ferme C ont reçu un traitement antibiotique de quatre jours (Figure 11).

Nous avons pu nous procurer le plan d'alimentation dans la ferme B, dont l'évolution de la consommation moyenne de poudre de lait et de fibres végétales est représentée dans la Figure

9. Nous disposons également des quantités quotidiennes moyennes de poudre de lait dans la ferme C.

Les prélèvements utilisés dans les deux études que nous avons réalisées en collaboration avec le Dr. Madec sont un sous-ensemble de la totalité des échantillons réalisés sur ces veaux. Ils correspondent aux échantillons faits aux 7^{ème} et 21^{ème} jours chez tous les veaux. Puis, pour chaque mois d'engraissement, un écouvillon a été utilisé jusqu'au départ pour l'abattoir dans les fermes A et B (Figure 11). Les prélèvements dans la ferme C correspondent à ceux réalisés au 21^{ème} et au 35^{ème} jour, puis une fois par mois jusqu'à leur départ (Figure 11). Pour chaque veau, nous avons donc travaillé sur sept prélèvements, soit un total de 308 échantillons. Les écouvillons étaient immédiatement placés à +4°C et restaient à cette température pour le transport. À l'arrivée au laboratoire, ils étaient stockés à -80°C jusqu'au moment de leur traitement. La présence d'*E. coli* producteurs de BLSE et un typage génétique ont été réalisés par l'équipe du Dr. Madec dans l'ensemble des échantillons collectés, afin de suivre l'évolution du portage de ces souches.

Figure 11. Plans d'échantillonnages dans les fermes A, B, et C (présentés respectivement en haut, au milieu et en bas de la figure). « N » est le nombre de veaux échantillonnés. Dans la ferme C, 14 veaux ont été prélevés jusqu'à la fin de l'engraissement car un veau est mort en cours d'étude et a donc été exclu des analyses. Les jours d'échantillonnage pour lesquels les fèces ont été utilisées dans ces deux études sont indiqués en rouge. Les traitements antibiotiques sont indiqués en noir. Un jour de traitement est indiqué par un triangle, un traitement plus long par une barre. Les veaux sont arrivés dans les fermes à l'âge de 14 jours et ont été abattus à cinq mois d'âge.



2. Etude n°1 : dynamique du microbiote fécal chez des veaux de boucherie durant la période d'engraissement

a. Matériel et méthodes

(i) *Extraction d'ADN*

Nous avons extrait la totalité de l'ADN des échantillons fécaux à l'aide du kit d'extraction DNEasy PowerSoil kit (QIAGEN®). Quelques modifications ont été apportées par rapport au protocole initial. L'extrémité des écouvillons était coupée et placée directement dans des « bead beating tubes », qui sont des tubes contenant des billes servant à lyser mécaniquement les parois et membranes bactériennes sous agitation, comme décrit dans (171). Les tubes étaient mis à incuber 10 minutes à 70°C en présence de la solution C1 fournie par le kit, composée de SDS et d'autres agents chimiques de lyse des membranes cellulaires. Les tubes étaient ensuite secoués verticalement à une vitesse de six mètres/secondes pendant 40 secondes à l'aide d'une machine FastPrep 24G 5G MP (172). Nous avons suivi les instructions du fournisseur pour le reste des étapes, en rajoutant une étape d'incubation de 12 heures dans le tampon d'éluion à la fin du protocole à +4°C. L'ADN était rangé à -20°C à la fin de l'extraction et conservé à la même température entre les différentes phases du protocole.

(ii) *Préparation des librairies¹⁸ d'ADN ribosomique 16S et séquençage par technologie Illumina*

Nous avons amplifié la région V4 du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) par PCR en utilisant les amorces modifiées 515fB (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) et 806rB (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (173). La PCR débutait par une dénaturation des brins d'ADN à 95°C pendant trois minutes, suivie de 25 cycles de trois étapes : dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes et élongation des brins d'ADN néosynthétisés à 72°C pendant 30 secondes. Une phase de cinq minutes à 72°C permettait l'élongation finale. À l'issue de cette PCR, les séquences d'ADN correspondantes à la région V4 du gène de l'ARNr 16S ont été amplifiées et flanquées de séquences de 33 et 34 paires de bases de

¹⁸ Séquences d'ADN modifiées afin d'être « lues » par un séquenceur.

part et d'autre. Ces séquences sont complémentaires des amorces nécessaires au démarrage du séquençage par synthèse sur lequel repose la technologie Illumina.

Ensuite, nous avons réalisé une PCR de huit cycles dans les mêmes conditions. Le but de cette étape était la ligation d'un couple de séquences de huit bases spécifiques de chaque échantillon, se fixant en 5' et en 3' des librairies d'ADN¹⁹. Des séquences adaptatrices étaient également liguées aux extrémités des librairies, afin qu'elles se fixent à la surface de la cellule en verre où a lieu le séquençage.

Nous avons réalisé une PCR quantitative spécifique des librairies complètes (c'est-à-dire contenant la région V4 amplifiée et les séquences additionnelles décrites ci-dessus) sur les 308 librairies. La taille attendue de 428 paires de bases a été vérifiée par migration dans un gel d'électrophorèse avec des marqueurs de taille. Les librairies ont été séquencées sur chaque brin²⁰ sur la plateforme de séquençage du laboratoire de génétique de l'hôpital Bichat, sur une machine MiSeq (Illumina®), avec un kit de réactifs V3.

(iii) *Analyses bio-informatiques*

Traitement des séquences

Nous avons évalué la qualité des séquences brutes obtenues avec la version 0.11.6 du logiciel FastQC (174). Les échantillons non exclus à cette étape ont été traités à l'aide de la version 1.35.1 du logiciel Mothur (175). Il y a d'abord eu assemblage des séquences appariées résultant de la lecture des librairies dans un sens puis dans l'autre au cours du séquençage. Ensuite, nous avons réalisé un filtrage qualité des séquences consensus obtenues. Les filtres appliqués étaient les suivants : une taille comprise entre 289 et 292 bases (correspondant à la taille moyenne de cette région du gène de l'ARNr 16S), sans base ambiguë (c'est-à-dire sans « N » dans la séquence de « ATGC ») et avec une longueur de répétition d'une même base inférieure à cinq. Un représentant de chaque séquence a été aligné sur la base de données SILVA, version 132 (176). Les séquences chimériques, c'est-à-dire résultant de la fusion de deux molécules d'ADN incomplètement

¹⁹ Ce couple de séquences index joue le rôle de code-barres, couple unique attribué à chaque échantillon, et rend possible le séquençage simultané de librairies de plusieurs échantillons. Lus par le séquenceur, ces codes-barres permettent de restituer à chaque séquence générée le nom de l'échantillon duquel elle provient.

²⁰ C'est-à-dire que les deux brins d'ADN de chaque librairie sont lus au cours du séquençage. Cette technique de séquençage est désignée sous le nom de « paired end sequencing ».

élongées durant la PCR (et donc n'ayant aucune réalité biologique), ont été identifiées *de novo* et retirées des analyses en utilisant l'outil VSEARCH, version 2.3.4 (177).

Ensuite, les séquences ayant passé tous ces filtres ont été regroupées en utilisant un seuil d'identité de 97%. Nous avons choisi ce seuil d'identité car il permet d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus par la méthode de l'hybridation ADN-ADN (« DNA-DNA hybridization », ou DDH) (178), qui mesure la similitude globale des génomes de deux isolats bactériens. Développée dans les années 1970, cette méthode de DDH représentait jusqu'à peu la référence pour le classement au sein d'une même espèce de deux isolats bactériens (179).

Malgré cela, les séquences du gène de l'ARNr 16S dont l'identité est supérieure à 97% ne sont pas regroupées sous le terme d'espèce. En effet, bien que représentant l'unité fondamentale dans la classification classique du vivant, et très utilisé en microbiologie, le concept d'espèce est difficilement applicable à la taxonomie bactérienne (180). De plus, si elle a le mérite d'exister, la corrélation entre l'identité du gène de l'ARNr 16S et les valeurs de DDH sont très variables entre les lignées bactériennes, et peuvent parfois conduire à des résultats discordants. Ainsi, on pourrait s'interroger sur ce qui serait vraiment mesuré si on parlait d'une estimation du nombre d'espèces bactériennes dans un échantillon. Pour ces raisons, le terme « unité taxonomique opérationnelle » (UTO, « Operational Taxonomic Unit ») apparaît dans la plupart des études basées sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S plutôt que celui d'« espèce ». Ce terme désigne les séquences d'ADN regroupées à un niveau taxonomique proche de celui de l'espèce. En conséquence, on se cantonne aux rangs taxonomiques supérieurs à celui de l'espèce pour étudier la composition taxonomique d'un échantillon.

Nous avons retiré du reste des analyses les séquences singletons, c'est-à-dire n'ayant pas été regroupées.

Calcul des indices de diversité α et β

La diversité biologique, ou biodiversité, est la variété des composants ou organismes à tous les niveaux biologiques possibles, des gènes aux communautés d'individus, qu'ils soient microscopiques ou macroscopiques (181). L'étude de la diversité des communautés microbiennes repose sur des indicateurs quantitatifs, qui permettent de condenser en une seule métrique

l'information contenue dans plusieurs milliers de séquences. Ces indices se basent sur les UTO comme unités fondamentales d'analyse. Ils peuvent intégrer le nombre d'UTO détectés, leurs abondances relatives, ainsi que leurs phylogénies. Toutefois, étant donné son extrême complexité, il n'existe pas de mesure unique permettant de caractériser de manière exhaustive la diversité au sein d'un écosystème, et on a souvent recours à plusieurs indices pour l'estimer. La plupart des études sur les communautés microbiennes décrit la diversité en termes de diversités α et β . La diversité α se définit comme la diversité qu'il existe au sein d'un échantillon. La diversité β mesure le degré de différence qu'il existe entre deux échantillons. En comparant les échantillons d'un même individu prélevés à différents temps, elle permet de caractériser l'évolution de la structure d'une communauté. En comparant les échantillons entre des individus, elle peut aussi révéler des différences globales de compositions entre états pathologiques ou entre communautés soumises ou non à des pressions antibiotiques.

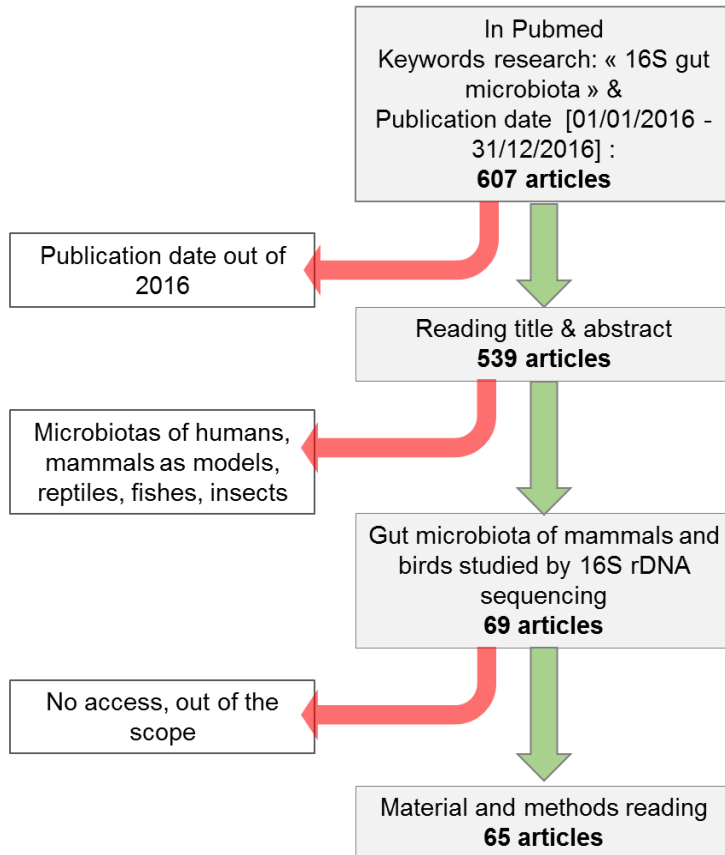
Dans un premier temps, nous avons réalisé une raréfaction des séquences, afin de permettre une comparaison fiable de ces indices entre les échantillons. La raréfaction est une méthode d'échantillonnage des séquences d'ADN qui consiste à prélever par tirage au sort sans remise un nombre de séquences fixé dans chaque échantillon (182). En uniformisant les échantillons par tirage au sort d'un nombre identique de séquences, on limite l'impact des écarts de rendements de séquençage entre les échantillons sur l'estimation de la diversité. Classiquement, les indices de diversité α et β sont calculés sur la fraction de séquences tirées au sort. Un échantillon ayant un nombre de séquences inférieur au seuil de raréfaction est exclu des analyses de diversité. Le seuil de raréfaction est choisi arbitrairement et résulte d'un consensus acceptable entre le nombre d'échantillons à exclure et la valeur la plus grande possible (182). Nous avons retenu et évalué plusieurs seuils de raréfaction candidats, en prenant en compte les courbes de raréfaction et la distribution du nombre de séquences dans les échantillons. Le seuil que nous avons choisi représentait le meilleur compromis entre ces quatre critères : nombres d'échantillons sous le seuil (et donc exclus des analyses de diversité), nombre d'échantillons pour lesquels l'effort d'échantillonnage était supérieur à 25% et 50% du nombre de séquences, et pourcentage de séquences tirées au sort dans l'échantillon ayant le plus grand nombre de séquences. Le seuil de raréfaction retenu était de 47 000 séquences.

Le choix de deux indices de diversité α et deux indices β s'est fait sur la base d'une revue non systématique de la littérature. L'objectif de cette revue était de décrire l'utilisation des indices de diversité dans les études du microbiote par séquençage du gène de l'ARNr 16S chez les animaux à sang chaud, hors modèles animaux, publiées au cours de l'année 2016. La procédure est présentée ci-dessous (Figure 12). Nous avons effectué une recherche dans le moteur de recherche PubMed avec les mots-clés « 16S gut microbiota » et avons restreint la période de publication entre le 1^{er} janvier 2016 et le 31 décembre 2016. Les articles proposés par PubMed publiés hors de cette période étaient exclus de la revue. Après lecture des titres et résumés des articles référencés par PubMed au cours de cette période, 69 articles répondaient aux critères retenus. Les 12 indices α cités dans les articles retenus étaient, par ordre décroissant, l'indice de Shannon, l'indice de Chao 1, le nombre d'UTO, l'indice de Simpson, l'estimateur de couverture basé sur l'abondance (« Abundance based estimator » ou « ACE »), l'indice de diversité phylogénétique de Faith (« PD whole tree »), l'inverse de l'indice de Simpson, l'indice de Fisher, l'indice « CatchAll » et l'indice d'équitabilité de Pielou (Figure 12). Nous avons retenu l'indice de Shannon et le nombre d'UTO car il s'agissait des indices α les plus fréquemment utilisés et ne nécessitant pas de conserver les séquences singletons pour les calculer. Les sept indices de diversité β cités dans les articles étaient, par ordre décroissant de fréquence, la distance Unifrac non pondérée, l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis, la distance Unifrac pondérée, l'indice de Jaccard, le coefficient θ de Yue et Clayton, la distance de Hellinger et la divergence de Kullback-Leibler (Figure 12). Les distances Unifrac et l'indice de Bray-Curtis étaient beaucoup plus fréquemment utilisés que les autres indices. Nous avons retenu les distances Unifrac non pondérée et pondérée car elles présentent l'avantage d'être complémentaires.

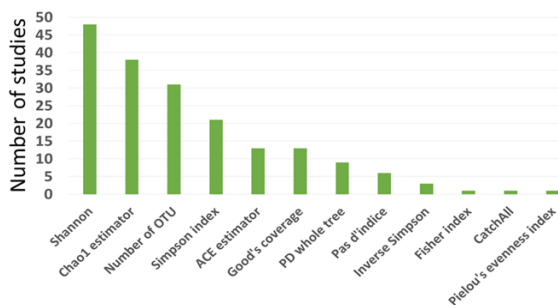
Figure 12. Indices de diversité rapportés dans une revue des études publiées en 2016 sur le microbiote des animaux par séquençage du gène de l'ARNr 16S.

(A) le diagramme de flux décrit les différentes étapes du processus de revue. Le nombre d'articles utilisant chaque indice α et β est présenté respectivement au niveau des panneaux (B) et (C). La majorité des articles présentait plusieurs indices de diversité α et β .

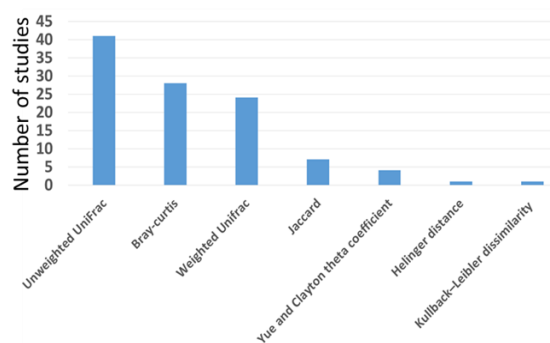
A



B



C



Dans ce travail, la diversité α a donc été mesurée par :

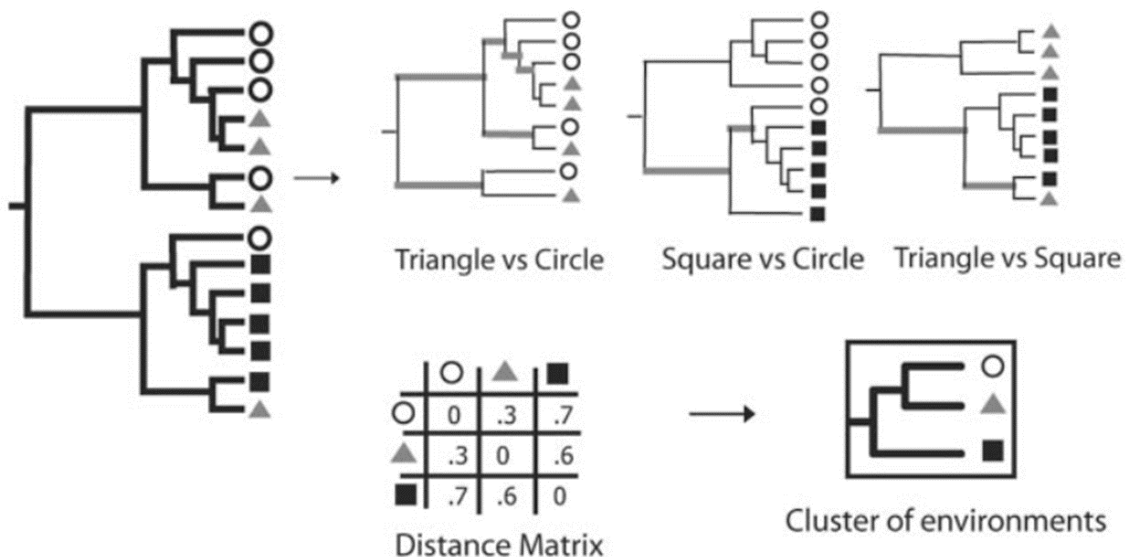
- l'indice de Shannon : il permet de résumer en une seule métrique l'information sur la richesse en UTO et l'équitabilité de leurs abondances relatives. On définit l'indice de

Shannon comme H' (183) où $H' = -\sum_{i=1}^n p_i \times \ln(p_i)$ avec p_i abondance relative de l'UTO i dans l'échantillon. L'indice de Shannon est maximal quand les abondances relatives des UTO sont uniformes.

- le nombre n d'UTO : cet indice est égal au nombre d'UTO différents observés dans l'échantillon après regroupement des séquences. Il correspond à une estimation de la richesse qui existe au sein d'une communauté microbienne.

Nous avons mesuré la diversité β à l'aide des distances Unifrac non pondérée (184) et pondérée (185). La distance Unifrac non pondérée est calculée à partir de l'arbre phylogénétique contenant les UTO présents dans la paire d'échantillons que l'on souhaite comparer. Cette distance correspond à la fraction de la longueur totale des branches qui est unique à l'un ou à l'autre des échantillons (Figure 13) (184). La distance UniFrac pondérée correspondant à la distance précédente pondérée par l'abondance relative de chaque UTO présent dans les échantillons (185). Les distances Unifrac varient de zéro à un, où zéro signifie une composition identique entre les deux échantillons et un des compositions complètement différentes.

Figure 13. Exemple de calcul de distance Unifrac non pondérée d'après (184). Un arbre phylogénétique est construit à partir de tous les UTO détectés dans trois communautés différentes (les carrés, les cercles et les triangles représentent l'origine des UTO). Pour chaque arbre contenant les UTO d'une paire de communautés, les branches épaisses et grises sont les branches partagées, et les branches noires et fines sont uniques à une communauté. Plus le nombre d'UTO partagés est grand et plus la somme des longueurs de branches noires et fines est petite. La distance Unifrac pondérée est donc plus faible entre des communautés proches (ronds et triangles) qu'éloignées (ronds et rectangles).



Détermination de la composition taxonomique bactérienne

La taxonomie de chaque UTO a été recherchée dans les bases de données du « Ribosomal Database Project classifier », une base regroupant des séquences d'ADN ribosomique 16S alignées et leur taxonomie (186). Le calcul de l'abondance relative des différents taxa bactériens s'est fait en regroupant par taxon le nombre de séquences affiliées et en le divisant par le nombre total de séquences de l'échantillon.

(iv) *PCR quantitative du genre Escherichia*

Nous avons utilisé l'ADN extrait des échantillons fécaux pour réaliser une PCR quantitative spécifique du genre *Escherichia*, grâce à des amorces ciblant une région de 96 paires de bases sur le gène de l'ARNr 16S (187). La réaction a eu lieu dans un volume de 50 µl, contenant 0,9 µMolaire d'amorces sens et anti-sens, 0,9 µMolaire de sonde TaqMan, 0,1 mg/ml de BSA, 20 µl d'ADN à doser, et du mélange réactionnel concentré 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La PCR s'est déroulée dans les conditions suivantes : deux minutes à 50°C, puis 10 minutes à 95°C, suivi de 45 cycles de 15 secondes à 95°C puis une minute à 60°C. Nous avons réalisé les PCR sur un instrument Prism 7500 (Applied Biosystems®) dans le service de virologie de l'hôpital Bichat. *E. coli* étant l'entérobactérie quantitativement majoritaire du tube digestif des animaux à sang chaud, cette PCR ciblant toutes les bactéries du genre *Escherichia* permet d'obtenir une estimation fiable et précise des quantités d'*E. coli* dans les échantillons.

(v) *Analyses statistiques*

L'ensemble des analyses statistiques a été faite avec le logiciel R (168).

Diversité β

Dans un premier temps, nous avons évalué la ressemblance des microbiotes fécaux des veaux aux différents prélèvements. Des « heatmaps » représentant les distances Unifrac entre les 44 veaux au 7^{ème} et 21^{ème} jours ont été tracées afin de vérifier l'existence d'un effet des traitements antibiotiques en cours au jour d'échantillonnage (ces jours correspondant aux prélèvements réalisés alors qu'un traitement était en cours dans les fermes A et C, Figure 14). Une heatmap représentant les distances entre les veaux au dernier jour d'échantillonnage a été ajoutée afin de comparer la ressemblance entre les veaux au début et à la fin de l'engraissement. Les veaux ont

été ordonnés par ferme et selon la classification ascendante hiérarchique basée sur la distance Unifrac utilisée.

Dans un second temps, nous avons évalué la volatilité mensuelle du microbiote des veaux dans chaque ferme. La volatilité mensuelle signifie le degré de changements entre deux prélèvements mensuels, d'après la définition donnée par Goodrich et ses collègues (182). Les distances Unifrac intra-individuelles entre échantillons consécutifs ont été représentées par des graphiques en spaghetti.

Dans un troisième temps, afin de comparer la variabilité des microbiotes des veaux d'une même ferme et de fermes différentes, nous avons représenté la distribution des distances Unifrac entre les veaux à chaque prélèvement par des boîtes à moustaches, en fonction des fermes du couple de veaux considérés.

Diversité α

Evaluation de l'impact des traitements antibiotiques sur la diversité microbienne

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux échantillons réalisés alors qu'un traitement antibiotique était en cours. L'indice de Shannon et le nombre d'UTO ont été comparés par un test de Wilcoxon entre les veaux traités et non traités aux antibiotiques au septième jour d'engraissement (fermes A et C *versus* ferme B, Figure 11). Dans un second temps, ces indices ont été comparés à l'aide de tests de Wilcoxon appariés entre les échantillons consécutifs d'un même veau entre lesquels il y avait eu prise d'antibiotique (Figure 11). Douze tests ont été réalisés, et les valeurs p ont été corrigées par la méthode de Benjamini et Hochberg (188).

Modélisation de l'évolution de la diversité microbienne au cours du temps

Nous avons modélisé la dynamique des deux indices au cours du temps, en utilisant des modèles linéaires à effets mixtes. Un modèle à une pente et un modèle à deux pentes (équations 2 et 3 respectivement) ont été testés, en prenant en compte l'effet des fermes sur chaque paramètre et le veau comme effet aléatoire. La ferme A a été choisie comme référence. Les équations de ces modèles sont présentées ci-dessous avec l'indice de Shannon cité en exemple :
Équation 2. Modèle candidat à une pente pour l'indice de Shannon et le nombre d'UTO

$$y_{i,j,k} = \theta_{0i,k} + \theta_{1i,k} \times t_{i,j,k} + \varepsilon_{i,j,k}$$

Équation 3. Modèle candidat à deux pentes pour l'indice de Shannon et le nombre d'UTO

$$y_{i,j,k} = \theta_{0i,k} + \theta_{1i,k} \times t_{1i,j,k} + \theta_{2i,k} \times t_{2i,j,k} + \varepsilon_{i,j,k}$$

Où :

$y_{i,j,k}$ est l'indice de Shannon du veau i de la ferme k au $j^{\text{ème}}$ jour

$\theta_{0i,k}$ est l'indice de Shannon prédit par le modèle au jour 0

$\theta_{1i,k}$ est la trajectoire de l'indice de Shannon sur toute la période et durant les 21 premiers jours dans l'équation (2) et (3), respectivement

$\theta_{2i,k}$ est la trajectoire de l'indice de Shannon entre le 22^{ème} jour et le dernier jour d'engraissement dans l'équation (2)

$t_{i,j,k}$ est la variable représentant le $j^{\text{ème}}$ jour dans l'équation (1)

$t_{1i,j,k}$ est la variable représentant le $j^{\text{ème}}$ jour durant les 21 premiers jours dans l'équation (2) puis fixée à 21 pour le reste du temps

$t_{2i,j,k}$ est la variable représentant la différence entre le $j^{\text{ème}}$ jour et la variable $t_{1i,j,k}$ dans l'équation (2) telle que $t_2 = t - t_1$

$\varepsilon_{i,j,k}$ est l'erreur résiduelle

La décomposition de ces termes est présentée dans la Table 1 ci-dessous :

Table 1. Décomposition des paramètres des modèles candidats pour l'indice de Shannon.

Modèle	Equation	θ_0	θ_1	θ_2
Modèle 1	1	$\beta_{0k} + b_{0i}$	$\beta_{1k} + b_{1i}$	-
Modèle 2	2	$\beta_{0k} + b_{0i}$	$\beta_{1k} + b_{1i}$	$\beta_{2k} + b_{2i}$

Où :

β_{0k} est l'ordonnée à l'origine moyenne prédite par le modèle de la ferme k

b_{0i} est l'effet aléatoire du veau i sur l'ordonnée à l'origine

β_{1k} est l'effet fixe de la ferme k sur la pente du modèle 1 et sur la 1^{ère} pente du modèle 2

b_{1i} est l'effet aléatoire du veau i sur la pente du modèle 1 et sur la 1^{ère} pente du modèle 2

β_{2k} est l'effet fixe de la ferme k sur la 2^{ème} pente du modèle 2

b_{2i} est l'effet aléatoire du veau i sur la 2^{ème} pente du modèle 2

Nous avons fait l'hypothèse que les effets aléatoires étaient indépendants et suivaient une loi normale d'espérance 0 et de variance Ω . Nous avons fait l'hypothèse que les erreurs résiduelles étaient indépendantes et suivaient une loi normale d'espérance 0 et de variance σ^2 .

Pour le modèle à deux pentes, nous avons choisi de placer une rupture de pente au 21^{ème} jour en observant l'allure des données sur des graphiques en spaghetti.

Le choix entre les deux modèles structuraux s'est fait à l'aide d'un test du rapport de vraisemblance. La significativité des coefficients du modèle retenu a été vérifiée par un test de Wald.

Puis, pour chaque paramètre du modèle de base retenu, nous avons regroupé les fermes dont les effets n'étaient pas significativement différents. Le test du rapport de vraisemblance a été utilisé pour comparer le modèle avec les effets regroupés au modèle de base, et un test de Wald a été fait pour vérifier la significativité des coefficients du modèle final.

Nous avons évalué le modèle à l'aide de méthodes graphiques, en étudiant le diagramme de normalité des résidus, le comportement des résidus en fonction du temps et en fonction des valeurs prédites par le modèle.

Abondances relatives des taxa bactériens à deux échelles taxonomiques

Le phylum et le genre sont les deux échelles taxonomiques qui ont été utilisées pour étudier la composition du microbiote fécal des veaux.

Phylum

Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests de Wilcoxon entre veaux traités aux antibiotiques et veaux non traités au septième jour d'engraissement sur les logarithmes décimaux des abondances relatives des quatre principaux phyla et sur la somme des abondances des phyla minoritaires. Les valeurs p ont été corrigées par la méthode de Benjamini et Hochberg (188).

Dans un second temps, nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes à une pente afin de décrire la dynamique des abondances relatives des quatre principaux phyla au cours du temps. Un effet de la ferme a été introduit sur les paramètres des modèles, afin de mettre en évidence une différence entre les fermes, en prenant la ferme A comme référence. L'équation du modèle est présentée ci-dessous :

Équation 4. Modèle candidat à une pente pour les abondances relatives des phyla

$$y_{i,j,k} = \theta_{0i,k} + \theta_{1i,k} \times t_{i,j,k} + \varepsilon_{i,j,k}$$

Où :

$y_{i,j,k}$ est le logarithme décimal de l'abondance relative du phylum du veau i de la ferme k au j^{ème} jour

$\theta_{0i,k}$ est le logarithme décimal de l'abondance relative du phylum au jour 0, prédit par le modèle, composé d'un effet fixe de la ferme k , β_{0k} et d'un effet aléatoire du veau i $b_{0i,j}$ tel que $\theta_{0i,k} = \beta_{0k} + b_{0i}$

$\theta_{1i,k}$ est la trajectoire de l'abondance relative, composée d'un effet fixe de la ferme k β_{1k} et d'un effet aléatoire du veau i b_{1i} tel que $\theta_{1ik} = \beta_{1k} + b_{1i}$

$t_{i,j,k}$ est la variable représentant le $j^{\text{ème}}$ jour

$\varepsilon_{i,j,k}$ est l'erreur résiduelle

Les mêmes hypothèses d'indépendance et de normalité des effets aléatoires et des erreurs résiduelles que pour les indices de diversité α ont été faites. La significativité des coefficients et l'évaluation du modèle retenu pour chaque phylum ont été faites de la même façon que pour la modélisation des indices de diversité α .

Genre

Nous avons représenté les abondances relatives des dix genres les plus abondants chez chaque veau au 7^{ème}, 21^{ème} et dernier jour à l'aide de diagrammes en barres empilées. La différence entre les abondances relatives de ces genres entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour a été calculée pour mettre en évidence un changement de composition des genres dominants dans les premières semaines.

Quantités absolues des populations d'*E. coli*

*Evaluation de l'impact des traitements antibiotiques sur les quantités d'*E. coli**

Au 7^{ème} jour d'engraissement, nous avons réalisé des tests de Wilcoxon entre veaux traités aux antibiotiques et veaux non traités sur les logarithmes décimaux des quantités absolues d'*E. coli* estimées par PCR quantitative.

*Modélisation de l'évolution des quantités d'*E. coli**

Dans un premier temps, nous avons modélisé la dynamique des populations d'*E. coli* à l'aide de modèles de régressions polynomiales d'ordres 0 à 4 à effets mixtes, en prenant en compte l'effet des fermes et le veau comme effet aléatoire sur chaque paramètre. L'équation du modèle est présentée ci-dessous :

Équation 5. Modèles polynomiaux candidats pour le nombre d'*E. coli*/g

$$y_{i,j,k} = \sum_{l=0}^4 \theta_{i,k,l} \times t_{i,j}^l + \varepsilon_{i,j,k}$$

Où :

$y_{i,j,k}$ est le logarithme décimal des quantités d'*E. coli* du veau i de la ferme k au $j^{\text{ème}}$ jour

$\theta_{i,k,l}$ est le coefficient du veau i de la ferme k du monôme de degré l , tel que

$\theta_{i,k,l} = \beta_{k,l} + b_{i,l}$, $\beta_{k,l}$ est l'effet fixe de la ferme k sur le monôme de degré l et $b_{i,l}$ est l'effet aléatoire du veau i sur le monôme de degré l

$t_{i,j}$ est la variable représentant le $j^{\text{ème}}$ jour

$\varepsilon_{i,j,k}$ est l'erreur résiduelle

Le nombre de coefficients a été sélectionné par un test du rapport de vraisemblance.

Dans un second temps, pour chaque paramètre du modèle de base retenu, nous avons regroupé les fermes dont les effets n'étaient pas significativement différents. Le test du rapport de vraisemblance a été utilisé pour comparer le modèle avec les effets regroupés au modèle de base, et un test de Wald a été fait pour vérifier la significativité des coefficients. Nous avons évalué la nécessité des effets aléatoires sur les coefficients par une démarche de sélection descendante, en utilisant l'AIC. Le nombre d'effets aléatoires a été réduit, en les retirant pas-à-pas, à commencer par l'effet sur le coefficient d'ordre le plus élevé.

Les mêmes hypothèses d'indépendance et de normalité des effets aléatoires et des erreurs résiduelles que pour les indices de diversité α ont été faites. La significativité des coefficients et l'évaluation du modèle retenu ont été faites de la même façon que pour la modélisation des indices de diversité α .

Recherche d'associations avec des taxa au sein du microbiote

Nous avons réalisé des tests de corrélation de Spearman afin d'étudier les associations entre les quantités absolues d'*E. coli* et les abondances relatives de taxa bactériens.

Dans un premier temps, afin de nous assurer de la cohérence des deux jeux de données et nous prémunir de la découverte de fausses associations imputables à des erreurs potentielles d'expérimentation, nous avons recherché une association entre les quantités absolues d'*E. coli* et l'abondance relative du genre *Escherichia*. Dans un second temps, nous avons recherché une association avec les genres dont la médiane était supérieure ou égale à celle du genre *Escherichia*. Les valeurs de p ont été corrigées à l'aide de la procédure de Benjamini et Hochberg (188).

Analyse exploratoire : comparaison de l'évolution de la dose de poudre de lait par unité de poids vif et des quantités absolues d'E. coli

Dans un premier temps, nous avons estimé la dose de poudre de lait quotidienne consommée par kilo de poids vif en divisant la quantité de poudre de lait théorique consommée par jour dans les fermes B et C par le poids prédit des veaux. Le poids moyen d'un veau à chaque jour d'engraissement a été prédit à l'aide des moyennes et des variances de poids mesurés tous les mois pendant six mois chez 154 veaux, obtenues auprès de l'équipe de recherche de la station d'élevage du Rheu. Différentes régressions polynomiales d'ordres 0 à 3 sur les poids moyens ont été testés, en estimant les paramètres par la méthode des moindres carrés pondérés par l'inverse de la variance. Le modèle prédisant le mieux la croissance des veaux était celui avec le polynôme de degré 3, ce qui est cohérent avec les travaux menés par Heinrich sur la croissance de génisses Holstein (189).

Dans un second temps, nous avons comparé les prédictions moyennes des quantités absolues d'*E. coli* dans les fermes B et C de notre modèle final et la dose de poudre de lait quotidienne dans ces fermes.

b. Résultats

Un suivi longitudinal du microbiote fécal de 44 veaux de boucherie a été réalisé dans les trois fermes d'élevage. Les fèces des veaux ont été prélevées 7 jours et 21 jours après leur arrivée. Puis, un écouvillonnage rectal a été réalisé tous les mois jusqu'au départ pour l'abattoir dans les fermes A et B. Les veaux de la ferme C ont été prélevés au 35^{ème} jour, puis une fois par mois jusqu'à leur départ (Figure 11).

Les veaux des fermes A et C ont reçu plusieurs traitements antibiotiques durant les 21 premiers jours (Figure 11). Après 21 jours, les veaux des 3 fermes ont reçu des traitements antibiotiques à distance des jours de prélèvement. La totalité de l'ADN présent dans les échantillons a été extrait. À partir de cet ADN, la région V4 du gène de l'ARNr 16S a été séquencée par technologie Illumina pour connaître la diversité et la composition microbienne. Les quantités d'*E. coli* ont aussi été estimées à partir de l'ADN extrait par une approche de PCR quantitative spécifique du genre *Escherichia*.

(i) Description des données de séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Chaque veau a été prélevé sept fois, ce qui fait un total de 308 échantillons. Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a généré 34 153 188 séquences brutes après l'assemblage des lectures appariées d'amplicons, et des étapes de filtrage qualité, avec une moyenne de 111 248 séquences par échantillon (écart-type = 63 002). Le plus petit nombre de séquences pour un échantillon (le dernier échantillon du veau C1603 de la ferme B) était de 383 et les séquences étaient de mauvaise qualité, ce qui nous a conduits à l'exclure des analyses. Le reste des analyses a donc été conduit sur 307 échantillons. Le nombre minimum et maximum d'UTO détectés dans les échantillons était respectivement de 119 et 1302 (avant raréfaction). Le nombre de séquences était inférieur au seuil de raréfaction pour sept échantillons (un et deux échantillons de la ferme A respectivement au premier et deuxième prélèvement, un échantillon des fermes B et C au deuxième et dernier prélèvement). Les analyses de diversité α et de diversité β ont donc été réalisées sur 300 échantillons.

(ii) Diversité du microbiote fécal entre, et au sein des veaux

Dans un premier temps, à chaque date d'échantillonnage, les distances β entre veaux ont été calculées. Dans un second temps, pour chaque veau, les distances β entre échantillons consécutifs ont été calculées afin d'observer la volatilité mensuelle du microbiote.

Distances β inter-veaux

L'étendue des distances Unifrac pondérées entre les veaux au 7^{ème} jour d'engraissement est grande (Table 2, Figure 14A). Le minimum et le maximum valent respectivement 0,17 (entre les veaux de la ferme C C2235 et C6567, Figure 14A, Table 2) et 0,66 (Figure 14A, par exemple entre les veaux de la ferme A C2291 et C3514). Les veaux sont très différents entre eux, avec des groupes plus homogènes dans les fermes B et C (Figure 14A).

Au 21^{ème} jour, le minimum, et le maximum des distances Unifrac pondérées valent respectivement 0,12 (Table 2, veaux de la ferme B C1006 et C2382, Figure 14B) et 0,48 (entre les veaux de la ferme A C5327 et de la ferme B C7657, Figure 14B). La médiane et l'étendue des distances sont plus faibles qu'au 7^{ème} jour (médiane à 0,45, et 0,33, au 7^{ème}, et au 21^{ème} jour respectivement, étendues valant respectivement 0,49 et 0,36). Les distances Unifrac pondérées diminuent aussi bien entre les veaux d'une même ferme que les veaux de fermes différentes (Figure 14B). Contrairement au 7^{ème} jour, aucun veau ne présente de microbiote singulier et isolé des autres. Les distances entre les veaux sont faibles au dernier jour d'échantillonnage, avec une distribution proche de celle au 21^{ème} jour (Table 2, Figure 14C). En utilisant les distances Unifrac non pondérées, on observe également une diminution globale entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour (Figure 15A). Cette diminution s'applique aux trois fermes (Table 3, Figure 15).

Que ce soit au 7^{ème} jour ou au 21^{ème} jour, les distances Unifrac de paires de veaux sous traitement antibiotique prolongé (d'un veau ou des deux) n'apparaissent pas différentes de celles des paires de veaux qui ne sont pas sous traitement antibiotique (Figure 14A, Figure 15A).

Afin d'évaluer si le 7^{ème} jour était le seul jour d'échantillonnage affichant autant de différences entre les veaux, la distribution des distances Unifrac pondérées a été représentée pour chaque échantillonnage, en séparant les paires de veaux par ferme (Figure 16).

Sur la Figure 16, les distances sont plus petites qu'au 7^{ème} jour quel que soit le jour considéré, et sont globalement similaires aux distances Unifrac pondérées observées au 21^{ème} et dernier jour d'échantillonnage. Pour certains échantillonnages, les distances Unifrac pondérées sont plus faibles entre les veaux d'une même ferme, par rapport aux autres (Figure 16, veaux de la ferme A au 77^{ème} jour, veaux de la ferme B au 161^{ème} jour par exemple).

Durant l'engraissement, les distances Unifrac non pondérées sont plus faibles qu'au 7^{ème} jour pour les paires de veaux de la même ferme et les paires de veaux appartenant aux fermes B et C (boîtes à moustaches violettes, orange, jaunes et vertes, Figure 17). Cette diminution est moins marquée pour les distances entre veaux de la ferme A et ceux des autres fermes (boîtes à moustaches rouges et bleues, Figure 17). Les distances Unifrac non pondérées sont plus faibles entre les veaux d'une même ferme qu'entre les veaux de fermes différentes (voir boîtes à moustaches violettes, orange et vertes, Figure 17 à partir des jours 35-49). D'autre part, les distances Unifrac non pondérées entre les veaux de fermes différentes ont tendance à être plus grandes quand un des veaux est de la ferme A (voir boîtes à moustaches rouges et bleues, Figure 17).

Table 2. Distribution des distances Unifrac pondérées entre les veaux au sein des trois fermes au 7^{ème}, 21^{ème} et dernier jour d'engraissement. « n » correspond au nombre de distances entre veaux pour chaque ferme à chaque temps, et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.

	Ferme A						Ferme B						Ferme C					
	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile
7 ^{ème} jour	91	0,52	0,21	0,66	0,47	0,57	105	0,40	0,27	0,60	0,34	0,47	91	0,37	0,17	0,66	0,33	0,43
21 ^{ème} jour	78	0,34	0,18	0,45	0,31	0,38	91	0,30	0,12	0,44	0,27	0,34	78	0,29	0,20	0,36	0,26	0,31
dernier jour	105	0,27	0,16	0,50	0,24	0,31	78	0,22	0,14	0,49	0,20	0,26	78	0,29	0,16	0,45	0,26	0,35

Figure 14. (A – C) Heatmaps construites à partir des distances Unifrac pondérées. Les carrés jaunes indiquent des communautés proches tandis que les carrés rouges indiquent des communautés éloignées. Les panneaux (A), (B), et (C) illustrent les distances entre les veaux au (A) premier échantillonnage (7^{ème} jour), (B) deuxième échantillonnage (21^{ème} jour), et (C) dernier échantillonnage (161^{ème} jour pour les fermes A et B, 147^{ème} jour pour la ferme C). Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de chaque heatmap. A chaque échantillonnage, les veaux sont ordonnés en ligne et en colonne selon la ferme et la classification hiérarchique basée sur les distances Unifrac. (D) Graphiques en spaghetti illustrant pour chaque veau les distances Unifrac pondérées entre échantillons consécutifs. Les veaux de la ferme A, B et C sont représentés respectivement en haut, au milieu, et en bas. Les traitements antibiotiques sont indiqués par des barres grises sous le nom de la ferme dans les panneaux (A), (B), (C) et sous le jour dans (D).

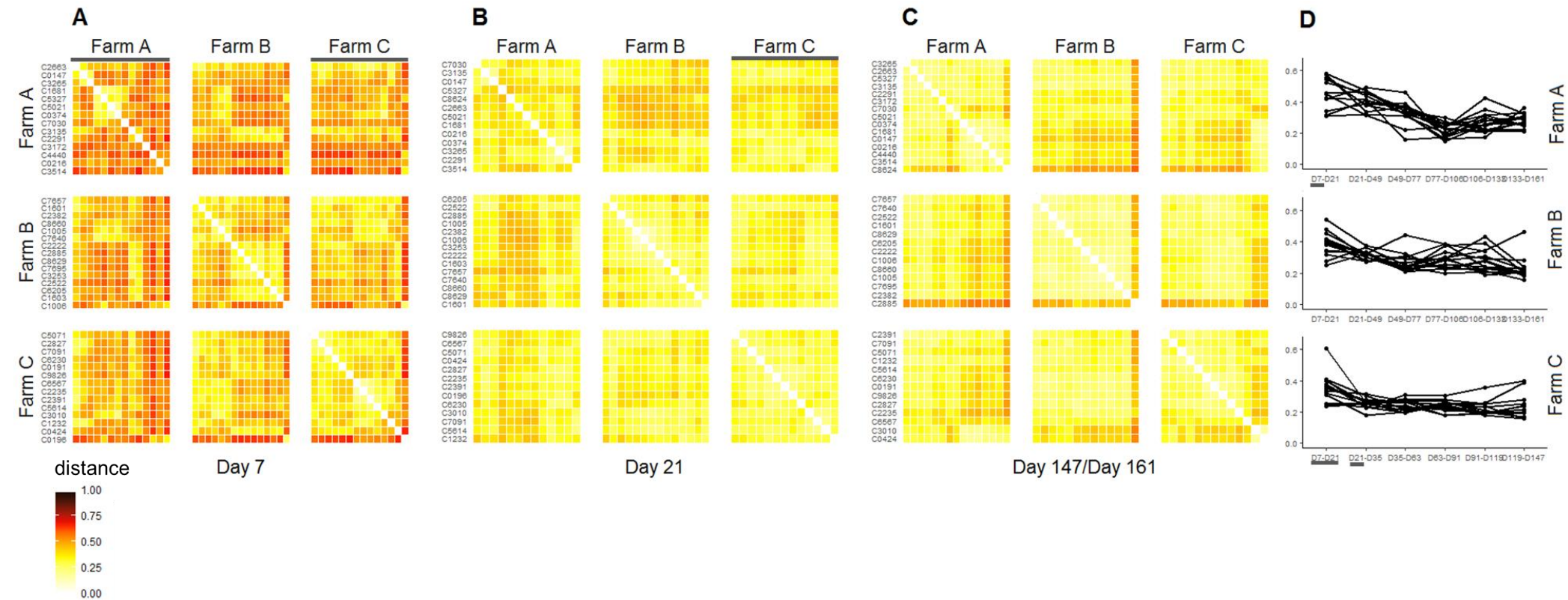


Table 3. Distribution des distances Unifrac non pondérées entre les veaux au sein des trois fermes au 7^{ème}, 21^{ème} et dernier jour d'engraissement. « n » correspond au nombre de distances entre veaux pour chaque ferme à chaque temps et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.

	Ferme A						Ferme B						Ferme C					
	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile
7 ^{ème} jour	91	0,67	0,59	0,80	0,64	0,70	105	0,65	0,55	0,76	0,62	0,69	91	0,69	0,59	0,84	0,66	0,73
21 ^{ème} jour	78	0,55	0,50	0,68	0,53	0,57	91	0,60	0,51	0,75	0,58	0,64	78	0,59	0,52	0,68	0,57	0,62
dernier jour	105	0,59	0,49	0,72	0,54	0,63	78	0,53	0,45	0,65	0,51	0,57	78	0,56	0,46	0,70	0,53	0,61

Figure 15. (A – C) Heatmaps construites à partir des distances Unifrac non pondérées. Les carrés orange indiquent des communautés plus proches que les carrés rouges et noirs, qui indiquent des communautés éloignées. Les panneaux (A), (B), et (C) illustrent les distances entre les veaux au (A) premier échantillonnage (7^{ème} jour), (B) deuxième échantillonnage (21^{ème} jour), et (C) dernier échantillonnage (161^{ème} jour pour les fermes A et B, 147^{ème} jour pour la ferme C). Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de chaque heatmap. A chaque échantillonnage, les veaux sont ordonnés en ligne et en colonne selon la ferme et la classification hiérarchique basée sur les distances Unifrac. (D) Graphiques en spaghetti illustrant pour chaque veau les distances Unifrac non pondérées entre échantillons consécutifs. Les veaux de la ferme A, B et C sont représentés respectivement en haut, au milieu, et en bas. Les traitements antibiotiques sont indiqués par des barres grises sous le nom de la ferme dans les panneaux (A), (B), (C) et sous le jour dans (D).

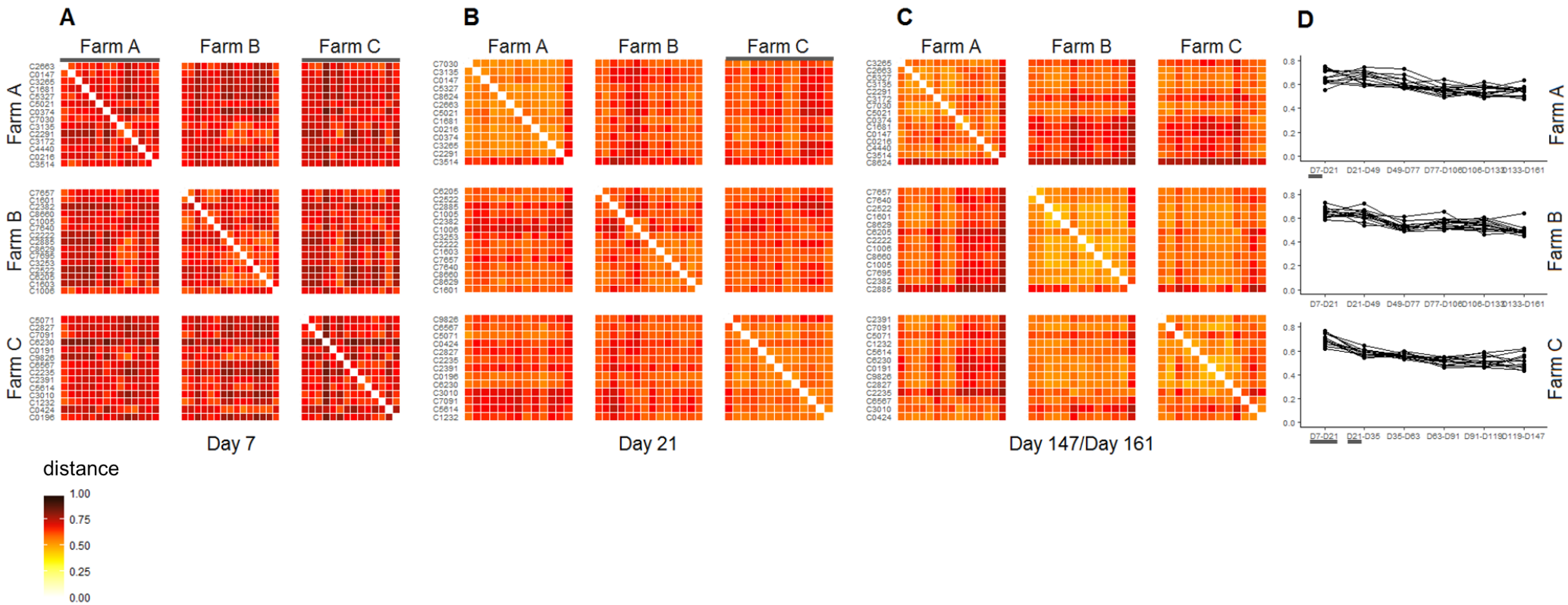


Figure 16. Boîtes à moustaches des distances Unifrac pondérées à chaque date d'échantillonnage. Les distances entre tous les veaux sont représentées en fonction des fermes. Les distances entre les veaux au sein des fermes A, B et C sont colorées respectivement en violet, orange et vert. Pour les distances entre les veaux de fermes différentes, le code couleur correspondant aux fermes est reporté à droite de la figure.

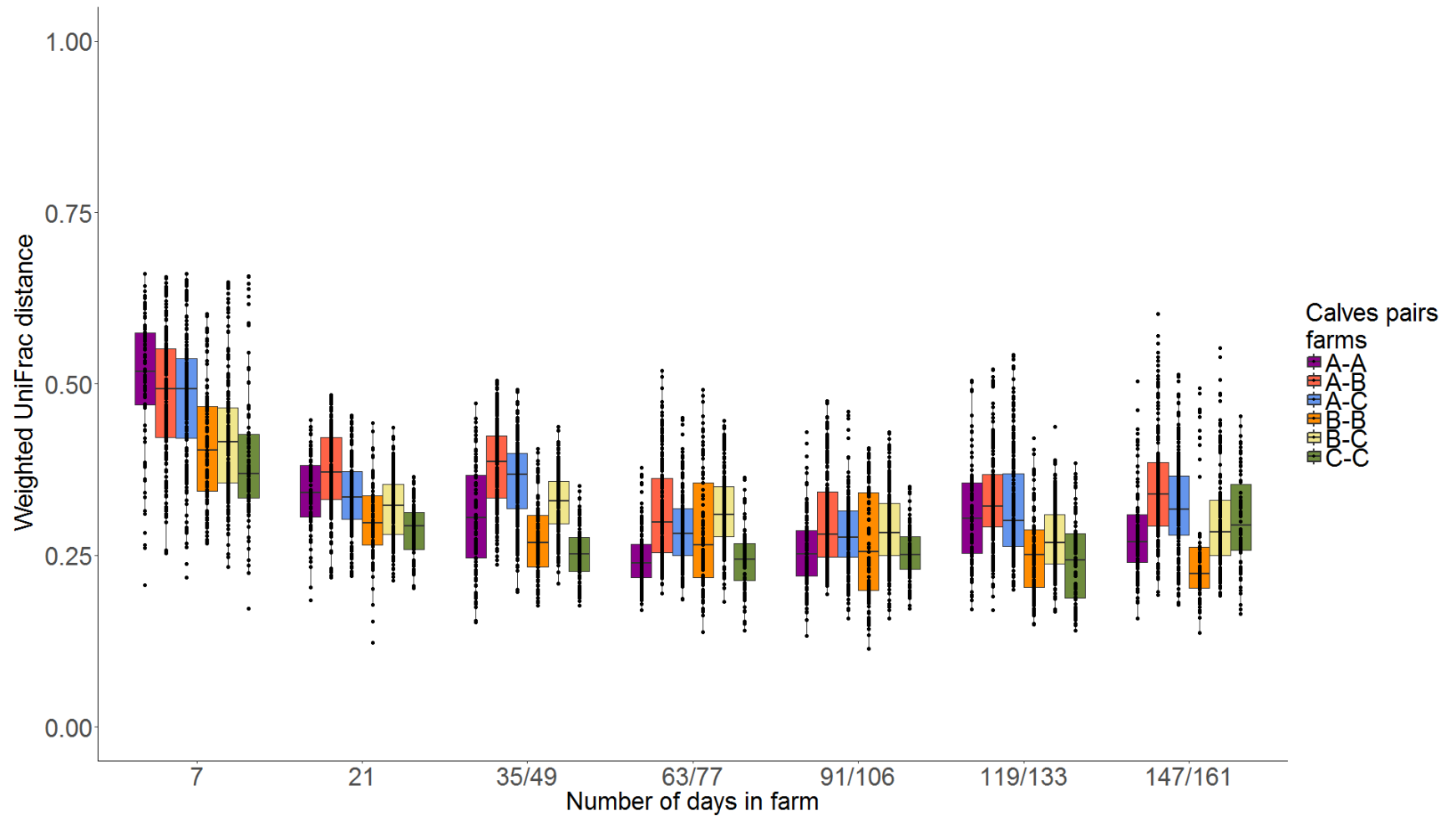
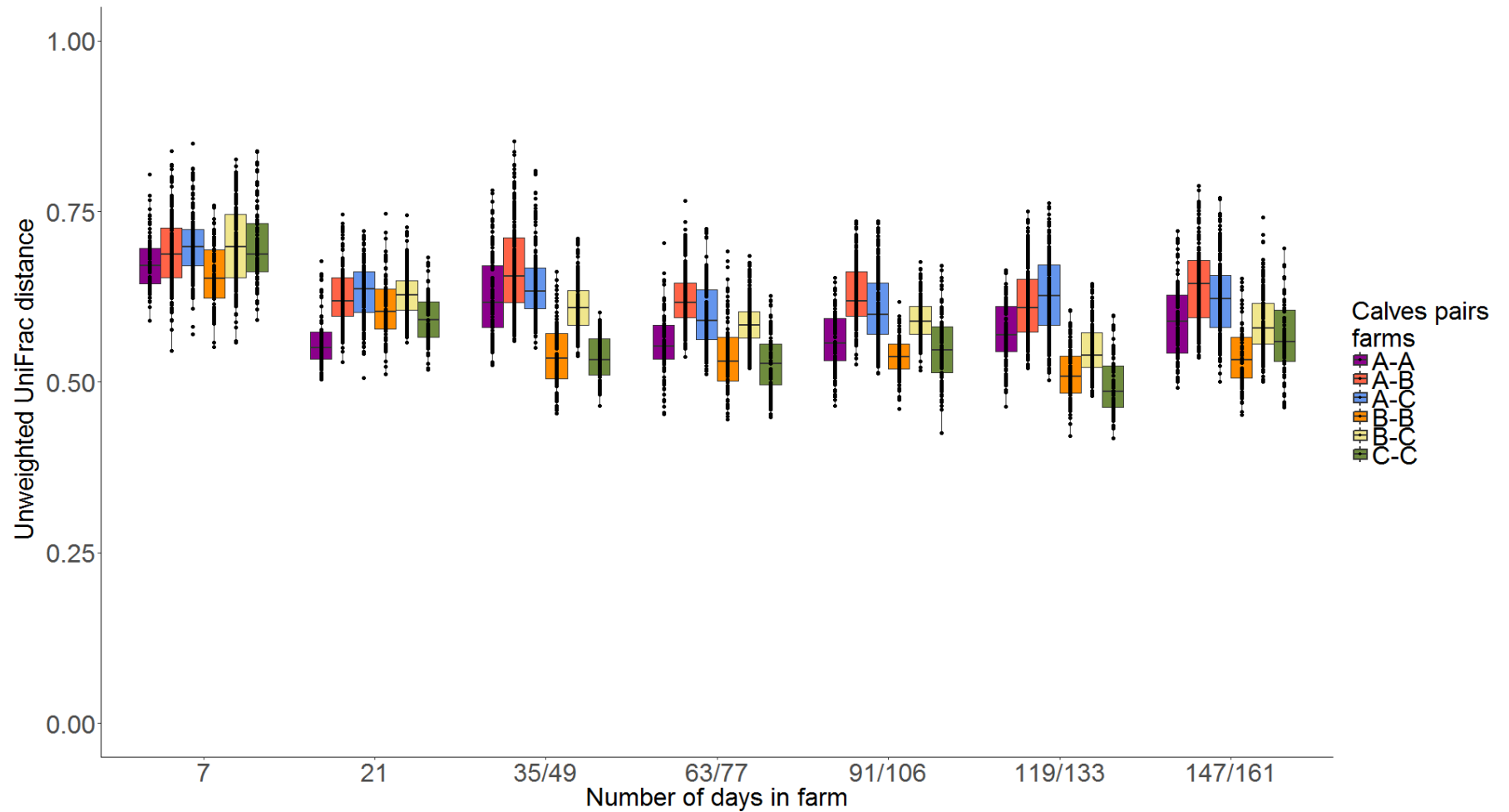


Figure 17. Boîtes à moustaches des distances Unifrac non pondérées à chaque date d'échantillonnage. Les distances entre tous les veaux sont représentées en fonction des fermes. Les distances entre les veaux au sein des fermes A, B et C sont colorées respectivement en violet, orange et vert. Pour les distances entre les veaux de fermes différentes, le code couleur correspondant aux fermes est reporté à droite de la figure.



Distances β intra-veaux

Les distances intra-individuelles entre échantillons consécutifs sont plus élevées entre le premier et le deuxième échantillonnage (c'est-à-dire le 7^{ème} et le 21^{ème} jour d'engraissement, Table 4). Les distances Unifrac pondérées entre le premier et le deuxième échantillonnage apparaissent plus grandes dans les fermes A et B que dans la ferme C (médianes à 0,45, 0,39 et 0,35 dans les fermes A, B et C, respectivement, Table 4, Figure 14D), excepté le veau C0196 dont la distance correspond à la distance intra-individuelle maximale entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour (et vaut 0,61). Ce veau était très éloigné des autres veaux de la ferme au 7^{ème} jour (Figure 14A) et très proche au 21^{ème} jour (Figure 14B). On voit que les distances entre échantillons consécutifs diminuent au fur et à mesure du temps, mais de manière différente entre les fermes (Figure 14D). Dans la ferme A, les distances consécutives diminuent beaucoup jusqu'au 106^{ème} jour d'engraissement (cinquième prélèvement) puis se stabilisent, tandis que l'amplitude de diminution est plus faible dans la ferme C, et augmentent pour certains veaux de la ferme B à partir du troisième prélèvement (Table 4, Figure 14D).

Les distances Unifrac pondérées entre le premier et le deuxième échantillonnage ne sont pas plus importantes chez les veaux sous antibiotiques (Table 4, Figure 14D, graphiques du haut et du bas) par rapport à ceux n'en ayant pas reçu (Table 4, Figure 14D, graphique du milieu).

Les mêmes tendances sont retrouvées en observant les distances Unifrac non pondérées intra-individuelles entre le premier et le deuxième échantillonnage (Table 5, Figure 14D). Toutefois, la diminution des distances au cours du temps est moins marquée, voire stagne à partir du début du quatrième prélèvement (Table 5, Figure 15D).

Table 4. Distribution des distances Unifrac pondérées entre les échantillons consécutifs des veaux au sein des trois fermes. « n » correspond au nombre de distances utilisées pour calculer la distribution et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.

Prélèvements	Ferme A						Ferme B						Ferme C					
	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile
1 ^{er} – 2 ^{ème}	12	0,45	0,31	0,58	0,40	0,55	14	0,39	0,25	0,54	0,34	0,42	13	0,35	0,24	0,61	0,31	0,40
2 ^{ème} – 3 ^{ème}	13	0,41	0,32	0,49	0,38	0,45	14	0,32	0,27	0,38	0,30	0,33	13	0,26	0,18	0,31	0,23	0,27
3 ^{ème} – 4 ^{ème}	15	0,34	0,16	0,46	0,32	0,37	15	0,24	0,21	0,44	0,22	0,30	14	0,23	0,19	0,31	0,21	0,26
4 ^{ème} – 5 ^{ème}	15	0,23	0,15	0,30	0,18	0,26	15	0,29	0,20	0,38	0,23	0,32	14	0,25	0,18	0,31	0,22	0,26
5 ^{ème} – 6 ^{ème}	15	0,26	0,17	0,43	0,22	0,31	15	0,28	0,19	0,43	0,22	0,32	14	0,21	0,18	0,36	0,19	0,25
6 ^{ème} – 7 ^{ème}	15	0,27	0,21	0,36	0,25	0,31	13	0,21	0,16	0,46	0,20	0,23	13	0,22	0,16	0,40	0,17	0,25

Table 5. Distribution des distances Unifrac non pondérées entre les échantillons consécutifs des veaux au sein des trois fermes. « n » correspond au nombre de distances utilisées pour calculer la distribution et dépend du nombre d'échantillons qui ont été retirés après raréfaction.

Prélèvements	Ferme A						Ferme B						Ferme C					
	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile	n	médiane	min	max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile
1 ^{er} – 2 ^{ème}	12	0,65	0,56	0,76	0,63	0,73	14	0,64	0,59	0,73	0,61	0,66	13	0,69	0,62	0,77	0,66	0,75
2 ^{ème} – 3 ^{ème}	13	0,66	0,59	0,74	0,61	0,70	14	0,63	0,54	0,72	0,61	0,65	13	0,59	0,54	0,65	0,56	0,60
3 ^{ème} – 4 ^{ème}	15	0,59	0,57	0,73	0,58	0,63	15	0,52	0,49	0,61	0,50	0,54	14	0,56	0,53	0,60	0,54	0,57
4 ^{ème} – 5 ^{ème}	15	0,55	0,49	0,64	0,53	0,57	15	0,56	0,50	0,65	0,52	0,57	14	0,51	0,46	0,55	0,49	0,54
5 ^{ème} – 6 ^{ème}	15	0,54	0,49	0,62	0,52	0,58	15	0,54	0,46	0,61	0,51	0,58	14	0,50	0,46	0,59	0,47	0,54
6 ^{ème} – 7 ^{ème}	15	0,55	0,48	0,64	0,54	0,57	13	0,49	0,45	0,64	0,47	0,49	13	0,51	0,43	0,62	0,46	0,55

Synthèse

Il existe une grande hétérogénéité dans la composition des microbiotes des veaux au 7^{ème} jour d'engraissement. Des changements au sein du microbiote fécal, collectifs et majeurs, ont lieu durant la deuxième et la troisième semaine, et aboutissent à une homogénéité entre les veaux à partir du 21^{ème} jour. Cette homogénéité au 21^{ème} jour persiste jusqu'à la fin de l'engraissement, en concomitance avec un ralentissement des variations temporelles intra-individuelles. Les distances Unifrac non pondérées montrent une ressemblance plus marquée dans les fermes au cours de l'engraissement, ce qui suggère que les veaux d'une même ferme partagent plus d'UTO. La dynamique des changements intra-individuels est différente entre les fermes, ce qui indique l'existence d'un effet de la ferme sur l'évolution de la communauté microbienne des veaux.

Aucun état, ni variation d'état dus à l'exposition de certains veaux à une pression antibiotique prolongée les jours précédents et au jour d'échantillonnage n'ont été mis en évidence.

(iii) *Dynamique temporelle de la diversité du microbiote fécal chez le veau*

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la diversité α , en étudiant l'indice de Shannon et le nombre d'UTO présents dans chaque échantillon.

Description de l'évolution des indices de diversité

Les évolutions de l'indice de Shannon et du nombre d'UTO pour chaque veau sont présentées respectivement dans la Figure 18 et la Figure 19. Dans la ferme A, l'indice de Shannon et le nombre d'UTO augmentent entre le 7^{ème} jour et le 21^{ème} jour. Dans les fermes B et C, l'indice de Shannon et le nombre d'UTO ont tendance à augmenter au cours du temps.

Figure 18. Graphiques en spaghetti des indices de Shannon par ferme.

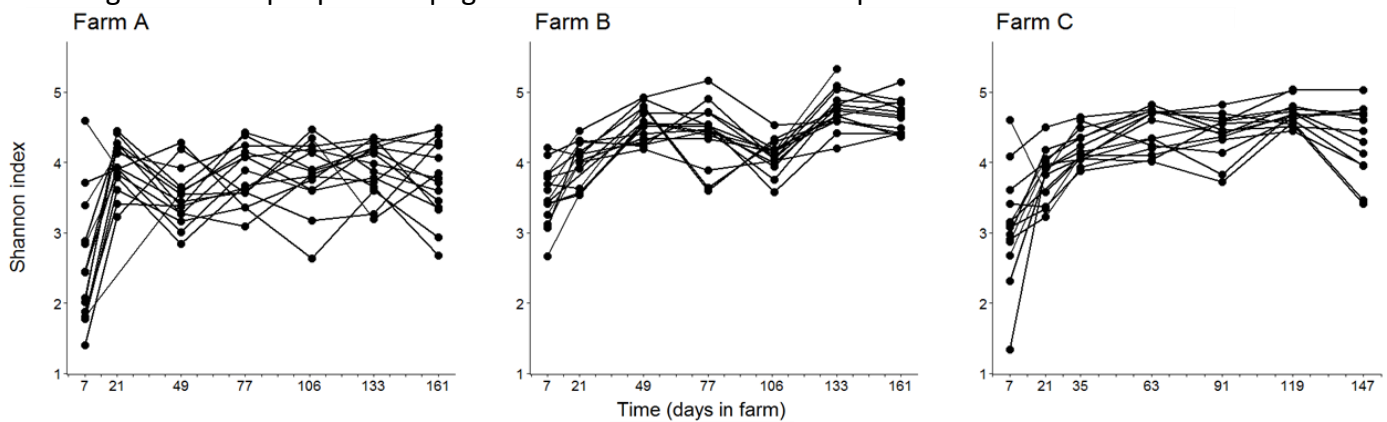
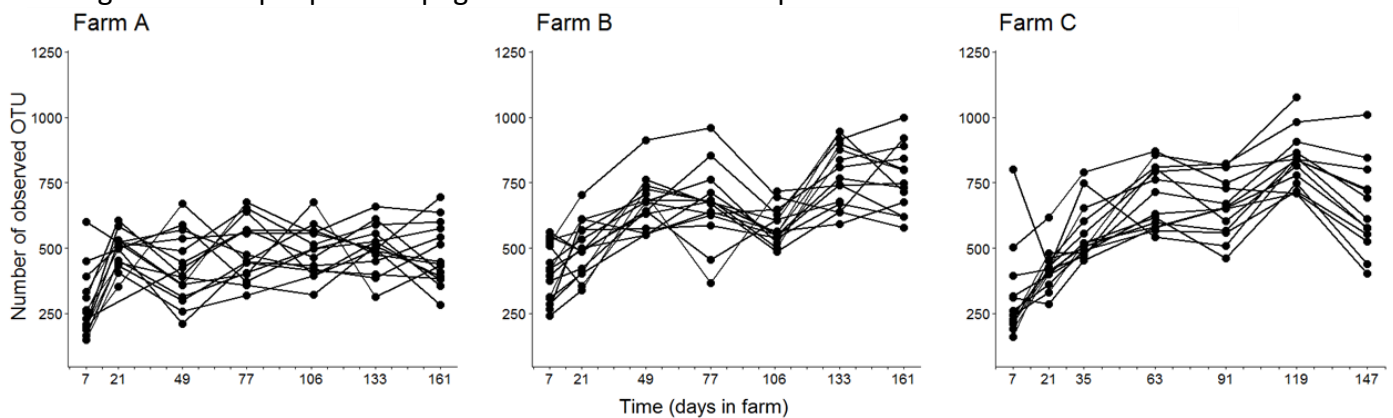


Figure 19. Graphiques en spaghetti du nombre d'UTO par ferme.



Evaluation de l'effet d'une antibiothérapie en cours et à distance des prélèvements sur la diversité du microbiote chez le veau

Au 7^{ème} jour d'engraissement, l'indice de Shannon était significativement plus faible chez les veaux sous antibiotiques par rapport à ceux n'en recevant pas (test de Wilcoxon, $p = 0,001$, Figure 20A). Dans la ferme A, il n'a pas été trouvé d'effet significatif des traitements antibiotiques reçus au cours de l'engraissement. Dans la ferme B, l'indice de Shannon était significativement plus petit au 21^{ème} jour qu'au 49^{ème} jour ($q = 0,001$, Figure 21). Dans la ferme C, l'indice de Shannon était significativement plus petit au 21^{ème} jour qu'au 35^{ème} jour ($q = 0,002$, respectivement, Figure 21). Les veaux de la ferme C étaient sous traitement antibiotique le 21^{ème} jour. On observe également une diminution significative du nombre d'UTO chez les veaux sous antibiotiques au 7^{ème} jour par rapport aux autres (test de Wilcoxon, $q = 0,001$, Figure 22A) et on retrouve les mêmes différences significatives entre les jours d'échantillonnage dans chaque ferme (Figure 21).

Il est peu probable que l'augmentation de la diversité dans la ferme B soit due au traitement antibiotique reçu entre les deux prélèvements. Plusieurs arguments vont dans le sens contraire de cette association positive. De nombreuses études ont montré que les traitements antibiotiques, quelles que soient leur durée et la nature de la molécule, avaient un effet négatif sur la diversité (120, 121), et au mieux n'avait pas d'effet visible. De plus, les prélèvements ont été réalisés à plusieurs jours d'intervalle du traitement antibiotique. Le schéma d'échantillonnage est donc mal adapté pour capter l'effet des traitements antibiotiques ayant lieu au cours de l'engraissement, qui par ailleurs ne durent qu'une journée dans les fermes A et B. Le lien positif trouvé dans la ferme B est sans doute dû à une évolution naturelle, d'autant que la même tendance s'observe chez les veaux des fermes A et C à la même période (Figure 21).

Figure 20. (A) Distribution de l'indice de Shannon au 7^{ème} jour en fonction de l'existence d'un traitement antibiotique. Les quartiles et les valeurs minimales et maximales sont indiqués par les boîtes à moustaches. Les échantillons sont indiqués par des points et colorés en fonction de la ferme. (B) Evolution de l'indice de Shannon au sein de chaque ferme et profil prédit par le modèle final. Pour chaque ferme, les valeurs moyennes des données observées +/- les écart-types sont indiqués respectivement par des points et des barres d'erreur en pointillés. Les profils prédits et leur intervalle de confiance à 95% sont représentés respectivement par des traits pleins et par des rubans. Les traitements antibiotiques reçus dans les premières semaines dans les fermes A et C sont indiqués en bas de la figure.

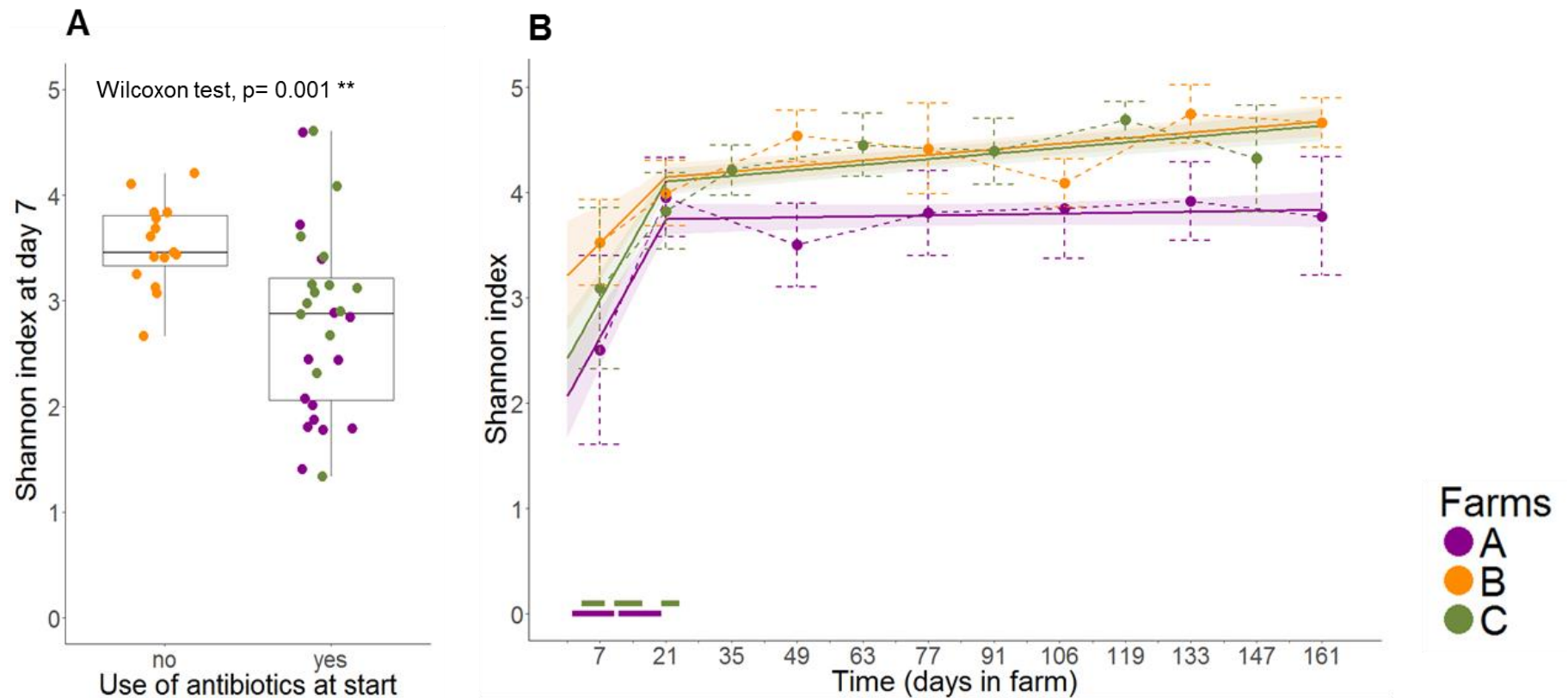


Figure 21. Distribution de l'indice de Shannon et du nombre d'UTO dans chaque ferme pour des échantillons consécutifs réalisés avant et après un traitement antibiotique. Les valeurs de q correspondent aux valeurs de p corrigées des 12 tests de Wilcoxon par la méthode de Benjamini et Hochberg. Sur chaque abscisse, le premier et le deuxième jour indiqués correspondent respectivement au jour de prélèvement avant et après le traitement antibiotique, excepté pour les prélèvements aux 21^{ème} et 35^{ème} jours dans la ferme C (les veaux sont déjà sous traitement le 21^{ème} jour).

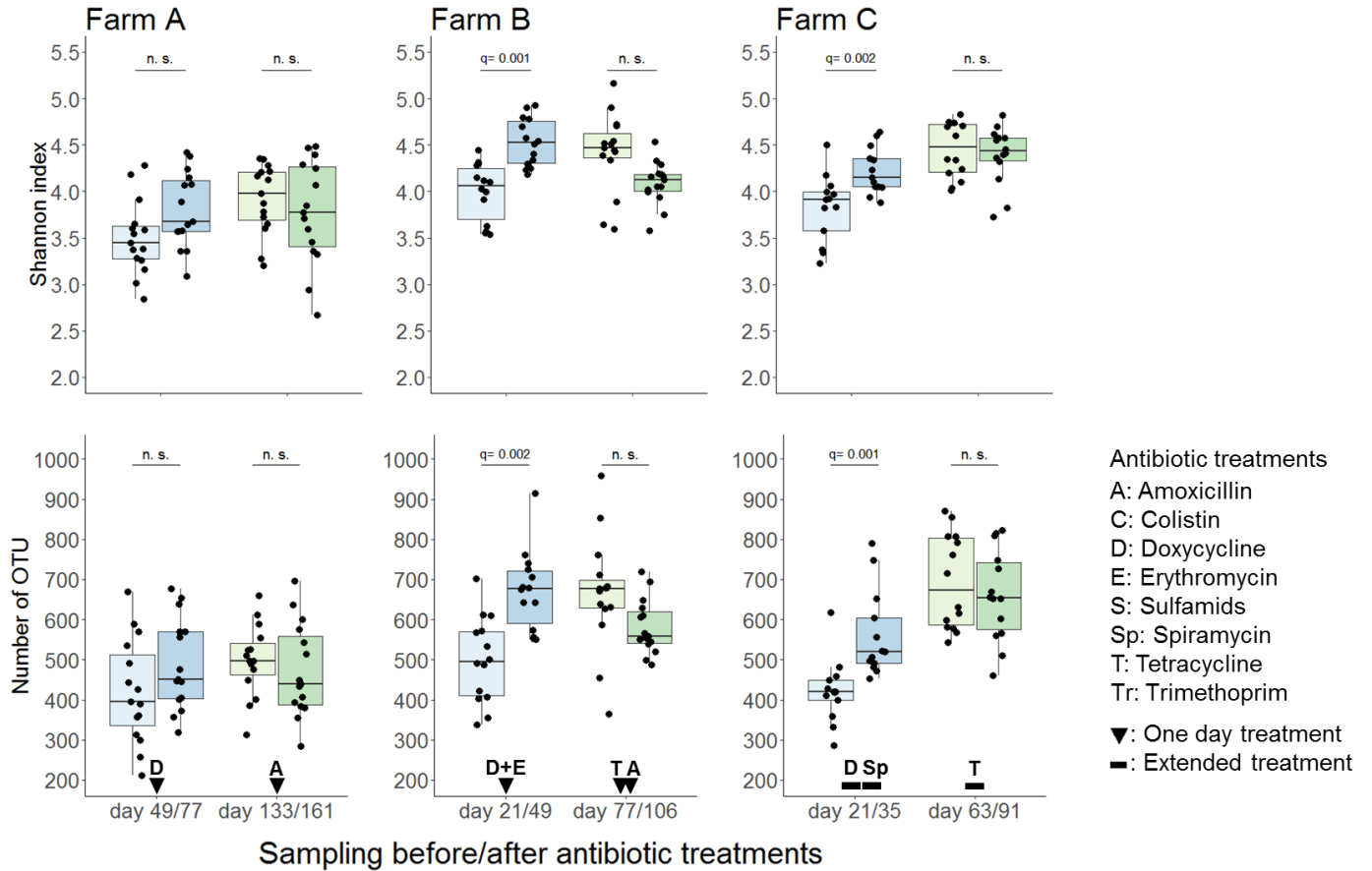
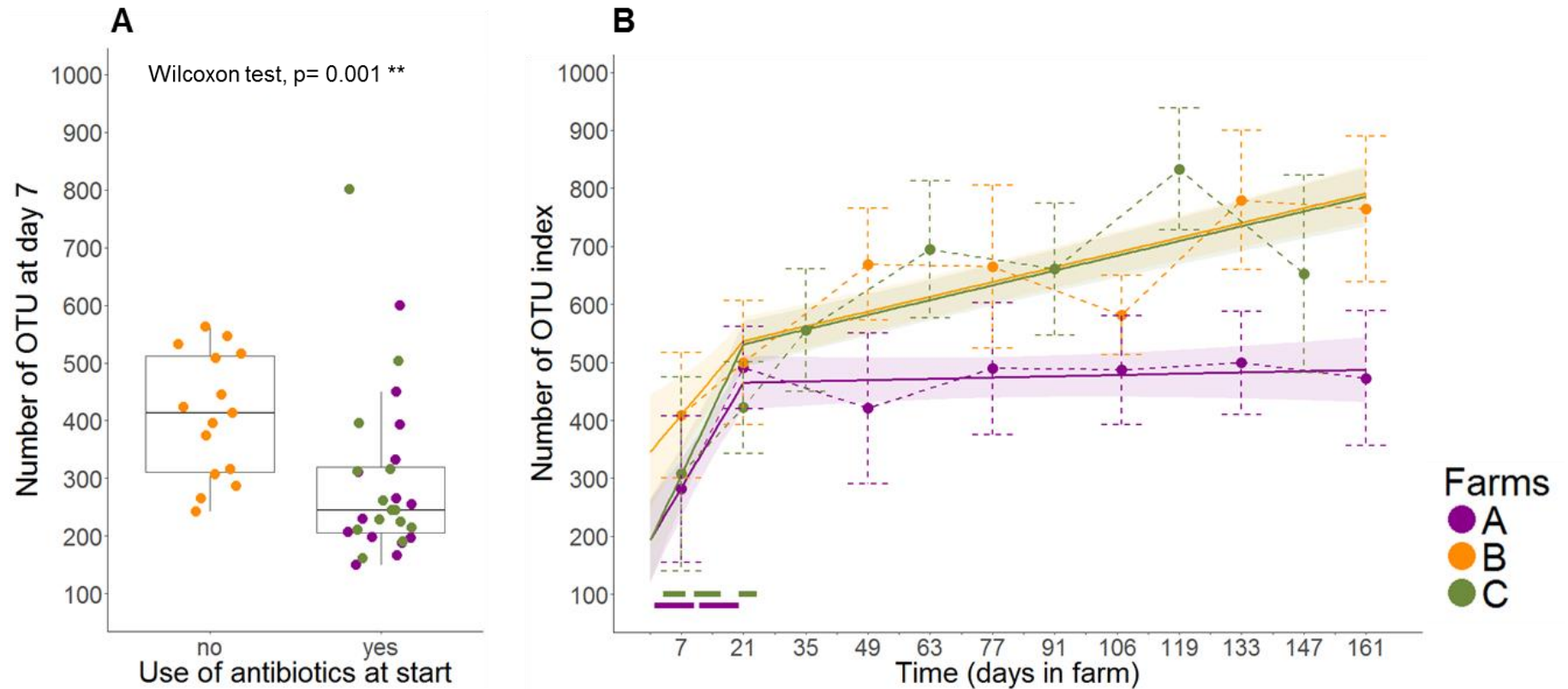


Figure 22. (A) Distribution du nombre d'UTO au 7^{ème} jour en fonction de l'existence d'un traitement antibiotique. Les quartiles et les valeurs minimales et maximales sont indiqués par les boîtes à moustaches. Les échantillons sont indiqués par des points et colorés en fonction de la ferme. (B) Evolution du nombre d'UTO au sein de chaque ferme et profil prédit par le modèle final. Pour chaque ferme, les valeurs moyennes des données observées +/- les écart-types sont indiqués respectivement par des points et des barres d'erreur en pointillés. Les profils prédits et leur intervalle de confiance à 95% sont représentés respectivement par des traits pleins et par des rubans. Les traitements antibiotiques reçus dans les premières semaines dans les fermes A et C sont indiqués en bas de la figure.



Suivi longitudinal de la diversité du microbiote chez le veau

L'évolution de l'indice de Shannon était mieux décrite par le modèle à deux pentes que par le modèle à une pente (test du rapport de vraisemblance, $p < 10^{-15}$). Les résultats du meilleur modèle sont présentés dans la Figure 20B et la Table 6. L'ordonnée à l'origine était différente entre les trois fermes, et plus faible dans les fermes A et C par rapport à la ferme B. Les effets des fermes A et C n'étaient pas significativement différents sur la première pente. Les effets des fermes B et C n'étaient pas significativement différents sur la seconde pente. Les graphiques de validation des modèles n'ont pas montré de déficience dans l'ajustement des modèles. Les résidus en fonction du temps sont présentés dans l'annexe 2. La différence d'effet entre la ferme B et les fermes A et C sur l'ordonnée à l'origine et l'augmentation de l'indice de Shannon lors des 21 premiers jours pourrait être dû à l'existence de traitements antibiotiques dans ces fermes pendant cette période (Figure 20B). La différence d'effet au niveau de l'ordonnée à l'origine entre ces deux fermes pourrait s'expliquer par le nombre de jours de traitement antibiotique durant la première semaine, et qui a démarré deux jours plus tôt dans la ferme A (Figure 20B).

Table 6. Paramètres estimés par le modèle final pour l'indice de Shannon. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, ω la variabilité inter-individuelle des effets aléatoires, et σ la variabilité résiduelle. La ferme de référence utilisée pour chaque paramètre est indiquée entre parenthèses.

Paramètre/coefficient	Estimation	Ecart-type	IC _{95%}	p
Ordonnée à l'origine μ_0 (ferme A)	2,07	0,20	[1,68; 2,46]	< 10⁻¹⁵
$\beta_{0,B}$	1,14	0,34	[0,49; 1,80]	0,0008
$\beta_{0,C}$	0,35	0,10	[-1,44; -0,13]	0,003
ω_0	0,85	-	[0,63; 1,16]	-
Première pente μ_1 (ferme B)	0,044	0,013	[0,019; 0,070]	0,0007
$\beta_{1,AC}$	0,035	0,016	[0,004; 0,067]	0,03
ω_1	0,038	-	[0,026; 0,055]	-
Seconde pente μ_2 (ferme A)	0,0006	0,0009	[-0,0011; 0,0023]	0,5
$\beta_{2,BC}$	0,0032	0,0011	[0,0010; 0,0053]	0,004
ω_2	0,0009	-	[0,0001; 0,0108]	-
σ	0,37	-	[0,33; 0,41]	-

L'évolution du nombre d'UTO était également mieux décrite par le modèle à deux pentes (test du rapport de vraisemblance, $p = 10^{-11}$). Les résultats du meilleur modèle sont présentés dans la Figure 22B et la Table 7. Les effets des fermes A et C n'étaient pas significativement différents sur l'ordonnée à l'origine. La première pente était différente entre les trois fermes. Les effets des fermes B et C n'étaient pas significativement différents sur la seconde pente. Les graphiques de validation n'ont pas montré de déficience dans l'ajustement des modèles. Les résidus en fonction du temps sont présentés dans l'annexe 2.

La différence d'effet sur l'ordonnée à l'origine entre la ferme B et les fermes A et C pourrait être due aux traitements antibiotiques durant la première semaine dans les fermes A et C.

Table 7. Paramètres estimés par le modèle final pour le nombre d'UTO. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, ω la variabilité inter-individuelle des effets aléatoires, et σ la variabilité résiduelle. La ferme de référence utilisée pour chaque paramètre est indiquée entre parenthèses.

Paramètre/coefficient	Estimation	Ecart-type	IC _{95%}	p
Ordonnée à l'origine μ_0 (ferme B)	345,4	50,7	[246,6; 444,1]	< 10⁻¹⁵
$\beta_{0,AC}$	-152,4	62,6	[-274,3; -30,4]	0,02
ω_0	92,7	-	[0,63; 1,16]	-
Première pente μ_1 (ferme A)	12,95	2,11	[8,84; 17,07]	< 10⁻¹⁵
$\beta_{1,B}$	-3,83	3,30	[-10,25; 2,57]	0,2
$\beta_{1,C}$	3,15	1,51	[0,22; 6,08]	0,04
ω_1	2,73	-	[0,55; 13,56]	-
Seconde pente μ_2 (ferme A)	0,16	0,27	[-0,37; 0,69]	0,6
$\beta_{2,BC}$	1,66	0,34	[1,00; 2,32]	< 10⁻¹⁵
ω_2	0,40	-	[0,10; 1,67]	-
σ	111,3	-	[101,2; 122,3]	-

Synthèse

L'évolution au cours du temps de la diversité α est biphasique, avec une augmentation rapide et commune aux veaux des trois fermes entre la première et la troisième semaine, puis un ralentissement de la vitesse d'augmentation, voire une stagnation dans la ferme A, jusqu'en fin d'engraissement. L'augmentation durable dans les fermes B et C explique l'augmentation significative des indices de diversité entre le prélèvement au 21^{ème} jour et le suivant, malgré les traitements antibiotiques reçus entre-temps (Figure 21). Le regroupement des fermes A et C sur l'ordonnée à l'origine pour le nombre d'UTO et la première pente pour l'indice de Shannon laisse supposer l'existence d'un effet des antibiothérapies en début d'engraissement quand l'échantillonnage a lieu en cours de traitement, et fait suite à plusieurs jours d'antibiothérapie. Un nombre de jours de traitement plus long dans la ferme A pourrait entraîner une estimation plus faible de l'indice de Shannon et une augmentation du nombre d'UTO plus faible au cours des 21 premiers jours. Au cours de la deuxième période, la trajectoire différente de la ferme A par rapport aux autres fermes ne semble pas s'expliquer par l'exposition aux antibiotiques.

(iv) *Variabilité temporelle à différents échelles taxonomiques de la composition microbienne entre et au sein des veaux*

Dans un troisième temps, la composition microbienne et son évolution ont été comparées entre les veaux de fermes différentes à l'échelle du phylum et du genre. L'effet de l'antibiothérapie sur les abondances relatives des quatre phyla dominants et de l'abondance relative totale des autres phyla a été évalué au 7^{ème} jour. Des modèles linéaires à effets mixtes ont été utilisés pour identifier une tendance à l'appauvrissement ou à l'enrichissement du microbiote en chacun des quatre phyla au cours du temps.

Phylum

Dix-neuf phyla ont été identifiés dans le microbiote fécal des veaux, dont quatre ayant une fréquence supérieure à 1% sur la totalité des séquences. Les quatre phyla quantitativement dominants sont, par ordre décroissant, les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobactéries et les Protéobactéries. Ces quatre phyla représentent 97,0% des séquences. Globalement, les Firmicutes et les Bacteroidetes sont dix fois plus abondants que les Actinobactéries et les Protéobactéries (respectivement 47,8%, 40,0%, 5,1% et 4,1% de la totalité des séquences). Les moyennes et écart-types des abondances relatives de ces phyla ont été représentés à chaque jour dans les trois fermes (Figure 23).

Au 7^{ème} jour, il n'existe pas de différence significative d'abondances relatives des quatre phyla majoritaires, ni de celles des phyla minoritaires (tests de Wilcoxon, $q = 0,3, 0,3, 0,3, 0,3$ et $0,08$, pour les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobactéries, Protéobactéries, et les phyla minoritaires, respectivement) entre les veaux traités et non traités.

Les résultats de la modélisation de l'évolution temporelle des phyla sont présentés dans la Table 8. Les Firmicutes et les Bacteroidetes dominent quantitativement le microbiote des veaux durant toute la période et leur abondance relative varie très peu au cours du temps (Figure 23). Les Firmicutes sont plus abondants dans les premiers prélèvements, puis sont retrouvés dans les mêmes proportions que les Bacteroidetes. Quand le microbiote s'enrichit en l'un, il s'appauvrit en l'autre. L'évolution dans le temps de ces deux phyla est homogène entre les fermes. Les graphiques de validation n'ont pas montré de déficience dans l'ajustement des modèles. Les résidus en fonction du temps sont présentés dans l'annexe 2.

Figure 23. Abondances relatives moyennes +/- écart-types des quatre principaux phyla à chaque échantillonnage dans les fermes A, B et C. Les traitements antibiotiques en début d'engraissement sont indiqués par des barres au-dessus de l'abscisse dans les fermes A et C.

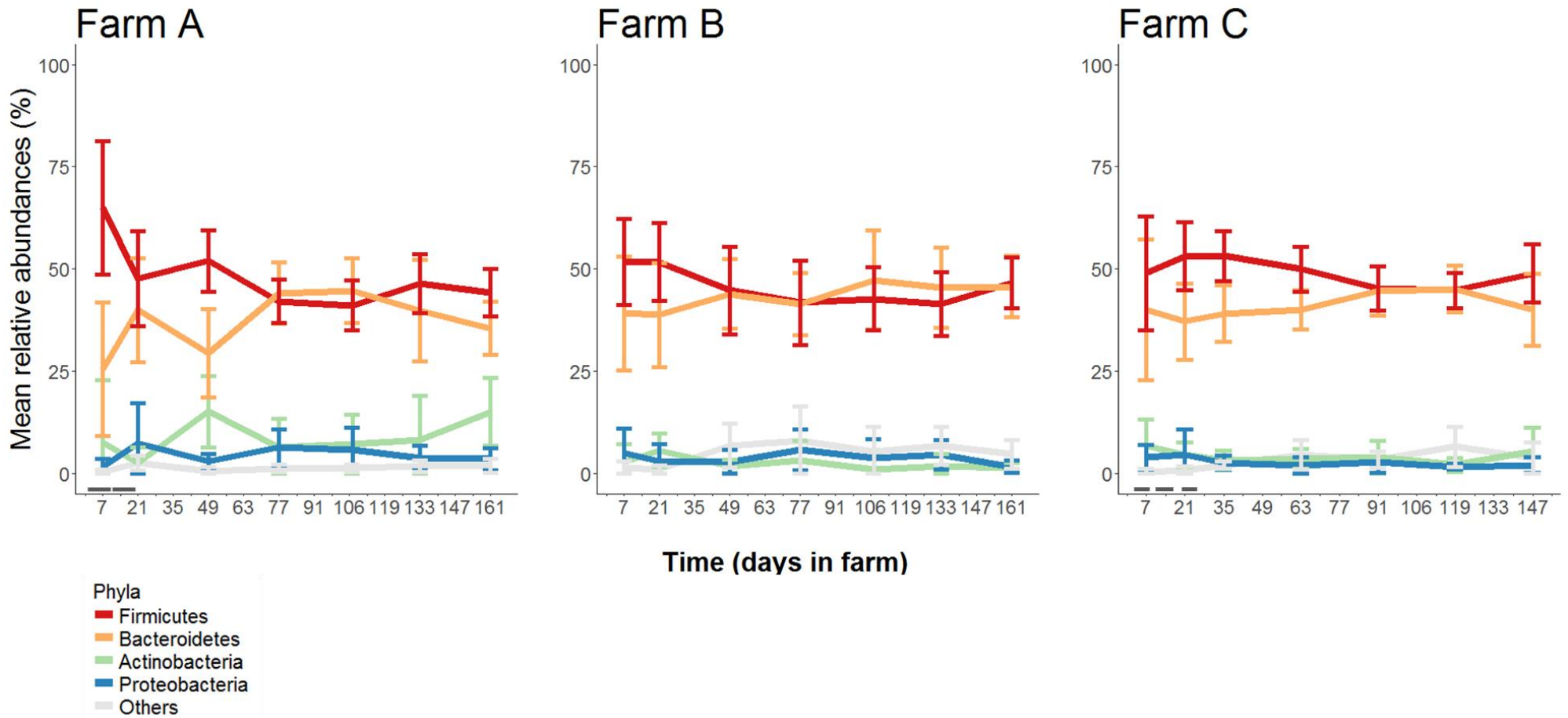


Table 8. Paramètres estimés par ferme pour les quatre principaux phyla. La ferme A a été choisie comme catégorie de référence. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, et σ la variabilité résiduelle. « NE » signifie « Non Estimé ».

Paramètre/ coefficient	Firmicutes			Bacteroidetes			Actinobacteria			Proteobacteria		
	Estimation	IC _{95%}	p	Estimation	IC _{95%}	p	Estimation	IC _{95%}	p	Estimation	IC _{95%}	p
Ordonnée à l'origine μ_0 (Ferme A)	1,73	[1,7;1,76]	< 10⁻¹⁵	1,41	[1,32;1,5]	< 10⁻¹⁵	0,27	[0,06;0,47]	0,01	0,31	[0,17;0,44]	< 10⁻¹⁵
$\beta_{0,B}$	-0,04	[-0,093;0,0039]	0,07	0,16	[0,02;0,29]	0,02	-0,03	[-0,33;0,27]	0,8	0,12	[-0,07;0,32]	0,2
$\beta_{0,C}$	-0,02	[-0,073;0,025]	0,3	0,13	[-0,0047;0,2623]	0,06	0,22	[-0,08;0,52]	0,2	0,14	[-0,06;0,34]	0,2
ω_0	0,037	[0,018;0,074]	-	0,122	[0,078;0,192]	-	0,25	[0,14;0,44]	-	0,00038	NE	-
Pente μ_1 (Ferme A)	-0,0007	[-0,001;-0,0004]	< 10⁻¹⁵	0,0014	[0,0005;0,0023]	0,003	0,0046	[0,0026;0,0067]	< 10⁻¹⁵	0,0017	[0,0003;0,0032]	0,02
$\beta_{1,B}$	0,0002	[-0,0002;0,0008]	0,2	-0,0008	[-0,0021;0,0005]	0,3	-0,0062	[-0,0091;-0,0033]	< 10⁻¹⁵	-0,0022	[-0,0042;-0,0002]	0,03
$\beta_{1,C}$	0,0004	[-0,0001;0,0009]	0,09	-0,0007	[-0,002;0,0007]	0,3	-0,0057	[-0,0087;-0,0026]	0,0003	-0,0039	[-0,0061;-0,0018]	0,0005
ω_1	0,0003	[0,0001;0,0007]	-	0,001	[0,001;0,002]	-	0,002	[0,001;0,004]	-	0,00002	NE	-
σ	0,08	[0,07;0,09]	-	0,19	[0,18;0,21]	-	0,47	[0,43;0,51]	-	0,39	[0,36;0,43]	-

Les abondances relatives des Actinobactéries et des Protéobactéries dans les fermes B et C fluctuent assez peu au cours du temps et sont faibles, contrairement à la ferme A. Dans cette ferme, l'abondance relative des Actinobactéries se rapproche de celle des Bacteroidetes à plusieurs dates de prélèvement (Figure 23).

Genre

Trois cent quarante-neuf genres ont été identifiés dans le microbiote fécal des veaux. Parmi eux, 76 (21,8%) font partie des dix genres les plus abondants dans au moins un échantillon. La proportion médiane de séquences appartenant aux dix genres dominants était de 78,8% (minimum et maximum respectivement à 63,9% et 99,2%). Les abondances relatives de ces genres sont présentées pour chaque veau au 7^{ème}, 21^{ème} et dernier jour d'engraissement (Figure 24A, Figure 24B et Figure 24C, respectivement).

Au 7^{ème} jour, la médiane de la somme des abondances relatives des 10 genres dominants était de 89,8% (minimum et maximum respectivement à 65,8% et 99,2%, Figure 24A). Les trois taxa les plus répandus parmi les veaux sont le genre *Bacteroides*, un groupe de bactéries non classifiées de la famille des *Lachnospiraceae*, et le genre *Alloprevotella*, partagés respectivement par 36, 34 et 32 veaux. Les genres *Lactobacillus*, *Megamonas* et *Bifidobacterium* ont été trouvés au moins une fois avec une abondance relative supérieure à 50%. *Lactobacillus* a été retrouvé présent à plus de 50% chez trois veaux de fermes différentes (veaux C4440, C1006 et C0196 des fermes A, B et C, respectivement). *Megamonas* s'est retrouvé à plus de 50% chez deux veaux de la ferme A (veaux C0374, C5021) et *Bifidobacterium* chez un veau de la ferme A (C3514). Les six veaux ont un indice de Shannon inférieur à 3 et un nombre d'UTO inférieur à 250. Ces nombres bas sont cohérents avec la surabondance de genres particuliers. Par ailleurs, les traitements antibiotiques en cours lors de cet échantillonnage n'ont pas fait émerger ou disparaître de genres dominants chez les veaux des fermes A et C différents de ceux de la ferme B.

Au 21^{ème} jour, la médiane de la somme des abondances relatives des 10 genres dominants était de 78,4% (minimum et maximum respectivement à 66,3% et 89,4%, Figure 24B). Chez tous les veaux, la différence d'abondances relatives de la majorité des genres ne dépassait pas 10% entre le 7^{ème} jour et le 21^{ème} jour (Figure 25). Chez la plupart des veaux, on observe des fluctuations plus importantes entre les deux jours pour quelques genres, avec des amplitudes de

diminutions plus importantes chez les veaux de la ferme A (Figure 25). Ces fluctuations semblent propres à chaque veau, et on n’observe pas de genres qui augmentent ou qui chutent de manière importante chez tous les veaux. L’abondance maximale au 21^{ème} jour ne dépasse pas 40%. Les trois taxa les plus répandus sont les genres *Prevotella*, et *Faecalibacterium*, et un groupe de bactéries non classifiées de la famille des *Ruminococcaceae*, partagés par respectivement 43, 41 et 39 veaux.

Au dernier jour, la médiane de la somme des abondances relatives des 10 genres dominants était de 77,3% (minimum et maximum respectivement à 68,3% et 96,0%) du microbiote des veaux (Figure 24C). L’abondance maximale des genres dominants ne dépasse pas 40%. Les trois taxa les plus répandus parmi les veaux sont le genre *Prevotella*, un groupe de bactéries non classifiées de la famille des *Ruminococcaceae*, et le genre *Faecalibacterium*, partagés respectivement par 42, 38 et 36 veaux. A cette date, les veaux partagent plus de genres au sein des phyla Firmicutes et Bacteroidetes. *Bifidobacterium* est présent chez 14, 2 et 5 veaux des fermes A, B et C, respectivement, et représente le premier ou le deuxième genre le plus abondant chez 10 veaux de la ferme A et un veau de la ferme C. La distribution des abondances relatives des genres dominants aux autres prélèvements est présentée dans l’annexe 3 et montre une homogénéisation continue au cours du temps et commune aux trois fermes des 10 genres les plus abondants.

Figure 24. Page ci-après. Abondances relatives des 10 taxa les plus abondants à l’échelle des genres chez tous les veaux au (A) premier échantillonnage (7^{ème} jour), (B) deuxième échantillonnage (21^{ème} jour) et (C) dernier échantillonnage (161^{ème} jour dans les fermes A et B, 147^{ème} dans la ferme C).

Les veaux sont ordonnés au sein de chaque ferme selon les valeurs croissantes d’indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut de chaque graphique. Les points sous les graphiques indiquent l’indice de Shannon (points du haut) et le nombre d’UTO (points du bas). Les points gris représentent les échantillons pour lesquels la diversité n’a pas été étudiée. Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes.

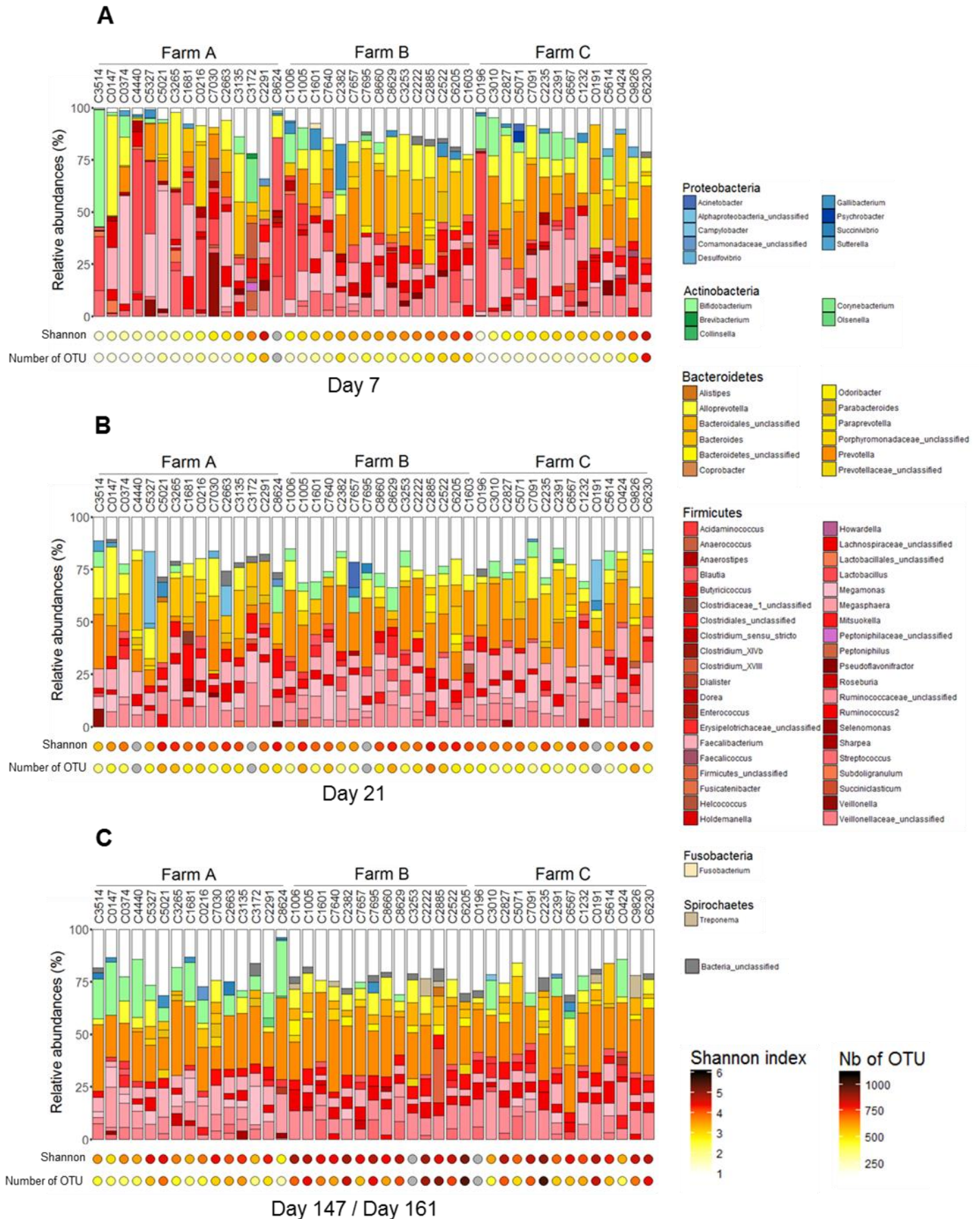
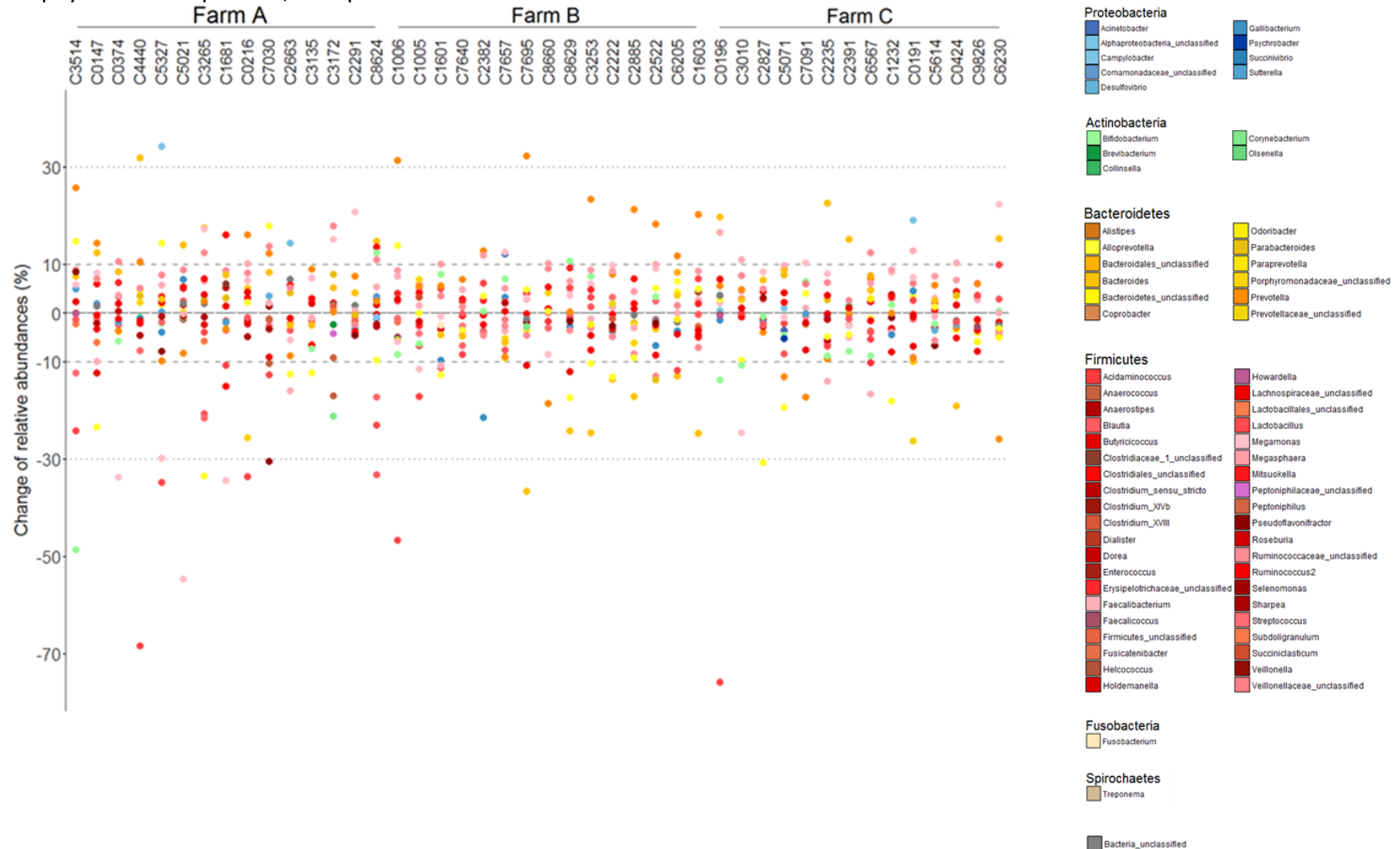


Figure 25. Différence d'abondances relatives entre le premier échantillonnage (7^{ème} jour) et le deuxième (21^{ème} jour) des 10 taxa les plus abondants à l'échelle du genre chez tous les veaux. Les veaux sont ordonnés au sein de chaque ferme selon les valeurs croissantes d'indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut du graphique. Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes.



Synthèse

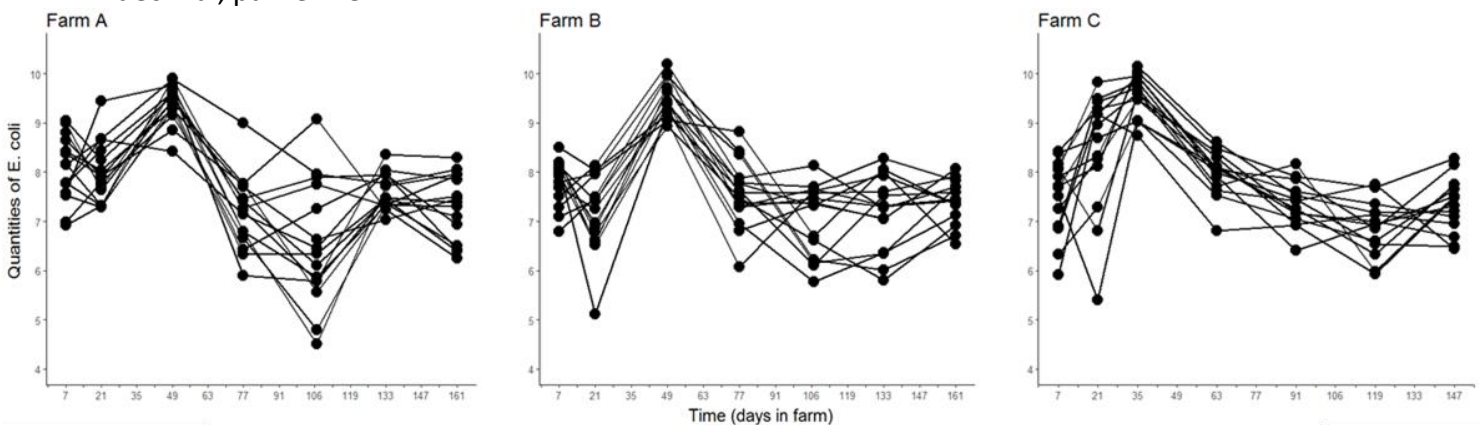
Les Firmicutes et les Bacteroidetes dominent le microbiote des veaux durant toute la période d'engraissement. Le microbiote s'appauvrit dans le temps en bactéries du phylum Firmicutes, conjointement à un enrichissement en bactéries du phylum Bacteroidetes. L'ampleur de ces changements est important chez les veaux de la ferme A, dont plusieurs sont largement dominés par des genres du phylum Firmicutes au début de l'engraissement. Les deux phyla atteignent des niveaux d'abondances similaires dès le milieu de la période d'engraissement dans les trois fermes. La communauté bactérienne dominante s'homogénéise entre tous les veaux au cours du temps. Le genre *Prevotella* du phylum Bacteroidetes émerge au cours de l'engraissement, et fini par s'imposer comme le genre dominant le plus répandu à la fin de l'engraissement. Des différences entre les fermes s'observent au niveau des genres dominants appartenant aux Actinobactéries et aux Protéobactéries. On retrouve des genres dominants de ces phyla de manière ponctuelle dans les fermes B et C, tandis que dans la ferme A, un genre émerge dans l'ensemble des veaux à certains temps d'échantillonnage (par exemple, le genre *Bifidobacterium*, du phylum des Actinobactéries, qui est dominant chez 14 veaux au dernier jour d'engraissement).

Au 7^{ème} jour, il existe un déséquilibre important dans le microbiote de plusieurs veaux, avec un seul genre bactérien présent à plus de 50%. Un tel déséquilibre ne s'observe plus au cours de l'engraissement. Des différences importantes s'observent entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour, avec un changement dans les taxa bactériens les plus répandus parmi les veaux et une diminution de l'abondance globale des 10 genres dominants, cohérents avec l'augmentation de la diversité α .

(v) *Dynamique d'E. coli et influence de son environnement*Dynamique temporelle de l'espèce *E. coli*

L'évolution au cours du temps du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces observé est présentée dans la Figure 26. Au 7^{ème} jour d'engraissement, le nombre médian d'*E. coli/g* excrété par les veaux des fermes A, B et C était respectivement de 7,7, 7,6 et 7,7 *E. coli/g* (minimum-maximum valant respectivement 4,5 - 9,9, 5,1 - 10,2 et 5,4 - 10,1, Figure 26). Les quantités n'étaient pas significativement différentes entre les veaux sous antibiotiques et ceux n'en recevant pas (test de Wilcoxon, $p = 0,96$, Figure 27A). Par la suite, on observe une évolution dans le temps commune aux trois fermes. La taille de population est multipliée un peu moins de 100 fois au cours des premières semaines d'engraissement pour atteindre un pic au début du deuxième mois d'engraissement dans chacune des trois fermes (médiane à 9,4, 9,4, et 9,6 et minimum/maximum à 8,4/9,9, 8,9/10,2, 8,7/10,1 dans les fermes A, B et C, respectivement, Figure 27B). Ensuite, les *E. coli* diminuent dès la fin du deuxième mois d'engraissement et tombent à des valeurs légèrement inférieures aux valeurs initiales, avant le pic.

Figure 26. Spaghetti plots du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces exprimé en logarithme décimal, par ferme.



L'évolution des quantités d'*E. coli* était mieux décrite par le modèle polynomial d'ordre 4 (test du rapport de vraisemblance entre les modèles polynomiaux d'ordre 3 et 4, $p = 0,01$). Les effets des fermes A et C sur le terme constant par rapport à la ferme B n'étaient pas significatif et ont donc été retirés du modèle. Les effets des fermes A et C n'étaient pas significativement différents sur les paramètres et ont donc été regroupés. Le modèle décrivant le mieux les données ne comportait pas d'effet aléatoire. Les paramètres estimés par le modèle avec l'effet des fermes A

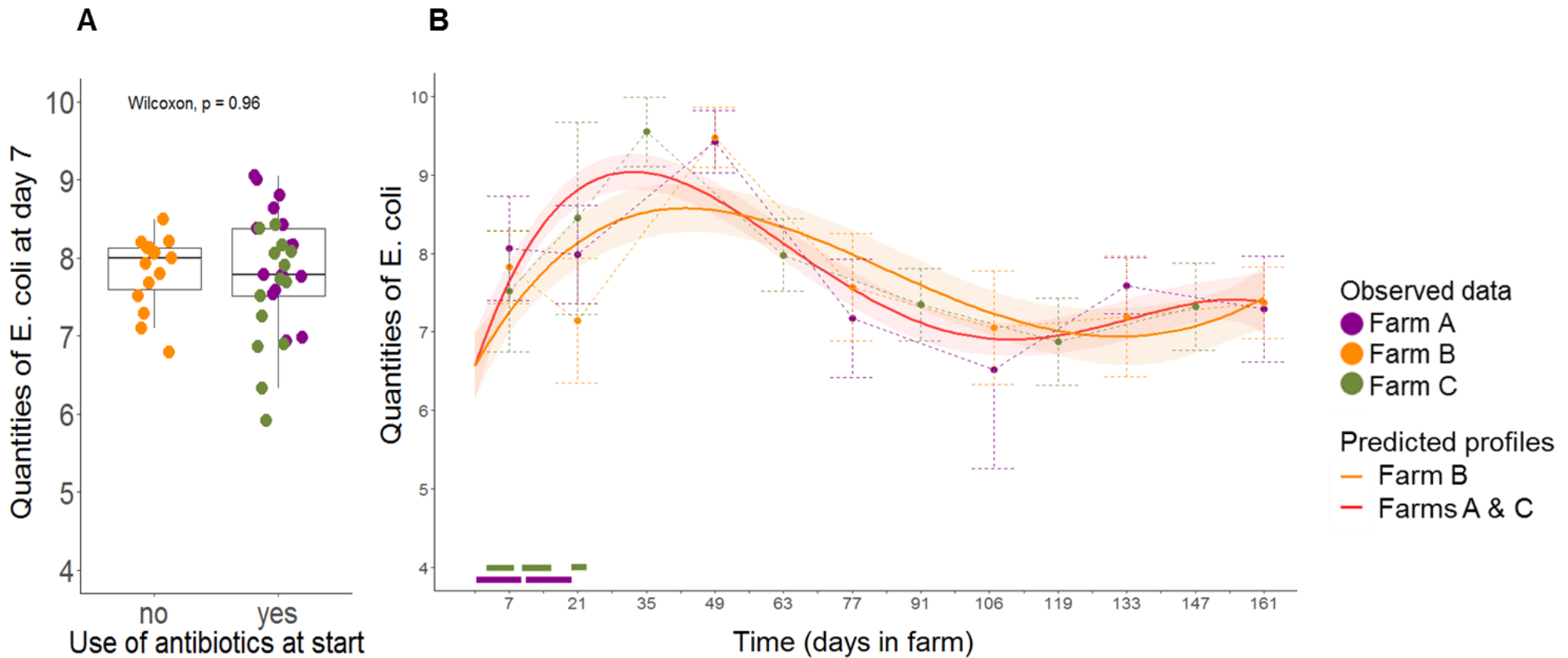
et C sur tous les termes sauf le terme constant et sans effets aléatoires sont présentés dans la Table 9. Les graphiques de validation des modèles n'ont pas montré de déficience dans l'ajustement. Les résidus en fonction du temps sont présentés dans l'annexe 2.

La différence d'effet entre la ferme B et les fermes A et C pourrait être due aux traitements antibiotiques reçus durant la première semaine dans les fermes A et C.

Table 9. Paramètres estimés du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces. « IC95% » et « p » représentent respectivement l'intervalle de confiance à 95% et la valeur de p de chaque estimation. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont indiquées en gras. β est le coefficient associé à l'effet de la ferme, ω la variabilité inter-individuelle des effets aléatoires, et σ la variabilité résiduelle. La ferme de référence utilisée pour chaque paramètre est indiquée entre parenthèses.

	Estimation	Ecart-type	IC _{95%}	p
Terme constant μ_0	6,57	0,22	[6,15; 6,99]	< 10⁻¹⁵
Terme linéaire μ_1 (ferme B)	0,11	0,025	[6,1×10 ⁻² ; 1,6×10 ⁻¹]	2×10⁻⁵
$\beta_{1,AC}$	0,07	0,020	[3,4×10 ⁻² ; 1,1×10 ⁻¹]	0,0003
Terme quadratique μ_2 (ferme B)	-0,0018	0,0007	[-3,2×10 ⁻³ ; -5,2×10 ⁻⁴]	0,007
$\beta_{2,AC}$	-0,0024	0,0007	[-3,6×10 ⁻³ ; -1,1×10 ⁻³]	0,0003
Terme cubique μ_3 (ferme B)	1,0×10 ⁻⁰⁵	6,5×10 ⁻⁰⁶	[-2,8×10 ⁻⁶ ; 2,2×10 ⁻⁵]	0,1
$\beta_{3,AC}$	2,3×10 ⁻⁰⁵	6,7×10 ⁻⁰⁶	[1,0×10 ⁻⁶ ; 3,6×10 ⁻⁵]	0,0007
Terme quartique μ_4 (ferme B)	-1,5×10 ⁻⁰⁸	2,0×10 ⁻⁰⁸	[-5,3×10 ⁻⁸ ; 2,4×10 ⁻⁸]	0,5
$\beta_{4,AC}$	-6,8×10 ⁻⁰⁸	2,0×10 ⁻⁰⁸	[-1,1×10 ⁻⁷ ; -2,7×10 ⁻⁸]	0,002
σ	0,83	-	-	-

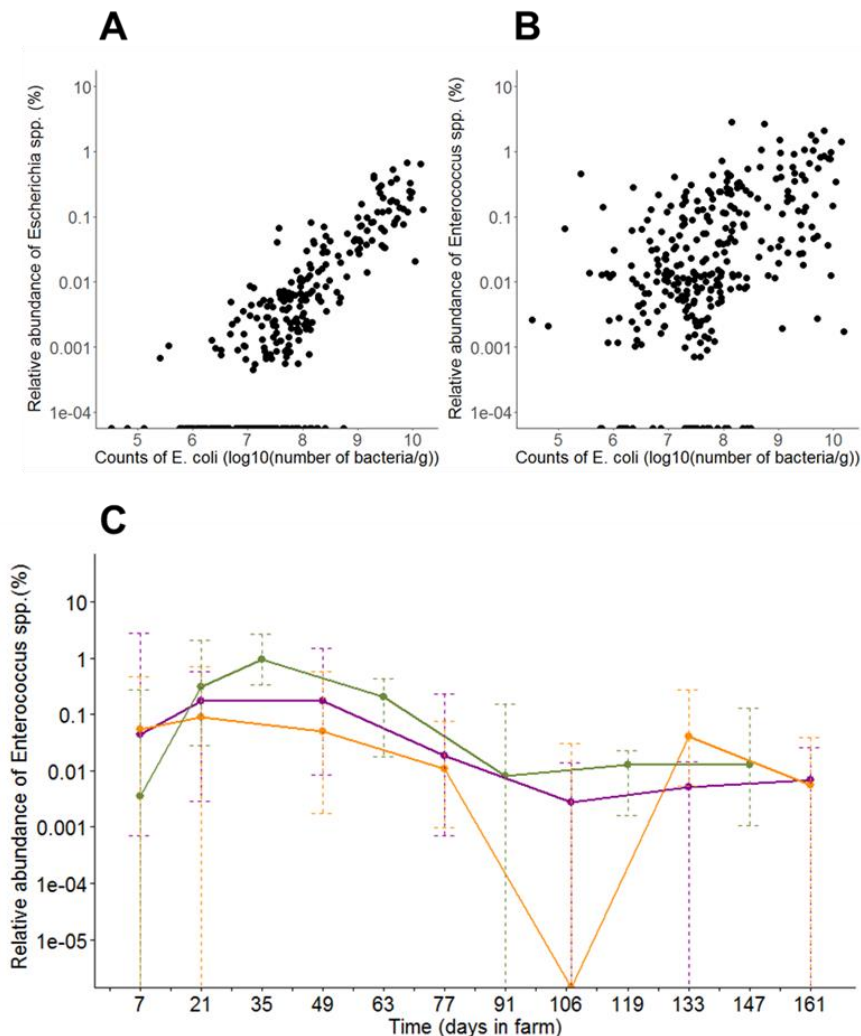
Figure 27. (A) Distribution du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces au 7^{ème} jour en fonction de l'existence d'un traitement antibiotique, exprimé en logarithme décimal. Les quartiles et les valeurs minimales et maximales sont indiqués par les boîtes à moustaches. Les échantillons sont indiqués par des points et colorés en fonction de la ferme. (B) Evolution du nombre d'*E. coli* au sein de chaque ferme et profil prédit par le modèle final (les moyennes +/- écart-types des données observées sont indiqués respectivement par des points et des barres d'erreur en pointillés, les profils prédits et leur intervalle de confiance à 95% sont indiqués respectivement en trait plein et par des rubans). Les traitements antibiotiques reçus dans les premières semaines dans les fermes A et C sont indiqués en bas de la figure.



Associations avec les abondances relatives des taxa du microbiote fécal

Le genre *Escherichia* a été détecté dans 64% des échantillons par séquençage du gène 16S et par PCR quantitative. Dans le reste des échantillons, *Escherichia* a été détecté par PCR quantitative mais pas par séquençage (et correspondent aux points collés à l'abscisse des figures Figure 28A et Figure 28B). Les quantités absolues d'*E. coli* estimées par PCR quantitative étaient très bien corrélées avec son abondance relative (coefficient de Spearman $\rho = 0,80$, $q < 10^{-15}$, Figure 28A).

Figure 28. (A) Abondance relative du genre *Escherichia* en fonction du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces. (B) Abondance relative du genre *Enterococcus* en fonction du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces. Chaque point représente un échantillon dans (A) et (B). Les points collés aux abscisses correspondent aux échantillons où (A) le genre *Escherichia* ou (B) *Enterococcus* n'a pas été détecté. (C) Evolution du genre *Enterococcus* dans chaque ferme (les médianes +/- min-max sont indiqués).



Le genre *Escherichia* était associé à 83 UTO, mais un seul était présent dans plus de 50% des échantillons. Cet UTO était très bien corrélé aux quantités absolues d'*E. coli* (coefficient de Spearman $\rho = 0,77$, $q < 10^{-15}$, données non présentées). Il représentait la majorité du genre, de par sa présence dans 62% des échantillons, et dans des abondances relatives similaires à celles du genre.

Parmi les 348 autres genres, six étaient significativement associés aux quantités absolues d'*E. coli*. Le genre *Enterococcus* avait le plus grand coefficient de corrélation en valeurs absolues (coefficient de Spearman $\rho = 0,47$, $q < 10^{-15}$, Figure 28B). Les abondances relatives du genre *Enterococcus* étaient du même ordre que celles d'*Escherichia*. L'abondance relative d'*Enterococcus* est élevée durant les deux premiers mois, puis subit une diminution d'un facteur 100 environ dans la deuxième période (Figure 28C). On enregistre un pic dans les fermes A et C au cours du deuxième mois. L'évolution de ce genre au cours du temps est très proche de celui des quantités d'*E. coli* (Figure 28C). Les genres *Butyrivibrio* et *Clostridium XVIII* étaient également associés positivement aux quantités d'*E. coli* absolues ($\rho = 0,37$, $q = 10^{-9}$ et $\rho = 0,34$, $q = 10^{-8}$, respectivement). Les genres *Prevotella*, *Succinivibrio* et *Pseudoscardovia* étaient négativement associés aux quantités d'*E. coli* ($\rho = -0,33$, $q = 10^{-7}$, $\rho = -0,31$, $q = 10^{-6}$, et $\rho = -0,30$, $q = 10^{-6}$, respectivement).

Dose de poudre de lait par unité de poids vif et quantité absolue d'*E. coli*

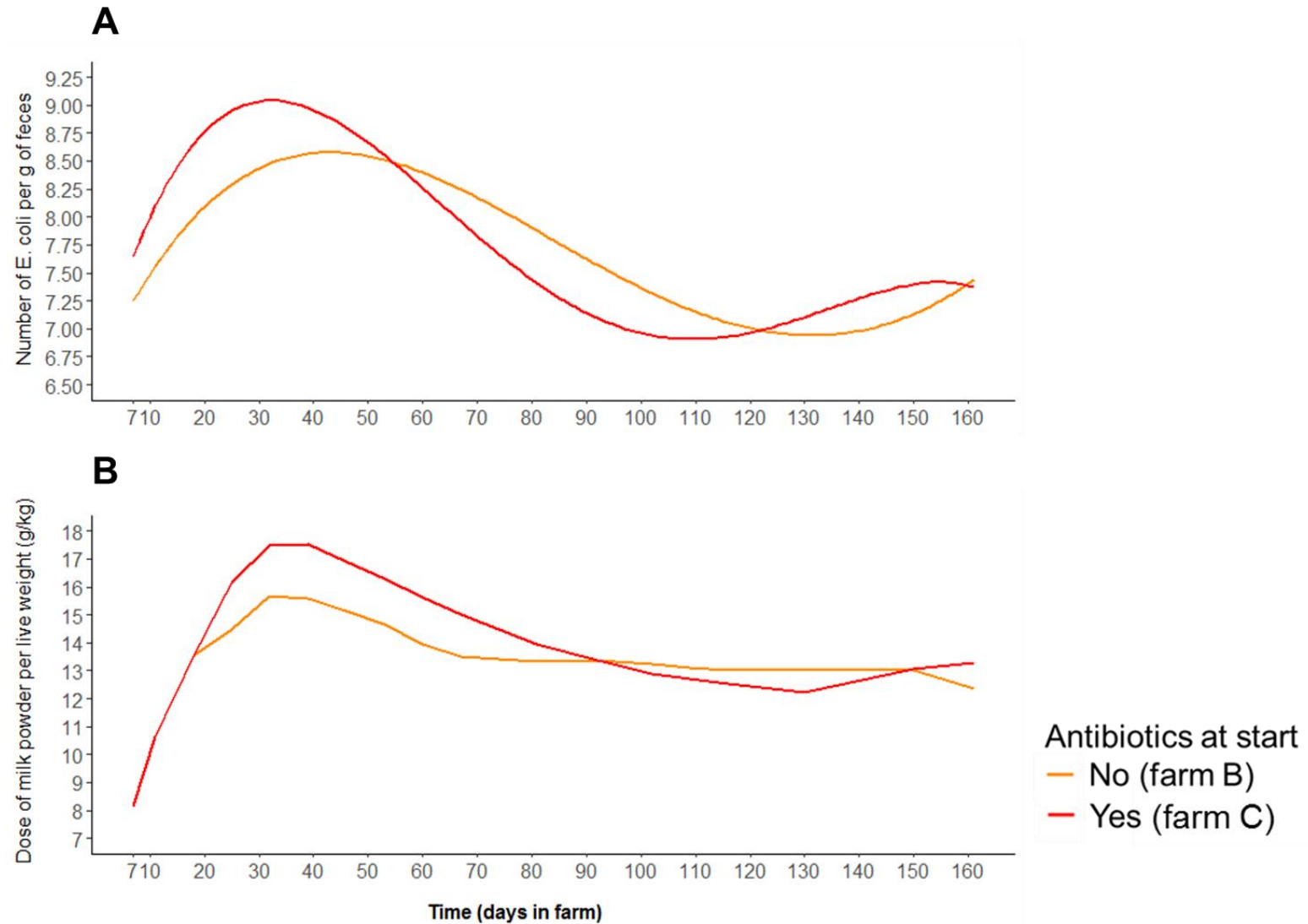
Quand on représente l'évolution de la dose de poudre de lait par kilo de poids théorique, on remarque que les quantités d'*E. coli* ont un profil dynamique assez proche (Figure 29A et Figure 29B). Les veaux ont un pic de dose au cours du deuxième mois d'engraissement, ce qui correspond à la période où les quantités d'*E. coli* sont maximales dans les fermes (Figure 29A et Figure 29B). Au cours du mois qui suit, les quantités d'*E. coli* diminuent parallèlement à la diminution de la dose de poudre de lait par kg de poids vif. Cependant, on remarque que dans la ferme C, où les veaux ont reçu un traitement antibiotique à l'entrée, les quantités d'*E. coli* augmentent beaucoup plus vite que dans la ferme B, alors que les doses de poudre théoriques sont identiques.

Malgré la ressemblance entre les deux profils, l'effet rebond que l'on observe dans les quantités d'*E. coli* à partir du 110^{ème} jour ne semble pas expliqué par la dose de poudre de lait par kilo.

Synthèse

La taille médiane des populations commensales au 7^{ème} jour d'engraissement est de $10^{7,9}$ *E. coli*/g (minimum et maximum valant respectivement 5,9 *E. coli*/g et 9,0 *E. coli*/g). Les nombres d'*E. coli*/g subissent des variations importantes au cours du temps. Un des changements majeurs a lieu au cours du deuxième mois d'engraissement, et est probablement lié à l'augmentation de la concentration de lactose dans le tube digestif des veaux. Les abondances relatives du genre *Enterococcus* ont tendance à suivre la même évolution dans le temps. Les quantités d'*E. coli* en début d'engraissement ne sont pas impactées par les traitements antibiotiques reçus, mais les variations qu'elles subissent au cours du temps sont modulées par les traitements antibiotiques prolongés à l'entrée.

Figure 29. (A) Profil prédit par le modèle final du nombre d'*E. coli* par gramme de fèces (exprimé en logarithme décimal). (B) Doses théoriques de poudre de lait consommées par kilo de poids vif par les veaux des fermes B et C.



c. Discussion et perspectives

De nombreuses études se sont intéressées au développement du microbiote fécal chez le veau de race Holstein. La majorité se concentre sur l'effet des pratiques dans les élevages dits « naisseurs » - les élevages laitiers - sur le développement du microbiote, du fait d'une pratique très répandue qui consiste à nourrir les veaux avec du lait non commercialisable, car contenant des résidus antibiotiques (159). Aucune loi n'interdisant aux éleveurs d'utiliser ce lait pour nourrir les veaux, beaucoup y ont recours afin de limiter les pertes économiques. Ainsi, beaucoup d'études chez le veau mâle Holstein, qui représente le principal apport de veaux de boucherie industriels, évaluent l'effet de cette exposition antibiotique à des niveaux inférieurs aux concentrations minimales inhibitrices (190, 191). Or, les conditions d'élevage et l'exposition aux antibiotiques chez les veaux de boucherie, qui peuvent influencer sur la composition du microbiote, sont différentes. Les veaux sont allotés dans des bâtiments fermés et ne sont jamais complètement sevrés. Ils ne consomment que du lait exempt de résidus médicamenteux (qui est un lait reconstitué à partir d'une poudre), et ils reçoivent en moyenne plus de huit traitements antibiotiques au cours de l'engraissement, avec une exposition maximale au cours des premières semaines (192). Nous n'avons trouvé aucune étude ayant porté sur le développement du microbiote fécal chez le veau de boucherie, cette production n'intéressant qu'un nombre limité de pays européens (France, Italie, Allemagne, et Pays-Bas principalement) (107).

(i) *Transformations physiologiques*

Dans les premiers jours d'engraissement, notre étude montre une forte variabilité inter-individuelle, comme cela a déjà été rapporté chez les veaux du même âge (193). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette hétérogénéité est l'origine des veaux. En effet, ils proviennent d'élevages laitiers différents. Le veau nouveau-né étant colonisé par les bactéries de sa mère et de son environnement, une telle dissemblance pourrait être la conséquence d'expositions à des microbiotes environnementaux différents entre les élevages laitiers naisseurs (11, 158), ces veaux arrivant à l'engraissement à l'âge de deux semaines. Des ressemblances plus importantes entre les veaux d'une même ferme s'observent à partir du 21^{ème} jour. Les effets du nouvel environnement du veau en début d'engraissement mettent donc deux à trois semaines à s'exercer sur la globalité du microbiote fécal. Les dix genres dominants constituent plus de 89% du microbiote fécal des veaux au 7^{ème} jour, certains veaux

ayant un microbiote très peu diversifié, car largement dominé par des bactéries des genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, ou *Megamonas*. Il en résulte une diversité des communautés bactériennes très faible chez ces veaux. La faible diversité du microbiote fécal à cet âge est cohérente avec la littérature et sa composition. En effet, l'indice de Shannon prédit par notre modèle à l'entrée à l'engraissement, quand les veaux ont 14 jours, est proche de la valeur donnée par Alipour et ses collègues pour des veaux âgés de sept jours (8) et de Dill-McFarland et ses collègues à 14 jours (193) (médiane estimée par le modèle valant 2,7). N'ayant aucune information sur l'état de santé de ces veaux, nous ne pouvons rattacher ces faibles valeurs à une dysbiose consécutive à une diarrhée, qui est une pathologie fréquente chez les veaux de cet âge. Toutefois, ces valeurs étant rapportées dans la littérature chez des veaux en bonne santé, du même âge et de la même race, on peut supposer que l'existence d'une grande variabilité des microbiotes fécaux existe chez le veau âgé de trois semaines (193).

Des changements généraux et importants ont lieu entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour d'engraissement. La diversité au sein du microbiote augmente brusquement, tandis que l'abondance globale des genres dominants diminue de 10% environ. Au niveau de l'ensemble du microbiote, les veaux ont tendance à partager plus de genres bactériens, et au sein de ces genres, plus d'UTO. La plupart des genres dominants fluctuent dans des proportions limitées. On observe principalement une harmonisation des abondances relatives, avec un changement des genres dominants les plus répandus, qui deviennent *Prevotella* et *Faecalibacterium*. Le rôle anti-inflammatoire et régulateur de la production de mucus d'une des espèces du genre *Faecalibacterium*, *F. prausnitzii* a été mis en évidence chez l'homme et le modèle animal (37, 194). Le genre *Faecalibacterium* est associé à la prise de poids au cours de la croissance chez le veau (18) et à un poids excessif chez l'enfant (195). Il a été reporté que le genre *Prevotella* était associé à un régime riche en fibres végétales, les membres du genre *Prevotella* étant capables de dégrader les polysaccharides végétaux (23). L'augmentation de l'abondance de ce genre est sûrement liée à l'augmentation de la ration en fibres. Cet épisode d'homogénéisation majeure à la fin du premier mois d'engraissement montre que le développement du microbiote fécal du veau n'est pas un processus linéaire, qui résulterait d'un équilibre constant entre l'alimentation, l'exposition aux bactéries environnementales et la barrière à la colonisation du microbiote, mais que d'autres forces, indépendamment de celles connues entrent en jeu dans la composition du microbiote fécal. Cette non-linéarité des

transformations subies par le microbiote fécal a également été décrite dans les premiers jours de vie du veau (8).

L'évolution de la diversité du microbiote fécal chez le veau de boucherie est biphasique, avec une première période où la diversité augmente beaucoup, puis apparait un effet « goulet » à la fin du premier mois d'engraissement, durant lequel tous les veaux convergent vers une même valeur pour tous les indices de diversité, suivi d'un ralentissement de cette augmentation. L'augmentation de la diversité au sein du microbiote fécal du veau au cours du temps a déjà été décrite (21, 193), mais à notre connaissance, pas cette évolution biphasique. Du fait d'un manque de données pour deux fermes, le lien avec l'alimentation n'a pas pu être suffisamment exploré dans cette étude. Toutefois, un élément intéressant à noter est l'introduction de « fibres végétales » dans le régime alimentaire des veaux de la ferme B (dont la composition ne nous est pas connue) trois jours avant le premier prélèvement, ainsi que l'introduction d'une petite quantité de paille (100 grammes) entre le premier et le deuxième prélèvement. On sait que l'introduction de fibres végétales induit un changement de la physiologie et de l'anatomie digestive des veaux, en stimulant le développement des pré-estomacs (principalement le rumen) et d'une flore microbienne ruminale, capable de dégrader les polysaccharides végétaux tels que l'amidon et la cellulose. L'effet de la diversification des nutriments sur la diversité ayant déjà été mis en évidence (17), on peut donc supposer, au moins pour les veaux de cette ferme, que l'augmentation importante de la diversité entre les deux premiers prélèvements est liée à l'émergence de bactéries capables de dégrader les polysaccharides végétaux. Par la suite, l'augmentation progressive de la quantité de fibres dans la ferme B laisse supposer que l'alimentation joue un rôle dans l'augmentation de la diversité sur l'ensemble de la période. Cependant, le schéma d'alimentation des fermes B et C ne semble pas jouer de rôle majeur sur le ralentissement de la diversification du microbiote fécal, qui a lieu à la fin du premier mois d'engraissement.

Le développement du microbiote fécal du veau de boucherie passe au moins par une période de convergence accélérée entre trois et cinq semaines d'âge. Ce phénomène a déjà été décrit chez l'enfant âgé de deux à quatre mois (196). Si l'information sur leur régime alimentaire n'était pas précisée, on peut supposer, compte-tenu de l'âge des enfants, que leur régime était uniquement lacté, excluant donc un effet de l'alimentation. Ces changements enregistrés dans les trois fermes suggèrent donc la mise en cause d'une modification physiologique imputable à la croissance des animaux.

Au cours de l'engraissement, on voit que l'homogénéité enregistrée au 21^{ème} jour persiste. Les quatre phyla principaux au début restent dominants durant toute la période d'engraissement. *Prevotella* et *Faecalibacterium* restent les genres les plus répandus parmi les veaux, et *Prevotella* fait partie des genres qui émergent pour devenir quantitativement majoritaires chez la plupart des veaux en fin d'engraissement. Ceci est cohérent avec l'enrichissement général au cours du temps en Bacteroidetes concomitant à l'appauvrissement en Firmicutes. Toutefois, la ferme a un effet sur l'évolution de la composition des microbiotes. D'une part, les distances Unifrac non pondérées montrent que les veaux d'une même ferme partagent plus d'UTO, ce qui suggère un échange de bactéries entre des veaux dans un même milieu ou une contamination environnementale commune. Par exemple, on observe l'émergence du phylum des Actinobactéries à plusieurs temps de prélèvements, uniquement chez les veaux de la ferme A. Cela peut s'expliquer par la hausse du genre *Bifidobacterium* chez ces veaux, qui a été enregistrée lors du dernier prélèvement. D'autre part, en se basant sur les abondances relatives des UTO présents, les communautés microbiennes ne sont pas forcément plus proches pour des veaux d'une même ferme par rapport à des veaux de fermes différentes. L'environnement direct du veau joue donc probablement un rôle sur la présence ou l'absence des UTO durant toute la période d'engraissement, mais la fixation pérenne au sein du microbiote de l'hôte semble en partie dictée par des forces écologiques communes à tous les veaux d'un même âge.

Les quantités d'*E. coli* des veaux de boucherie subissent une augmentation importante et transitoire lors du deuxième mois d'engraissement, puis retournent à des valeurs proches des valeurs initiales jusqu'à la fin de l'engraissement. Ces fluctuations sont probablement imputables à l'augmentation de la dose de lactose disponible. *E. coli* possède une β -galactosidase inductible, une enzyme capable de dégrader le lactose dont la production est stimulée en présence de son substrat. Nous avons détecté la même tendance avec le genre *Enterococcus*. L'une des espèces principales de ce genre chez les bovins est *E. hirae* (197, 198). Comme *E. coli*, *E. hirae* est capable de dégrader le lactose (199). De plus, *E. hirae* est également un genre aéro-anaérobie facultatif, capable de métaboliser plusieurs sources de carbones (199). Il existe une grande variabilité dans les sources de carbone entre les souches d'*E. hirae*, ce qui laisse supposer que cet apport de lactose supplémentaire a contribué à l'émergence de quelques souches spécialisées dans cette niche nutritionnelle (199). Une telle évolution de

deux genres ayant des caractéristiques métaboliques similaires n'a, à notre connaissance, pas été décrite chez le veau.

Mis à part *Enterococcus*, aucune association forte n'a été détectée entre *E. coli* et un genre. La très bonne corrélation observée entre les quantités absolues estimées par PCR quantitative et les abondances relatives estimées par séquençage nous permettent de conclure à l'absence d'un biais dans l'un ou l'autre jeu de données qui aurait pu masquer un effet. Contrairement aux bactéries anaérobies du microbiote, *E. coli* n'excrète pas d'hydrolases polysaccharidiques. En l'absence de lactose, sa source de carbone se constitue des polysaccharides issus de la dégradation du mucus par les bactéries anaérobies, dont il dépend donc pour se nourrir (73, 81). L'expansion de l'une des niches écologiques nutritionnelle qu'*E. coli* est capable d'envahir rapidement grâce à l'inductibilité de la β -galactosidase et indépendamment des autres taxa a un effet plus important que de possibles interactions positives, tel que le nourrissage par des bactéries anaérobies au sein de biofilms (81) ou négatives avec le reste du microbiote intestinal. Nous faisons l'hypothèse que, pour l'espèce *E. coli*, cette fluctuation de la concentration de lactose a un effet sur la composition clonale des populations. Leatham et ses collègues ont observé que des mutants d'*E. coli* présentant des avantages sélectifs différents, notamment en terme de métabolisation de sucres, étaient capables de coloniser tout aussi efficacement le tube digestif lors d'une étude de compétition chez la souris traitée à la streptomycine²¹ (81). Ils ont émis l'hypothèse que les biofilms formés par les bactéries anaérobies fournissent aux *E. coli* qui y adhèrent des monosaccharides et disaccharides différents suivant la localisation et la composition du biofilm en genres anaérobies (81). Selon cette hypothèse, la composition des populations d'*E. coli* devrait donc être différente suivant celle du microbiote total. Dans notre étude, chaque échantillon fécal a été étalé sur milieu sélectif des entérobactéries, et 100 colonies d'*E. coli* ont été raclées. L'ADN de ces colonies a été extrait et séquencé en commun pour chaque prélèvement à l'aide de la technologie Illumina. L'objectif est de reconstituer une composition de la population d'*E. coli* approximée par la ressemblance des séquences à un jeu d'une soixantaine de génomes artificiels représentatifs de la diversité de l'espèce *E. coli*. Nous prévoyons d'analyser ces données sous peu. Cela nous permettrait de confronter nos

²¹ La streptomycine permet d'éradiquer les *E. coli* présents tout en conservant la quasi intégralité du microbiote.

observations sur l'existence d'un effet majeur de la niche écologique nutritionnelle sur les populations d'*E. coli* par rapport aux interactions avec les autres taxa du microbiote digestif.

(ii) *Effets des antibiothérapies*

L'exposition aux antibiotiques des veaux issus de l'industrie laitière se fait majoritairement par l'alimentation. Cette voie d'administration est très courante dans tous les types d'élevages intensifs. Cependant, la particularité des veaux de race laitière, qu'ils soient mâles ou femelles, est que les molécules antibiotiques ingérées ne proviennent pas de traitements administrés mais de la consommation de lait interdit à la vente, utilisé par beaucoup d'éleveurs pour des raisons économiques. Du fait de la provenance de vaches ayant une mammite et donc étant traitées aux antibiotiques, ce lait contient des résidus médicamenteux au-dessus des seuils de tolérance imposés par les gouvernements. Ces jeunes animaux sont donc exposés pendant de très longues périodes et de manière inconstante à de très petites doses d'antibiotiques, souvent présents à des concentrations inférieures aux concentrations minimales inhibitrices (190). Cette pratique étant très courante dans beaucoup de pays (159), la plupart des études se concentrent sur l'effet de ces résidus antibiotiques sur le microbiote fécal des veaux de race laitière, et très peu se sont intéressées aux traitements antibiotiques administrés de manière volontaire dans un but prophylactique ou thérapeutique (19, 21). D'après notre connaissance de la littérature, aucune étude n'a caractérisé dans sa globalité les effets à court et long termes d'une antibiothérapie sur le microbiote fécal de veaux provenant de l'industrie laitière, *a fortiori* dans un système d'élevage aussi particulier que celui du veau de boucherie.

L'effet le plus visible s'observe sur la diversité du microbiote fécal. Il se traduit par une diminution de la diversité au moment du traitement par rapport à des veaux du même âge ne recevant pas d'antibiotiques. Cela a déjà été observé chez des veaux de la même race ayant reçu des injections d'oxytétracycline, de florfénicol ou de tulathromycine durant leurs sept premières semaines de vie (21). La reproduction de cet effet par différentes familles antibiotiques sur la flore fécale du veau, ainsi que dans d'autres espèces (120, 121, 200) est cohérent avec le regroupement des veaux ayant reçu une association de colistine et de sulfamides puis de tétracycline (ferme A) et des veaux ayant reçu une association de sulfamides et de triméthoprime puis de la tétracycline (ferme C) durant les trois premières semaines d'engraissement. Cet effet est perceptible uniquement durant cette phase

d'antibiothérapie prolongée dans les deux fermes. En effet, on passe d'échantillons prélevés au cours d'antibiothérapies prolongées et successives avec des cocktails de plusieurs molécules à des prélèvements réalisés à plusieurs jours d'intervalle de traitements ponctuels et avec une seule molécule pour la plupart. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de ces antibiothérapies courtes au cours de l'engraissement. Plusieurs raisons sont possibles. D'une part, la conception de notre étude n'est pas adaptée aux schémas antibiotiques des fermes, les échantillonnages à intervalles réguliers ne tenant pas compte des prises antibiotiques. Pour ces dernières, la quantité initiale d'antibiotiques présents au niveau du tube digestif des veaux a donc eu le temps de diminuer et le microbiote de surmonter les perturbations avant l'échantillonnage suivant. On peut supposer que lors de ces échantillonnages, l'effet des traitements antibiotiques sur la diversité ne persiste pas, une quantité trop faible d'antibiotiques n'ayant pas d'effet sur la diversité du microbiote fécal du veau (190, 191). D'autre part, l'effet limité à moins d'une semaine après un traitement de certaines molécules antibiotiques sur la richesse du microbiote a été observée chez le veau, comme l'oxytétracycline (21). Enfin, une explication possible à l'absence d'effet prolongé des antibiothérapies initiales est l'effet de convergence que l'on observe juste après ces traitements dont la force d'homogénéisation est supérieure à la pression de sélection des antibiotiques.

La plupart des études s'accordent sur l'absence d'effet des traitements antibiotiques sur la composition du microbiote à l'échelle du phylum (130, 190), ce qui est consistant avec nos observations au 7^{ème} jour. Du fait de l'absence de formulation d'hypothèses concernant l'effet des antibiotiques sur les principaux genres, et d'analyses statistiques pour les tester, nos conclusions sur cette partie ne peuvent être que descriptives et limitées à ce stade de l'étude. Nous n'avons pas observé de motif général distinguant les veaux traités et non traités aux antibiotiques, mis à part le fait que les 10 genres les plus abondants représentaient une proportion plus importante du microbiote chez les veaux sous traitement au 7^{ème} jour d'engraissement. Cela est en lien avec la diminution de la diversité chez ces veaux par rapport aux veaux non traités. Il n'a pas été observé d'émergence ou d'effondrement de genres du fait des traitements antibiotiques communs à tous les veaux traités par rapport aux veaux non traités. L'absence de changement de composition des genres dominants combinée à la diminution de la diversité chez les animaux exposés, est cohérente avec l'hétérogénéité des

signaux décrits dans la littérature. On peut supposer un manque de puissance dans un certain nombre d'études pour mettre en évidence des petites tailles d'effets, le nombre d'animaux inclus étant souvent limité pour des raisons pratiques et de coût. L'utilisation de molécules antibiotiques de familles ou de spectres différents rend souvent les résultats inconsistants d'une étude à l'autre. Par exemple, si l'on compare l'effet de deux antibiotiques de la même famille, comme la colistine et la bacitracine, qui, du fait de cibles moléculaires différentes n'ont pas le même spectre de bactéries sensibles, on observe des résultats hétérogènes. Il n'a pas été mis en évidence d'effet de la colistine sur la composition en genres du microbiote fécal du porcelet (130), alors qu'il a été observé chez des veaux traités avec de la bacitracine une diminution de l'abondance relative de bactéries des genres *Dorea*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Papillibacter*, *Collinsella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, et *Prevotella* (19). Dans une autre étude chez le veau, seul le genre *Lactobacillus* a été trouvé significativement diminué suite à un traitement à l'oxytétracycline (21).

Dans deux études menées chez le porc, une administration d'un mélange de chlortétracycline, sulfaméthazine et de pénicillines conduit à des changements de communautés différents. Dans une des études, les auteurs rapportent une diminution des genres *Anaerobacter*, *Barnesiella*, *Papillibacter*, *Sporacetigenium* et *Sarcina*, tandis que les *Succinivibrio* et les *Ruminococcus* augmentent (201). Dans l'autre étude, il y a une diminution des *Coprococcus*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Treponema*, et *Turicibacter* (126). Ces deux études ont eu lieu chez des porcelets sevrés et mangeant le même aliment industriel. Les effets collatéraux des antibiotiques sur la composition globale du microbiote fécal sont variables suivant les études, et peuvent expliquer *a priori* l'absence de tendance générale chez les veaux. Une autre explication à cette absence d'effet commun pourrait être la voie d'administration orale, qui peut conduire des différences de doses ingérées par les veaux, comme cela a été montré chez le porc, conduisant à une exposition aux antibiotiques différente parmi les animaux traités (130, 202).

Enfin, une étude menée chez la souris a montré que la composition du microbiote avant un traitement au métronidazole modulait les changements observés (200). Dans cette étude, la colonisation de souris par *E. coli* avant un traitement au métronidazole était induite afin d'étudier les effets des variations des microbiotes préexistants sur la réponse de l'hôte à un traitement antibiotique. L'inoculation seule d'*E. coli* aux souris ne produisait pas de changements notables dans le microbiote des souris, mais l'inoculation suivie du traitement

au métronidazole induisait une réponse qui différait de celle de l'administration de métronidazole chez des souris dépourvues d'*E. coli*, que ce soit sur la diversité globale du microbiote ou sa composition à l'échelle du genre. La présence d'*E. coli* en amont du traitement agirait sur la réponse du microbiote via la stimulation de la production de peptides antimicrobiens qui réguleraient la colonisation de la surface épithéliale par les bactéries commensales (203). Cette étude met en évidence le rôle que peut avoir une seule espèce bactérienne sur les variations de réponse à un traitement antibiotique d'une communauté microbienne complexe. Ainsi, même des variations mineures du microbiote initial peuvent conduire à des réponses différentes au traitement antibiotique et expliquer la variabilité observée chez les veaux.

Les quantités d'*E. coli* entre les veaux traités et non traités n'étaient pas significativement différentes au 7^{ème} jour d'engraissement. Cela est en contradiction avec plusieurs études menées chez le porc, qui ont enregistré une augmentation parfois très importante des quantités d'*E. coli* après un traitement antibiotique contenant plusieurs molécules antibiotiques (19, 126, 201). Au contraire, d'autres observent un effondrement des populations fécales d'*E. coli* pendant un traitement à la colistine (130) ou des populations intestinales après un traitement combinant amoxicilline et acide clavulanique (204). Des changements dans les quantités d'*E. coli* pendant un traitement antibiotique ont également été rapportés chez d'autres espèces, dont le veau (19). Cette contradiction entre nos observations et ce qui semble être très décrit dans la littérature peut être explorée par l'intermédiaire de modèles animaux. Les modèles animaux permettent d'étudier les facteurs environnementaux du tube digestif agissant sur l'aptitude de souches d'*E. coli* porteuses de gènes de résistance à coloniser efficacement le tube digestif. Une étude rapporte un transfert de plasmide contenant 14 gènes de résistance entre une souche de *Serratia marcescens* et une souche d'*E. coli* au sein du tube digestif de souris gnotobiotiques (113). Ce transfert a eu lieu en absence de traitement antibiotique et s'est produit moins de douze jours après l'introduction des deux souches dans les souris. Le transfert de plasmide avait lieu même quand la souche donneuse n'arrivait pas à s'établir dans le tube digestif des souris, ou en présence d'une flore fécale humaine reconstituée. L'acquisition de gènes de résistance par des souches d'*E. coli* au sein du tube digestif peut donc se faire rapidement et en amont d'une exposition antibiotique, même dans un contexte défavorable pour la souche donneuse. Ainsi,

n'ayant aucune information sur l'exposition des veaux à des antibiotiques avant le début de l'étude, nous pouvons raisonnablement supposer la présence de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques dans leur tube digestif à leur arrivée dans les fermes d'engraissement.

Toujours dans la même étude, lorsque les chercheurs mesuraient au cours du temps l'évolution des quantités de la souche d'*E. coli* transconjuguée (c'est-à-dire ayant acquis le plasmide) et de la souche receveuse parentale, la souche transconjuguée était largement minoritaire par rapport à la souche d'*E. coli* parentale, en absence de tout traitement antibiotique. Les quantités étaient en moyenne 100 à 1000 fois moins importantes que celles de la souche parentale dominante. En revanche, dès la mise en place d'un traitement prolongé à l'amoxicilline, les quantités de la souche transconjuguée étaient multipliées par 100 dès le premier jour et remplaçaient en quelques jours la souche parentale. La souche transconjuguée s'établissait comme souche dominante jusqu'à la fin du traitement. Par ailleurs, une étude *in vivo* menée chez le veau âgé de deux jours a montré que des souches d'*E. coli* résistantes étaient capables de prendre le dessus par rapport à des souches sensibles et ce en l'absence d'un traitement antibiotique (205). On peut donc supposer que les quantités d'*E. coli* similaires au 7^{ème} jour d'engraissement entre les veaux traités et non traités cachent une différence de composition de souches dominantes présentes, chacune bien adaptée à son environnement, qu'il contienne ou non des antibiotiques. Quand l'expérience sur les souris était répétée et suivie sur une plus longue période, la souche résistante persistait à de hauts niveaux d'excrétion plus de 20 jours après la fin de l'antibiothérapie, au même niveau que la souche parentale au début de l'expérience. Les modulations observées dans l'évolution des populations d'*E. coli* chez les veaux traités par rapport aux veaux non traités pourraient refléter des caractéristiques adaptatives différentes. Si un plasmide porteur de gènes de résistance et d'autres gènes conférant une valeur sélective était présent initialement dans une souche d'*E. coli* et avait diffusé à la faveur des traitements antibiotiques dans le reste de la population, il pourrait en résulter une différence dans l'exploitation des nutriments, et conduire ainsi à des profils dynamiques légèrement différents. Des gènes impliqués dans la capture du fer, et d'autres codant pour des adhésines ont été retrouvés sur des plasmides également porteurs de gènes de résistance (206–209). Ces deux types de gènes codent pour des facteurs impliqués dans la réussite de la colonisation du tube digestif par *E. coli* (210).

La similitude dans le comportement des *E. coli* et d'*Enterococcus* a déjà été observée sous traitement antibiotique (19, 200). Il a été observé chez des veaux traités avec de la bacitracine une augmentation de l'abondance relative de bactéries du genre *Escherichia*, et *Enterococcus* (19). Un transfert de plasmide porteur de gènes de résistance entre *Enterococcus faecalis* et *E. coli* a été mis en évidence dans le tube digestif de la souris (114), ce qui suggère que la dynamique du genre *Enterococcus* observée chez les veaux est due à la présence de souches d'*Enterococcus* ayant acquis des gènes de résistance.

(iii) Synthèse

Le microbiote fécal du veau de boucherie évolue et se transforme au cours du temps. Les modifications communes à tous les veaux sont l'augmentation biphasique de la diversité au sein des communautés microbiennes et la convergence vers une composition similaire dès la fin du premier mois et qui s'accroît au cours du temps, toujours dominée par des genres des phyla Bacteroidetes et Firmicutes.

Les 21 premiers jours d'engraissement voient des modifications majeures du microbiote, avec une augmentation très rapide de la diversité ainsi que de la taille de population d'*E. coli*. Cette dernière semble principalement influencée par la dose de lactose disponible. La bonne corrélation entre les quantités absolues d'*E. coli* et l'abondance relative du genre *Escherichia* permet de souligner la dynamique d'*Enterococcus* similaire à celle d'*E. coli*. Les principales forces écologiques s'exerçant sur les populations d'*E. coli* ne lui sont donc pas spécifiques.

Le microbiote fécal du veau est soumis à une forte pression antibiotique en début d'engraissement, qui peut continuer au cours de la vie du veau. Il en résulte une baisse de la diversité chez les veaux traités. Toutefois, cet effet ne persiste pas longtemps après la fin du traitement, et ne se perçoit pas dès lors que les prélèvements sont à distance des prises antibiotiques. La résilience du microbiote fécal du veau aux antibiotiques est donc forte, dans un contexte où les caractéristiques physiologiques de l'hôte et de son alimentation changent progressivement. Il apparaît que les changements les plus flagrants s'observent au niveau de la diversité au sein du microbiote et de la taille de population d'*E. coli* et sont sous l'influence conjointe de modifications physiologiques du veau, de l'alimentation, et de l'exposition antibiotique. Il est prévu de soumettre ce travail pour publication dans une revue scientifique à comité de lecture.

3. Etude n°2 : portage fécal et clairance de clones d'*E. coli* producteurs de β -lactamases à spectre étendu chez des veaux de boucherie

a. Matériel et méthodes

(i) *Identification et typage des isolats d'E. coli producteurs de BLSE*

A l'arrivée au laboratoire de résistance antimicrobienne de l'ANSES, les écouvillons étaient étalés sur milieu sélectif des entérobactéries productrices de BLSE (CHROMID® BLSE, Biomérieux). Les géloses étaient mises à incuber 24 heures à 37°C. Une colonie était prélevée au hasard sur chaque étalement positif. Les isolats ont été conservés à -80°C pour analyses ultérieures.

Un typage de première intention a été fait en identifiant les groupes phylogénétiques par approche PCR (170) et en distinguant les souches par la technique de l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (« pulsed-field gel electrophoresis » ou « PFGE »). Quand plusieurs isolats originaires d'une même ferme avaient un profil de restriction identique à la bande près, ils étaient considérés comme représentatifs de la même souche. Aucune comparaison des profils de restriction n'a été réalisée entre des isolats provenant de fermes différentes. La présence du gène *mcr-1* et le gène codant pour une enzyme CTX-M ont été déterminés par PCR (211). Pour chaque souche ayant été isolée dans au moins deux prélèvements, le génome complet d'un isolat a été séquencé. Lorsqu'un des isolats d'une souche était porteur d'un groupe CTX-M différent des autres, ou porteur du gène *mcr-1*, son génome a également été séquencé. Les isolats sélectionnés pour le séquençage sur la base des critères énoncés ci-dessus ont été choisis au hasard parmi les prélèvements où le microbiote fécal et les quantités d'*E. coli* totales ont été décrits (Figure 11).

Ces souches ont été envoyées dans des milieux de conservation de souches bactériennes en gélose profonde (Biorad®) au laboratoire de l'unité « IAME » pour le reste des analyses.

(ii) *Extraction de l'ADN et préparation des bibliothèques de génome complet et séquençage par technologie Illumina*

A leur arrivée au laboratoire de l'unité, les souches ont été étalées sur gélose « lysogeny broth » (« LB » ou « bouillon lysogène »). Leur ADN a été extrait à l'aide du kit d'extraction NucleoMag Tissue (Macherey-Nagel®).

Les librairies ont été construites à l'aide du kit Nextera DNA librarie prep (Illumina®). Elles ont été réalisées par Olivier Clermont, ingénieur de recherche dans l'équipe. Leur préparation débutait par la tagmentation de l'ADN extrait. La tagmentation fait intervenir une enzyme qui fragmente les molécules d'ADN et leur accole à chaque extrémité des séquences adaptatrices nécessaires à l'amorçage du séquençage par synthèse sur lequel repose la technologie Illumina. Cette réaction était conduite dans 2,5 µl de milieu réactionnel à une température de 55°C maintenue 5 minutes.

L'étape suivante était l'ajout par PCR aux deux extrémités de séquences code-barres spécifiques de chaque échantillon. La présence de ces séquences permet de séquencer simultanément des librairies de souches différentes en conservant cette information. La PCR débutait par une étape de dénaturation de l'ADN à 98°C pendant deux minutes et 45 secondes. Elle était suivie de huit cycles de 15 secondes de dénaturation à 98°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 62°C et une minute et 30 secondes d'extension à 72°C. Une deuxième amplification permettait l'ajout de séquences complémentaires à celles présentes à la surface de la cellule du séquenceur, rendant possible la fixation des librairies dans le séquenceur. La PCR débutait par une dénaturation initiale de cinq minutes à 95°C. Elle était suivie de quatre cycles de dénaturation à 98°C pendant 20 secondes, d'une hybridation des amorces à 62°C pendant 20 secondes, et d'une élongation des brins d'ADN néosynthétisés à 72°C pendant 20 secondes. La PCR finissait par une étape d'extension finale à 72°C pendant deux minutes.

La quantification des librairies, l'évaluation de leur qualité, et leur séquençage ont été réalisés par la société Integragen (site de Boulogne-Billancourt). Les librairies d'une longueur de 100 paires de bases ont été séquencées sur chaque brin²² sur une machine Illumina HiSeq 4000.

(iii) Analyses bio-informatiques

Traitement des séquences

²² C'est-à-dire que les deux brins d'ADN de chaque librairie sont lus au cours du séquençage. Cette technique de séquençage est désignée sous le nom de « paired end sequencing ».

La qualité des séquences brutes obtenues a été évaluée via la version 0.11.6 du logiciel FastQC(174).

Les séquences générées à l'étape précédente ont été assemblées après avoir été alignées et les zones de chevauchement comparées. Cette étape d'assemblage a été réalisée grâce au logiciel Spades (212), et a permis l'obtention d'un nombre réduit de séquences beaucoup plus longues, dénommées « contig ». Ces séquences « contig » représentent des régions continues du génome de la souche²³. Elles représentent un consensus des bases les plus fréquemment retrouvées à chaque position au moment de l'alignement des séquences brutes. Cette étape de traitement intervient dans le cadre d'un pipeline d'analyses bio-informatiques nommé PETANC (Plasmid Exploration Typing Assembly N' Contig ordering) et développé par Guilhem Royer, doctorant dans l'unité. Le principe d'un pipeline bio-informatique consiste à appeler une suite de programmes qui réalisent une chaîne automatique d'actions permettant de traiter le très grand nombre de séquences en sortie de séquençage et d'en extraire l'information recherchée. Le pipeline en question caractérise une souche et son contenu en gènes de résistance et en gènes de virulence à partir des données brutes de séquençage.

Caractérisation des génomes

Le pipeline évoqué dans le paragraphe précédent a été employé sur les données de séquençage des souches d'*E. coli* productrices de BLSE. D'une part, plusieurs marqueurs génétiques ont été caractérisés :

- le groupe phylogénétique, par une approche PCR *in silico* (213) sur les « contigs »
- les « Sequence Type » (ST), le sérotype et l'allèle du gène *fimH* (214) à l'aide du logiciel SRST2 (215) à partir des fichiers bruts de sortie de séquençage. Le séquençage multilocus a été réalisé selon le schéma Warwick (59) et celui de l'Institut Pasteur (53) pour obtenir les ST.

D'autre part, les « contigs » créés par Spades ont été réemployés par une série de logiciels inclus dans le pipeline afin de rechercher la présence de gènes de résistance et de gènes de virulence. Leur localisation sur le chromosome ou un plasmide a été déterminée à l'aide du

²³ C'est-à-dire qu'au sein de chaque « contig », aucune base ne manque.

logiciel Centrifuge (version 1.0.3) (216). Les gènes de résistance et de virulence ont été détectés grâce au logiciel Abricate (217). La base de données ResFinder (version 3.0) (218) a été employée pour caractériser le contenu en gènes de résistance. Les gènes codant pour des enzymes CTX-M ont été spécifiquement recherchés. Les bases de données VFDB (219) et Virulence Finder (version 2.0) (220) ont été employées pour rechercher la présence de gènes de virulence. En parallèle de ce pipeline, des mutations chromosomiques conférant une résistance ont été recherchées grâce à la plateforme en ligne « center for genomic epidemiology » appelant la base de données ResFinder (version 3.0) (218).

En résumé, pour chaque souche séquencée, nous disposons donc du groupe phylogénétique, des deux classifications de ST, du sérotype, de l'allèle du gène *fimH*, et de son contenu en gènes de résistance et en gènes de virulence.

Construction de l'arbre de distance

Une matrice de distances génétiques deux à deux entre les souches a été calculée par la méthode Mash (221) à partir de leurs « contigs » chromosomiques. Brièvement, la méthode Mash consiste à sélectionner de manière aléatoire des morceaux de séquences de petite taille (21 nucléotides), appelés k-mers, dans les génomes puis à calculer la proportion de k-mers identiques entre deux souches. Par la suite, cette matrice a servi à construire un arbre des souches grâce au logiciel Clearcut (version 1.0.9) par la méthode de « neighbor joining » (222). L'arbre a été visualisé dans iTOL (version 3) (223). La souche d'*E. coli* ED1a, du groupe phylogénétique B2, dont le génome est publié (224), a été utilisée pour raciner l'arbre. Cette souche a été choisie car elle est externe à l'ensemble des souches étudiées dans l'histoire évolutive d'*E. coli*.

(iv) *Analyses statistiques descriptives*

Dans un premier temps, nous avons décrit l'évolution dans le temps de la prévalence des veaux porteurs d'*E. coli* producteurs de BLSE. Un test de Fisher a été réalisé pour comparer la prévalence de veaux porteurs entre le premier et le dernier prélèvement, puis cette évolution au cours du temps a été décrite dans chaque ferme.

Dans un second temps, nous avons caractérisé les clones producteurs de BLSE circulant dans les fermes. Nous avons d'abord évalué la profondeur de séquençage pour chaque génome séquencé en divisant le produit entre le nombre de séquences obtenues et leur taille (100

nucléotides) par la taille du génome de la souche d'*E. coli* ED1a, dont la longueur est de 5 209 548 nucléotides (224). Puis, le regroupement des isolats a été étudié en fonction des différents marqueurs moléculaires et de leur combinaison, afin de trouver la meilleure résolution pour distinguer des clones. La définition des clones s'est faite sur la base de la méthode la plus discriminante. Pour chaque clone nouvellement défini, le gène codant pour une CTX-M et le nombre de résistances ont été déterminés. La prévalence des gènes de résistance détectés dans la collection a été décrite. Le nombre de gènes de virulence par clone et la prévalence des gènes de virulence en fonction du type de virulence (adhésion, système de capture du fer, toxicité, protection de la cellule bactérienne) ont également été décrits.

Dans un troisième temps, nous avons décrit l'évolution dans le temps des clones producteurs de BLSE. Leur détection dans les prélèvements des veaux a été représentée au cours du temps dans chaque ferme. Afin de caractériser la dynamique de circulation des clones producteurs de BLSE au sein des fermes, le nombre de veaux colonisés a été représenté en fonction de la durée de détection pour chaque clone.

b. Résultats

Un suivi longitudinal du portage fécal d'*E. coli* producteurs de BLSE chez des veaux de boucherie a été réalisé dans trois fermes d'engraissement, nommées A, B et C. Les fèces des veaux ont été prélevées par écouvillonnage rectal sept jours après leur arrivée, puis deux fois par mois jusqu'à leur départ pour l'abattoir. Les veaux des fermes A et C ont reçu plusieurs traitements antibiotiques durant les 21 premiers jours (Figure 11). Après 21 jours, les veaux des trois fermes ont reçu des traitements antibiotiques à distance des jours de prélèvement. Il a été recherché dans ces fèces la présence d'*E. coli* producteurs de BLSE. Pour chaque prélèvement positif, une colonie ayant poussé sur milieu sélectif des entérobactéries productrices de BLSE a été prélevée au hasard. Un premier typage des isolats par électrophorèse en champ pulsé a permis de sélectionner un représentant par profil, pour lequel il a été réalisé un séquençage de génome complet. A partir de ces génomes, il a été déterminé le groupe phylogénétique, les « sequence type » selon les schémas Warwick et de l'Institut Pasteur, le séro groupe et l'allèle du gène *fimH*. Le contenu en gènes de résistance et en gènes de virulence ont également été caractérisés.

(i) Description du portage fécal d'*E. coli* producteurs de BLSE au cours du temps

Dans la ferme A, des *E. coli* producteurs de BLSE ont été détectés dans les prélèvements des 50 veaux échantillonnés au début de l'étude. Quinze veaux porteurs ont donc été inclus dans cette ferme. Dans la ferme B, 10 veaux porteurs et cinq veaux non porteurs d'*E. coli* producteurs de BLSE ont été inclus. Dans la ferme C, une inversion de numéro de veau a conduit à inclure 11 veaux porteurs lors du premier prélèvement et quatre veaux non porteurs. Un des veaux non porteurs lors du premier prélèvement dans la ferme C est mort au cours de l'engraissement et a donc été retiré des analyses. A chaque jour d'échantillonnage prévu, les prélèvements ont pu être réalisés sur la totalité des veaux, soit un total de 514 prélèvements. Pour chaque veau, nous disposons de 12 prélèvements dans les fermes A et B, et de 11 prélèvements pour ceux de la ferme C, ce lot étant parti à l'abattoir 15 jours plus tôt que ceux des autres fermes.

Lors du premier et du dernier prélèvement, des *E. coli* producteurs de BLSE ont été détectés respectivement chez 80% [65,4 ; 90,4]_{IC95%} et 11% [3,8 ; 24,6]_{IC95%} des veaux (test de Wilcoxon, $p=10^{-7}$). Durant la première période d'engraissement, le nombre moyen d'échantillons positifs aux

E. coli producteurs de BLSE était de 5,5 (écart-type à 1,4) chez les veaux ayant reçu des traitements antibiotiques au démarrage (fermes A et C), et de 1,0 (écart-type à 0,9) chez les veaux n'en ayant pas reçu (ferme B). Le nombre minimal de prélèvements positifs par veau dans les fermes A, B et C était respectivement de quatre, zéro et trois.

Dans la ferme A, 100% des veaux étaient porteurs d'*E. coli* producteurs de BLSE dans les quatre premiers échantillons (Figure 30). Puis, la prévalence passait de 80% à 7% entre le cinquième et le septième prélèvement (correspondant respectivement à 12 veaux porteurs au 63^{ème} jour et un veau porteur au 91^{ème} jour). A partir de ce jour et jusqu'à la fin de l'engraissement, on ne détectait plus d'*E. coli* producteurs de BLSE chez 80% des veaux. Chez les autres veaux (veaux C3265, C4440 et C8624), on détectait à nouveau des *E. coli* producteurs de BLSE à la fin de l'engraissement, et de manière transitoire (Figure 30).

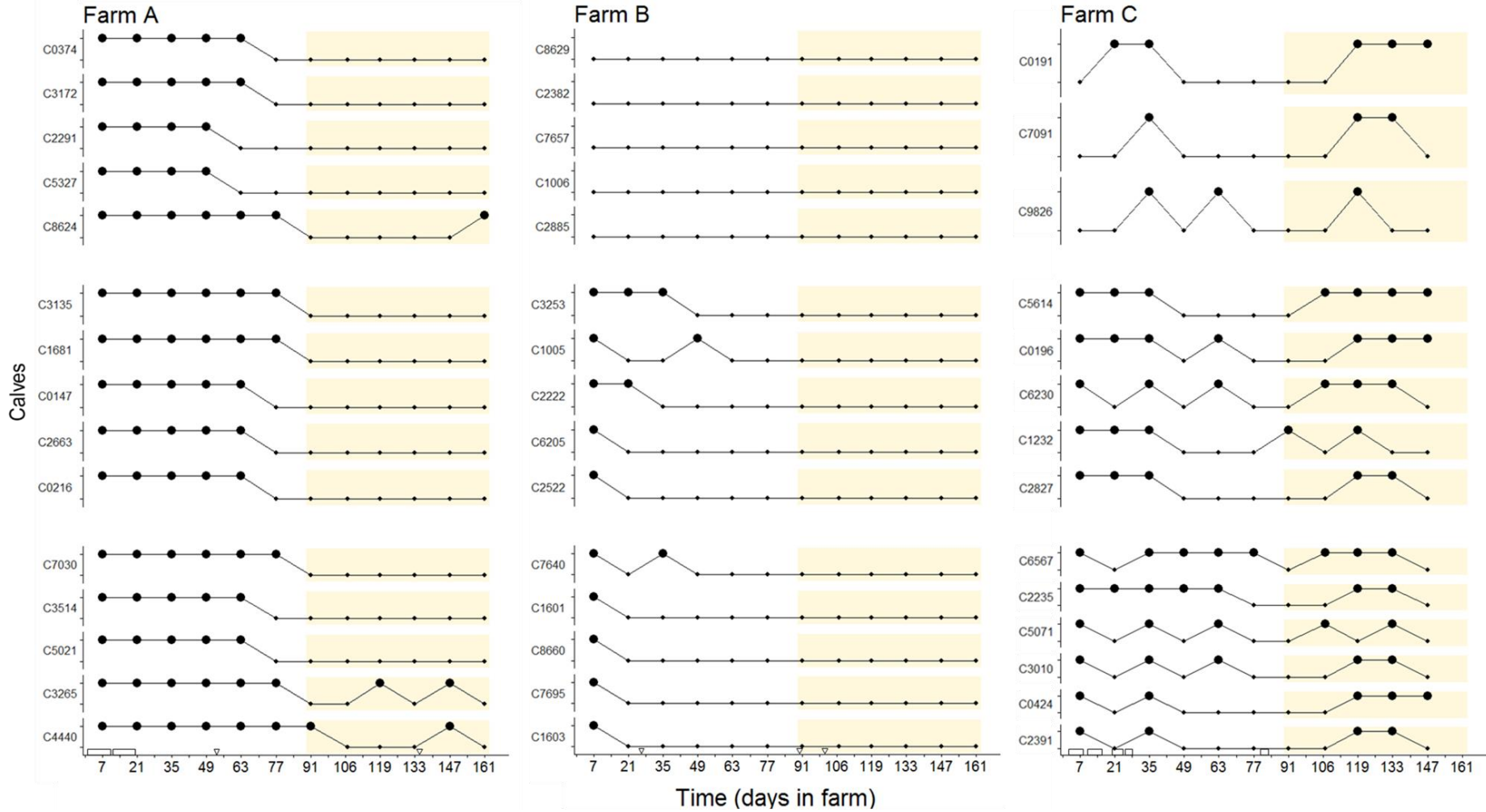
Dans la ferme B, la prévalence de veaux porteurs dès le deuxième prélèvement était de 13% (correspondant à une négativation des huit veaux C1005, C6205, C2522, C7640, C1601, C8660, C7695 et C1603, Figure 30). Des *E. coli* producteurs de BLSE ont été détectés sur des courtes périodes chez trois veaux entre le deuxième et le quatrième prélèvement (veaux C3253, C1005 et C7640, Figure 30). A partir du cinquième prélèvement (correspondant au 63^{ème} jour), la prévalence des veaux porteurs tombait à 0% et persistait jusqu'à la fin de l'engraissement. Durant toute la période d'échantillonnage, aucun *E. coli* producteur de BLSE n'a été détecté chez les veaux négatifs au premier prélèvement (veaux C8629, C2382, C7657, C1006, et C2885, Figure 30).

Dans la ferme C, la détection des *E. coli* producteurs de BLSE était inconstante durant la première moitié de l'engraissement chez 64% des veaux initialement porteurs (veaux C0196, C6230, C6567, C5071, C3010, C0424, C2391, Figure 30). Les trois veaux négatifs au premier prélèvement excrétaient au moins une fois, et de manière transitoire, des *E. coli* producteurs de BLSE durant la première moitié de l'engraissement (veaux C0191, C7091 et C9826, Figure 30). Entre le deuxième et le troisième prélèvement, la prévalence de veaux porteurs est passée de 45% à 100%, puis a chuté à 20% au quatrième prélèvement. Au cours des quatre prélèvements suivants (du 63^{ème} jour au 106^{ème} jour, Figure 30), la prévalence de veaux porteurs oscillait entre 50% et 7% (correspondant respectivement aux veaux C9826, C0196, C6230, C6567, C2235, C5071,

et C3010 porteurs au 63^{ème} jour et au veau C1230 porteur au 91^{ème} jour). Au neuvième prélèvement, la prévalence atteignait de nouveau 100%.

La fréquence de portage fécal d'*E. coli* producteurs de BLSE diminue au cours du temps chez les veaux de boucherie dans les trois fermes. Les veaux ayant reçu des traitements antibiotiques prolongés en début d'engraissement ont une durée de portage plus grande que les autres veaux. Le profil dynamique dépend également d'autres facteurs liés aux fermes. Dans la ferme A, leur excrétion dans les fèces des veaux est persistante et durable dans la première moitié de l'engraissement. Puis, un phénomène de clairance définitif et quasi-général se produit après le deuxième mois d'engraissement. Dans la ferme B, la durée d'excrétion dans les fèces est très courte. Un phénomène de clairance générale a lieu pour la majorité des veaux au cours du premier mois et se poursuit lors du deuxième mois. Plus aucun *E. coli* producteur de BLSE n'est détecté dans cette ferme à partir du troisième mois. Dans la ferme C, la détection des *E. coli* producteurs de BLSE est instable mais durable chez tous les veaux, avec 100% des veaux porteurs se produisant deux fois au cours de l'engraissement. Aucune clairance définitive et prolongée n'a été mise en évidence dans cette ferme. A la vue de ces données, trois phénotypes de portage d'*E. coli* producteurs de BLSE sur l'ensemble de la période d'engraissement ressortent : des veaux non colonisés, des veaux colonisés dont le portage persiste, et des veaux colonisés dont le portage ne persiste pas au-delà de la première moitié de l'engraissement. Ces phénotypes sont répartis différemment selon les fermes. Dans les fermes A et B, les veaux sont essentiellement des veaux colonisés dont le portage ne persiste pas. La ferme C ne comporte que des veaux colonisés dont le portage persiste durant tout l'engraissement. Les veaux non colonisés ne sont retrouvés que dans la ferme B, qui est aussi la seule ferme dans laquelle il n'y a pas eu d'antibiotiques donnés au démarrage.

Figure 30. Dynamique de portage des *E. coli* producteurs de BLSE dans les fèces des veaux au cours du temps. Pour chaque veau, ce profil est représenté par une ligne reliant des points marquant les jours d'échantillonnage. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons positifs, les points de petite taille et bas correspondent à des échantillons négatifs. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc et par ferme. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse pour chaque ferme. Les triangles et les rectangles vides représentent respectivement les traitements antibiotiques ayant couru sur un ou plusieurs jours.



(ii) *Caractérisation génomique des isolats d'E. coli producteurs de BLSE*Caractérisation phylogénétique

Cent soixante-quatorze colonies ont été isolées, et l'analyse des gels d'électrophorèse a révélé 51 profils distincts. Quarante-cinq profils ont été retrouvés dans au moins deux prélèvements et les génomes des souches correspondantes ont été séquencés. Les séquences étaient de bonne qualité et le nombre moyen de séquences par souche était de $6,03 \times 10^6$ (écart-type valant $2,75 \times 10^5$). La profondeur de séquençage moyenne était de 116X (écart-type valant 53X).

Les groupes phylogénétiques A, B1, C, D, E et F ont été retrouvés parmi les isolats. Vingt-deux ST selon le schéma Warwick ont été détectés, le plus fréquent étant le ST 10 (12 isolats, Table 10). Huit, cinq, deux, trois, deux et deux ST ont été respectivement détectés dans les groupes A, B1, C, D, E et F. Les ST selon le schéma Warwick sont présentés dans la Table 10.

Table 10. ST selon le schéma Warwick détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les ST sont rangés par ordre décroissant.

Groupes	ST Warwick	Nombre d'isolats
A	ST10	12
	ST1850	4
	ST167	2
	ST744	2
	ST34	1
	ST78	1
	ST301	1
	ST329	1
B1	ST58	3
	ST162	1
	ST300	1
	ST949	1
	ST2522	1
C	ST88	2
	ST410	1
D	ST69	1
	ST362	1
	ST925	1
E	ST57	3
	ST753	1
F	ST117	3
	ST354	1
Total	22	45

Vingt-et-un ST selon le schéma de l'Institut Pasteur ont été détectés. Le ST le plus fréquent était le ST 2 (11 isolats, Table 11). Sept, cinq, deux, trois, deux et deux ST ont été détectés respectivement dans les groupes phylogénétiques A, B1, C, D, E et F. Les ST selon le schéma de l'Institut Pasteur sont présentés dans la Table 11.

Table 11. ST selon le schéma de l'Institut Pasteur détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les ST sont rangés par ordre décroissant.

Groupes	ST Institut Pasteur	Nombre d'isolats
A	ST2	11
	ST466	4
	ST918	4
	ST917	2
	ST383	1
	ST638	1
	ST919	1
B1	ST24	3
	ST25	1
	ST591	1
	ST596	1
	ST21	1
C	ST66	2
	ST707	1
D	ST3	1
	ST46	1
	ST511	1
E	ST533	3
	ST920	1
F	ST48	3
	ST39	1
Total	21	45

Vingt-six sérotypes ont été détectés, le plus fréquent étant le sérotype O89:H9 (retrouvé dans 11 isolats, Table 12). Huit, six, trois, trois, deux et quatre sérotypes ont été détectés respectivement dans les groupes phylogénétiques A, B1, C, D, E, et F. Les sérotypes détectés sont présentés dans la Table 12.

Table 12. Sérotypes détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les sérotypes sont rangés par ordre décroissant.

Groupes	Sérotype	Nombre d'isolats
A	O89:H9	11
	O9:H10	4
	O8:H32	3
	O80:H2	2
	O129:H11	1
	O148:H32	1
	O109:H16	1
	O62:NA	1
B1	O9:H25	2
	O8:H19	1
	O8:H25	1
	O8:H16	1
	O29:H34	1
	O182:H25	1
C	O8:H10	1
	O8:H27	1
	O21:H21	1
D	O11:H9	1
	O15:H12	1
	O17:H18	1
E	O119:H10	3
	O130:H9	1
F	O1:H34	1
	O24:H4	1
	O33:H4	1
	O153var1:H4	1
Total	26	45

Vingt allèles du gène *fimH* ont été détectés. Six, cinq, deux, trois, deux et quatre ont été détectés respectivement dans les groupes phylogénétiques A, B1, C, D, E et F. Les allèles du gène *fimH* détectés sont présentés dans la Table 13.

Table 13. Allèles du gène *fimH* détectés et répartition dans les isolats selon les groupes phylogénétiques. Dans chaque groupe phylogénétique, les allèles sont rangés par ordre décroissant.

Groupes	Allèle du gène <i>fimH</i>	Nombre d'isolats
A	<i>fimH54</i>	16
	<i>fimH23</i>	4
	<i>fimH215</i>	3
	<i>fimH24</i>	1
	<i>fimH27</i>	1
	<i>fimH444</i>	1
B1	<i>fimH32</i>	3
	<i>fimH25</i>	1
	<i>fimH34</i>	1
	<i>fimH38</i>	1
	<i>fimH121</i>	1
C	<i>fimH53</i>	1
	<i>fimH511</i>	1
D	0	1
	<i>fimH27</i>	1
	<i>fimH47</i>	1
E	<i>fimH96</i>	1
	<i>fimH54</i>	1
F	<i>fimH124</i>	1
	<i>fimH41</i>	1
	<i>fimH58</i>	1
	<i>fimH97</i>	1
Total	<i>fimH189</i>	1
	22	45

On voit que les différents marqueurs n'opèrent pas exactement les mêmes regroupements des isolats, notamment dans le groupe phylogénétique A où huit ST selon le schéma Warwick, sept ST du schéma de l'Institut Pasteur, huit sérotypes et six allèles du gène *fimH* ont été détectés. Les deux ST sont moins discriminants que la combinaison des marqueurs pour les groupes phylogénétiques A, B1, C et F (Table 14). Le sérotype est moins discriminant pour les groupes phylogénétiques A, et B1. De plus, certains sérotypes sont retrouvés associés à des ST du schéma Warwick différents, comme le sérotype O89:H9 au sein du groupe phylogénétique A associé aux ST 10 et 744. Enfin, l'allèle du gène *fimH* est moins discriminant pour les isolats A, B1 et C (Table 14). Deux allèles *fimH* ont par ailleurs été retrouvés dans des isolats de groupes phylogénétiques

différents (l'allèle *fimH27* dans les groupes A et D, et l'allèle *fimH54* dans les groupes A et E, Table 13).

Table 14. Regroupement des isolats en fonction des différents marqueurs moléculaires utilisés, le groupe phylogénétique, les deux ST, le sérotype et l'allèle du gène *fimH*, et en fonction de leur combinaison.

Groupes phylogénétiques	A	B1	C	D	E	F	Total
ST Warwick	8	5	2	3	2	2	22
ST Institut Pasteur	7	5	2	3	2	2	17
Sérotype	8	6	3	3	2	4	26
allèle du gène <i>fimH</i>	6	5	2+0	3	2	4	22
Les 5 marqueurs	12	6	3	3	2	4	30

Ainsi, nous proposons une délimitation des clones d'*E. coli* basée sur la combinaison des cinq marqueurs moléculaires utilisés, dont le pouvoir discriminant est plus grand que celui de chaque marqueur pris séparément (Table 14). Le nom de ces clones est de la forme « groupe phylogénétique_ST Warwick/ST Institut Pasteur_sérotype_allèle *fimH* ». Par exemple, le clone ayant comme groupe phylogénétique A, le ST du schéma Warwick 10, le ST du schéma de l'Institut Pasteur 383, le sérotype O129:H11 et l'allèle *fimH* 27 se nommera « A_ST10/383_O129:H11_ *fimH27* ».

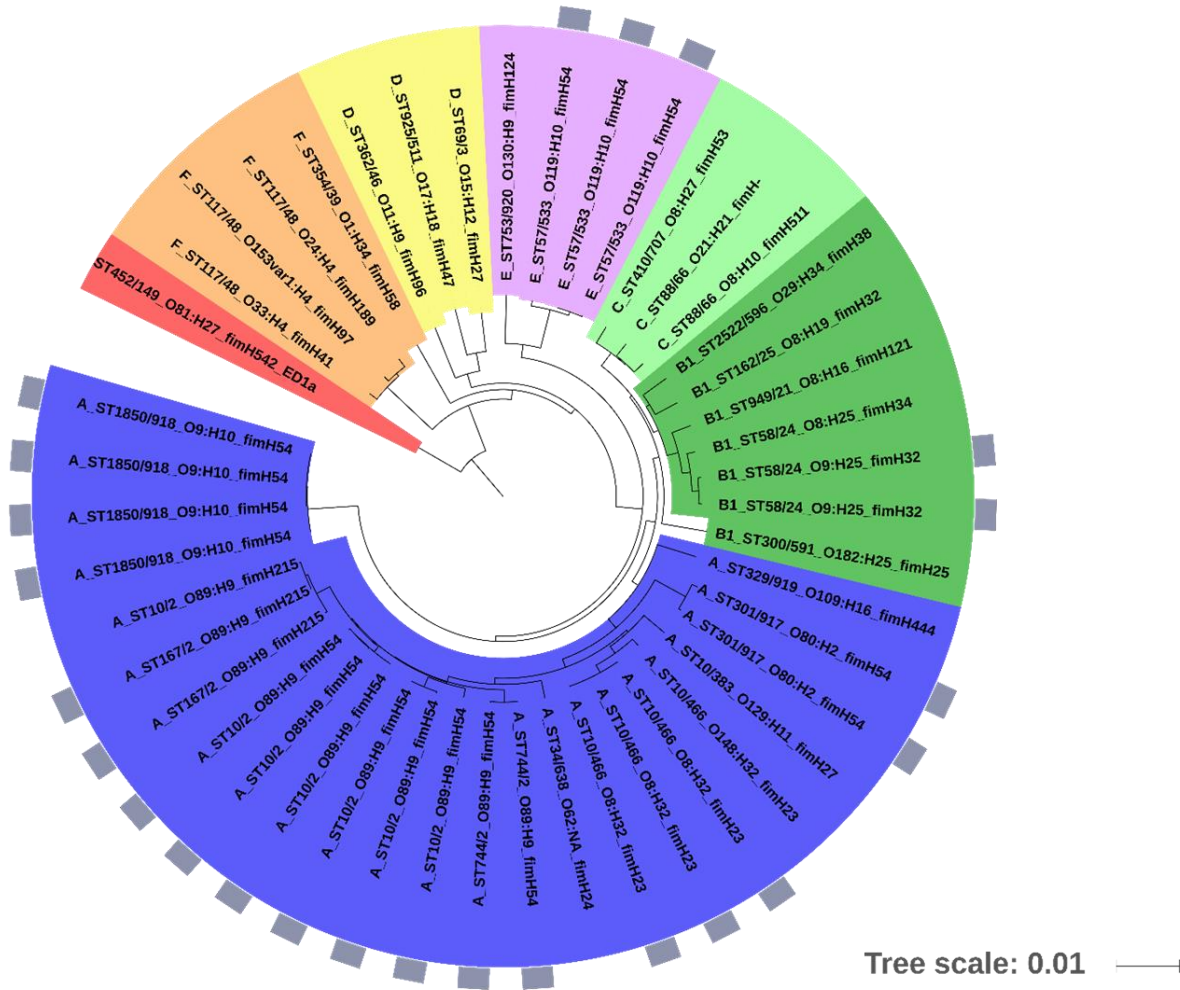
Parmi les 45 isolats, nous pouvons ainsi distinguer 29 clones. Onze appartenaient au groupe phylogénétique A, six au groupe B1, quatre au groupe F, trois aux groupes C, D et deux au groupe E. Les clones « B1_ST58/24_O8:H25_ *fimH34* », « B1_ST58/24_O9:H25_ *fimH32* », et « B1_ST949/21_O8:H16_ *fimH121* » appartenaient au complexe clonal 87 (CC87). La répartition de ces clones au sein de la collection des isolats est représentée dans la Figure 31. Six clones ont été isolés plusieurs fois dans le groupe phylogénétique A, et un clone a été isolé plusieurs fois dans chacun des groupes B1 et E. Le clone « A_ST10/2_O89:H9_ *fimH54* » a été isolé six fois. Le clone « A_ST1850/918_O9:H10_ *fimH54* » a été isolé quatre fois. Les clones « A_ST10/466_O8:H32_ *fimH23* » et « E_ST57/533_O119:H10_ *fimH54* » ont été isolés trois fois. Les clones « A_ST167/2_O89:H9_ *fimH215* », « A_ST744/2_O89:H9_ *fimH54* », « A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* », et « B1_ST58/24_O9:H25_ *fimH32* » ont été isolés deux fois. Pour cinq de ces clones, la distance mash entre les isolats n'est pas nulle (clones « A_ST167/2_O89:H9_ *fimH215* », « A_ST10/2_O89:H9_ *fimH54* »,

« A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* », « B1_ST58/24_O9:H25_ *fimH32* » et « E_ST57/533_O119:H10_ *fimH54* ». Cette distance non nulle pouvant être due à des polymorphismes de nucléotides à certaines positions dans le génome (« Single Nucleotide Polymorphism » ou « SNP ») et/ou des transferts horizontaux de gènes sur le chromosome, on ne peut donc conclure avec cet arbre de distance génétique si ce sont bien deux souches distinctes appartenant à un même clone ou la même souche ayant acquis ou perdu des gènes. Un arbre phylogénétique basé sur les SNP du génome cœur d'*E. coli* est en cours de construction. Si l'arbre basé sur les SNP du génome cœur regroupe les isolats en clones comme notre combinaison de marqueurs, cela permettra de valider le choix de la combinaison des cinq marqueurs moléculaires utilisés dans ce travail.

Figure 31. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers de 21 nucléotides qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de format « groupe phylogénétique_sequence types_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris au-dessus des feuilles. L'arbre a été raciné sur une souche appartenant au groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. « NA » dans la dénomination des clones signifie « gène absent ».

Phylogroups

- : A
- : B1
- : C
- : D
- : E
- : F
- : B2



Caractérisation du résistome

Trois gènes codant pour une β -lactamase à spectre étendu ont été détectés dans les isolats. Il s'agissait des gènes du groupe 1 des CTX-M *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-15}, et du gène du groupe 9 *bla*_{CTX-M-14}. Les gènes *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-14} étaient portés sur un plasmide tandis que le gène *bla*_{CTX-M-15} était localisé sur le chromosome du clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 » (Figure 32). Le gène *bla*_{CTX-M-1} a été retrouvé chez 16 clones appartenant à tous les groupes phylogénétiques excepté le D. Le gène *bla*_{CTX-M-14} a été retrouvé chez 13 clones répartis sur l'ensemble des groupes phylogénétiques (Figure 32). Les gènes *bla*_{CTX-M-14} et *bla*_{CTX-M-15} ont été retrouvés dans des souches du même clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 » (Figure 32).

En plus des β -lactamines, des gènes conférant une résistance à huit autres familles antibiotiques ont été détectés. La résistance à ces familles est présentée dans la Figure 33. La majorité des clones producteurs de BLSE possédaient des gènes de résistance à la tétracycline, aux aminosides (29 clones pour chacune des deux familles, Figure 33), aux sulfamides (26 clones), au triméthoprim (21 clones) et aux phénicolés (17 clones). Des gènes de résistances aux macrolides, et à la colistine ont été détectés chez respectivement neuf et huit clones. Des mutations sur les gènes *gyrA* et *parC*, conférant une résistance aux fluoroquinolones, ont été détectées chez six clones.

Figure 32. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash et répartition des gènes *bla*_{CTX-M}. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers de 21 nucléotides qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de format « groupe phylogénétique_sequence types_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris au niveau des feuilles. L'arbre a été raciné sur une souche appartenant au groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. Le terme « NA » dans le nom des clones signifie « gène absent ». Les gènes détectés codant pour une CTX-M sont indiqués à l'extérieur de l'arbre en fonction de leur localisation dans le chromosome ou sur un plasmide.

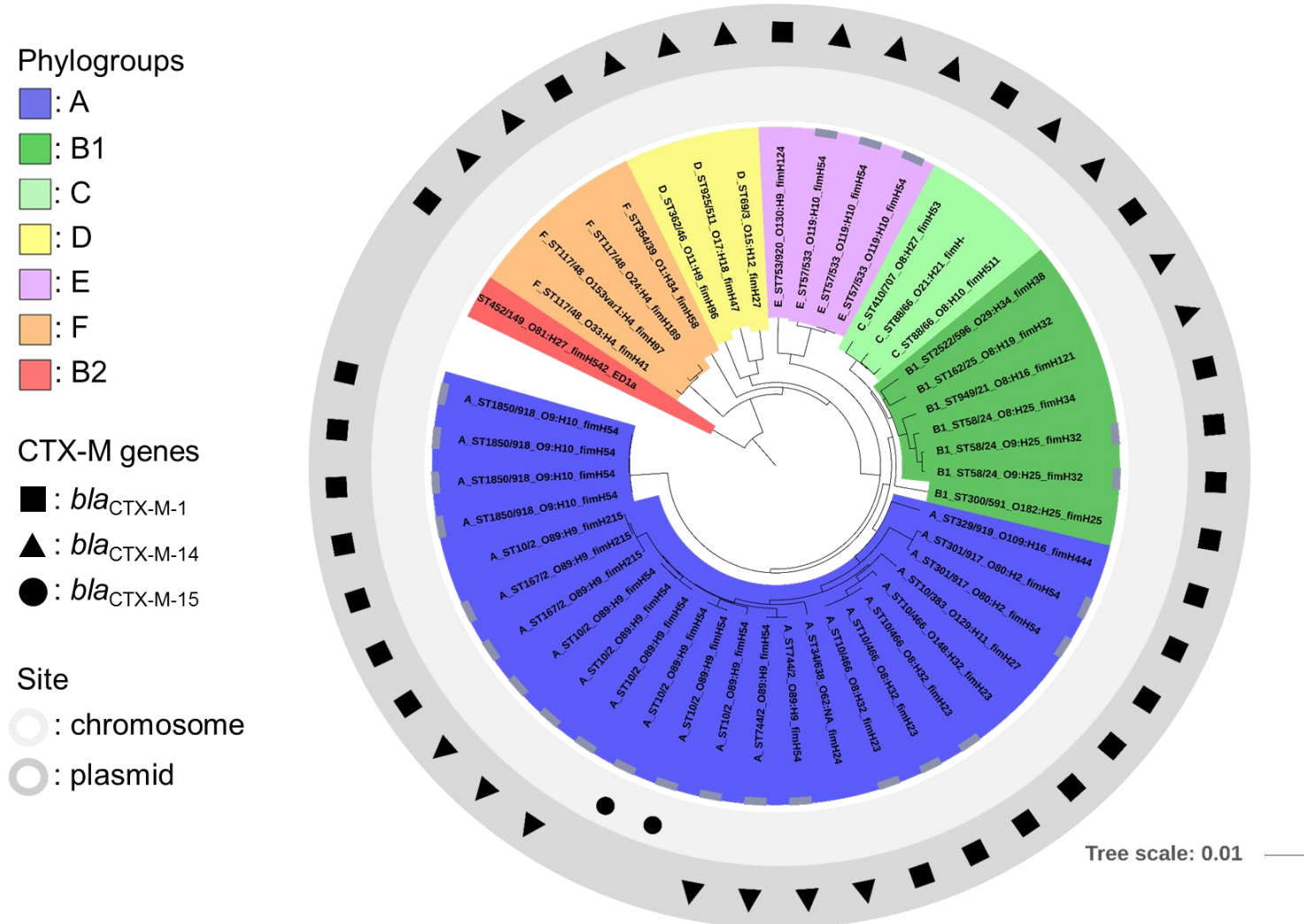
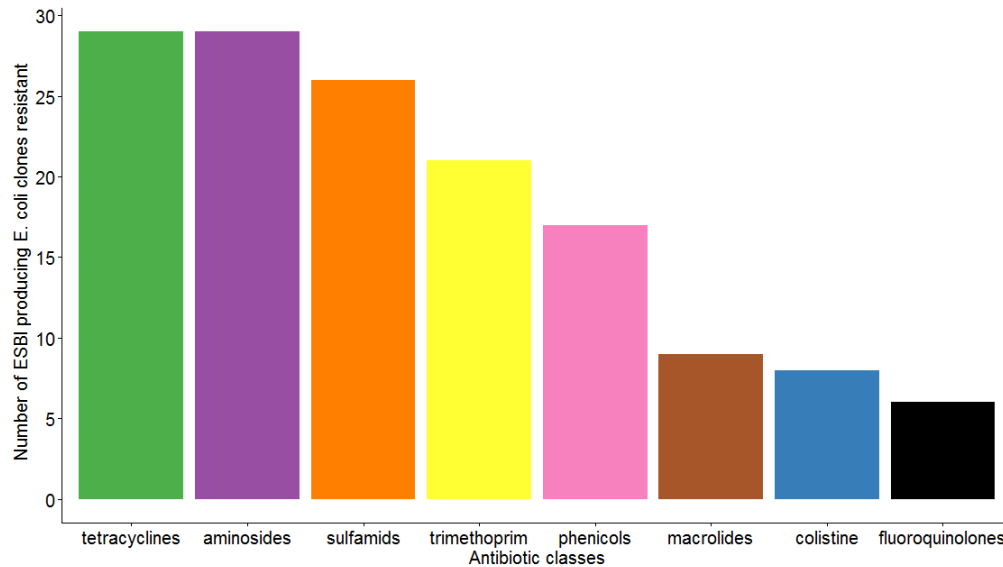


Figure 33. Nombre de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE résistants aux différentes familles d'antibiotiques.



La médiane du nombre de familles pour lesquels les clones étaient porteurs de gènes de résistances était égale à 5. Le nombre minimum de résistances cumulées était de quatre. Ce nombre a été retrouvé chez les souches de six clones, avec des génotypes de résistance différents, mais partageant au moins une résistance aux aminosides, en plus des β -lactamines (clones « A_ST10/2_O89:H9_fimH215 », « A_ST167/2_O89:H9_fimH215 », « A_ST301/917_O80:H2_fimH54 », « A_ST329/919_O109:H16_fimH444 », « B1_ST300/591_O182:H25_fimH25 », « B1_ST58/24_O9:H25_fimH32 », Figure 34). Le maximum de résistances cumulées était de huit chez dix souches appartenant à six clones distincts (clones « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 », « A_ST10/383_O129:H11_fimH27 », « A_ST744/2_O89:H9_fimH54 », « C_ST88/66_O21:H21_fimH- », « F_ST117/48_O24:H4_fimH189 », « F_ST354/39_O1:H34_fimH58 », Figure 34). Ces clones avaient des génotypes de résistance différents, mais des gènes de résistance à la tétracycline, aux aminosides et aux sulfamides ont été détectés dans tous ces clones, en plus des β -lactamines (Figure 34).

Parmi les huit clones isolés plusieurs fois, six d'entre eux avaient un contenu en gènes de résistance variable suivant la souche (Figure 34). Pour cinq de ces clones, il existait deux génotypes de résistance (clones « A_ST1850/918_O9:H10_fimH54 »,

« A_ST167/2_O89:H9_fimH215 », « A_ST10/466_O8:H32_fimH23 », « A_ST301/917_O80:H2_fimH54 », « B1_ST58/24_O9:H25_fimH32 », Figure 34). Pour le clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 », quatre variants ont été identifiés (Figure 34). Les antibiotiques pour lesquels le génotype variait entre les isolats d'un même clone étaient les sulfamides (quatre clones), la colistine (trois clones), les phénicolés (deux clones), la tétracycline (deux clones) et les macrolides (un clone). Au sein d'un même clone, le génotype de résistance entre les isolats ne variait pas de plus de trois familles d'antibiotiques. Les aminosides représentaient la seule famille antibiotique pour laquelle le génotype de résistance ne variait pas entre les isolats d'un même clone (en plus des β -lactamines). Les gènes impliqués dans ces variations et leur emplacement sur le chromosome ou le plasmide sont en cours d'analyse.

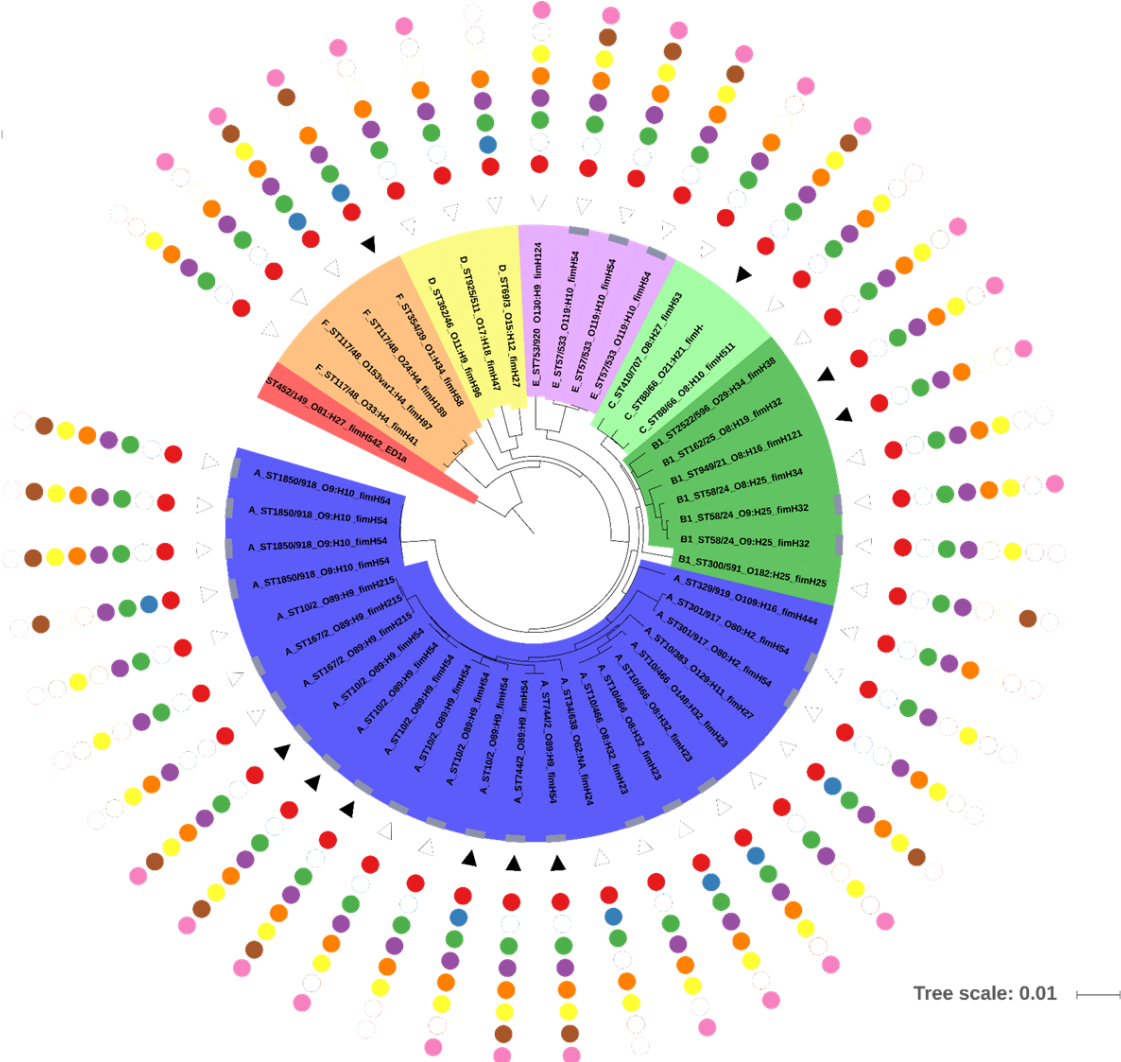
Figure 34. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash et répartition des génotypes de résistance. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de forme « groupe phylogénétique_ST_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris au niveau des feuilles. L'arbre a été raciné sur une souche appartenant au groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. Le terme « NA » dans le nom des clones signifie « gène absent ». Les génotypes de résistance sont indiqués à l'extérieur de l'arbre. Les mutations et les acquisitions de gènes sont indiquées respectivement par des triangles et des ronds.

Phylogroups

- : A
- : B1
- : C
- : D
- : E
- : F
- : B2

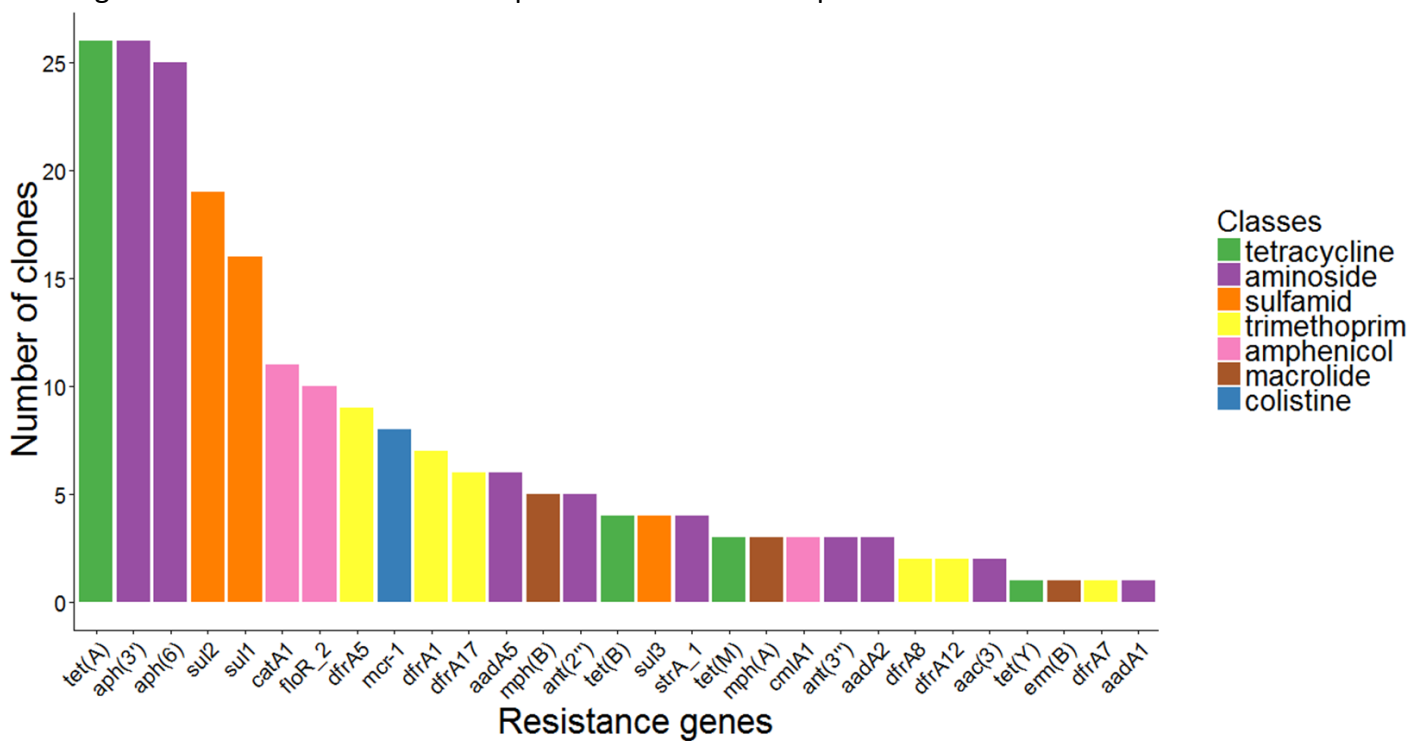
Class

- : fluoroquinolones
- : β-lactamin
- : colistine
- : tetracycline
- : aminoside
- : sulfamid
- : trimethoprim
- : macrolid
- : phenicol



Les gènes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(M)* et *tet(Y)* ont été détectés chez les clones résistants à la tétracycline (Figure 35). Le gène *tet(A)* a été détecté chez 26 clones. Les gènes *aph(3')* et *aph(6)* étaient largement majoritaires chez les clones résistants aux aminosides, respectivement présents dans 26 et 25 clones. Les gènes *sul2* et *sul1* étaient les gènes les plus fréquemment retrouvés chez les clones résistants aux sulfamides (Figure 35). Les gènes conférant une résistance au triméthoprime les plus fréquents étaient *dfrA5*, *dfrA1*, et *dfrA17* (présent chez six clones) (Figure 35). Les gènes *catA1*, *floR* et *cmIA1* ont été retrouvés chez les clones résistants aux phénicolés (Figure 35). Les gènes *mph(A)*, *mph(B)* et *erm(B)* ont été retrouvés chez les clones résistants aux macrolides. Enfin, le gène *mcr-1* a été retrouvé chez les huit clones résistants à la colistine (Figure 34 et Figure 35). La localisation de ces gènes sur le chromosome ou un plasmide et la caractérisation des plasmides est en cours d'analyse.

Figure 35. Gènes de résistance acquis des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE.



Parmi les six clones résistants aux fluoroquinolones, tous avaient au moins une mutation sur les gènes *parC* et *gyrA*. Un clone avait une seule mutation sur les deux gènes. Trois clones avaient deux mutations sur le gène *gyrA* et une seule mutation sur le gène *parC*. Deux clones avaient deux mutations sur les deux gènes.

Les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE sont multi-résistants, et leur contenu en gènes de résistance est varié. La majorité possède des gènes de résistance aux tétracyclines, aux aminosides, aux sulfamides et au triméthoprim. Les gènes *tet(A)*, *aph(3')*, *aph(6)*, *sul2* et *sul1* conférant une résistance aux trois premières familles citées sont très répandus parmi les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE. Les génotypes de résistance varient entre les souches d'un même clone.

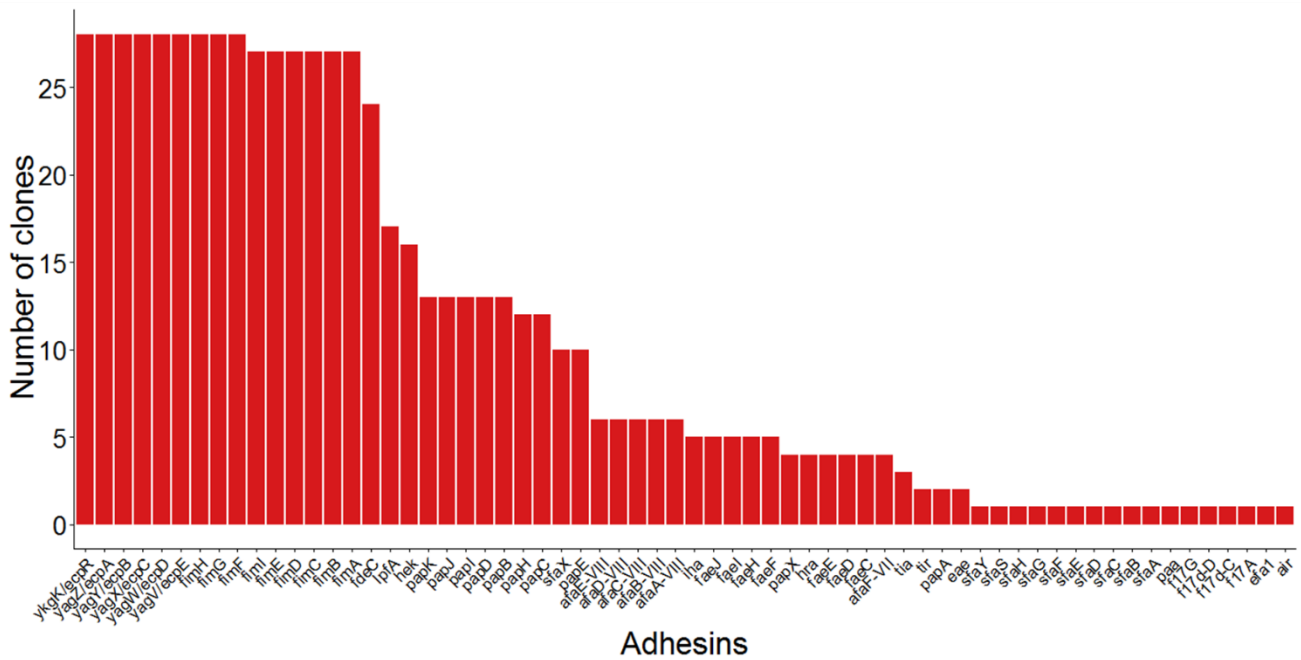
Caractérisation du virulome

Des gènes de virulence codant pour des adhésines, des toxines, des protectines ou impliqués dans la capture du fer ont été détectés dans tous les clones. Soixante-quatre gènes codant pour des adhésines ont été détectés, les gènes les plus prévalents étaient *fimF*, *fimG* et *fimH* (Figure 36A). Le gène *eae* a été retrouvé chez deux clones, chacun porteur d'un allèle différent. Les gènes impliqués dans la capture du fer les plus prévalents étaient les gènes *fes*, *fepA* à *fepD*, *fepG*, *entA* à *entF*, *entS*, *iutA*, *iucA* à *iucD*, et *iss* (Figure 36B). Quarante-six gènes codant pour des toxines ont été détectés chez les clones, les plus prévalents étant les gènes *espL1*, *espX4*, *espX5*, et *espX1* (Figure 37A). Les gènes *stx2A* et *stx2B* codant pour une toxine de Shiga ont été retrouvés chez deux clones. Aucun gène *stx1* n'a été détecté. Huit gènes codant pour des protectines ont été détectés chez les clones (Figure 37B). Les gènes *ompA*, *traT* et *ompT* présent sur le chromosome étaient les plus prévalents (Figure 37B).

Parmi les 193 gènes appartenant aux quatre types de virulence détectés, seuls treize gènes impliqués dans la capture du fer (*fes*, *fepA* à *fepD*, *fepG*, *entA* à *entF* et *entS*) et un gène codant pour une protectine (*ompA*) ont été retrouvés chez tous les clones, soit 7,3% des gènes. Aucun gène codant pour une adhésine ou une toxine n'a été retrouvé chez tous les clones.

Figure 36. Gènes de virulence des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE. Les gènes codant pour une adhésine sont indiqués dans le panel A, et les gènes impliqués dans la capture du fer sont indiqués dans le panel B.

A



B

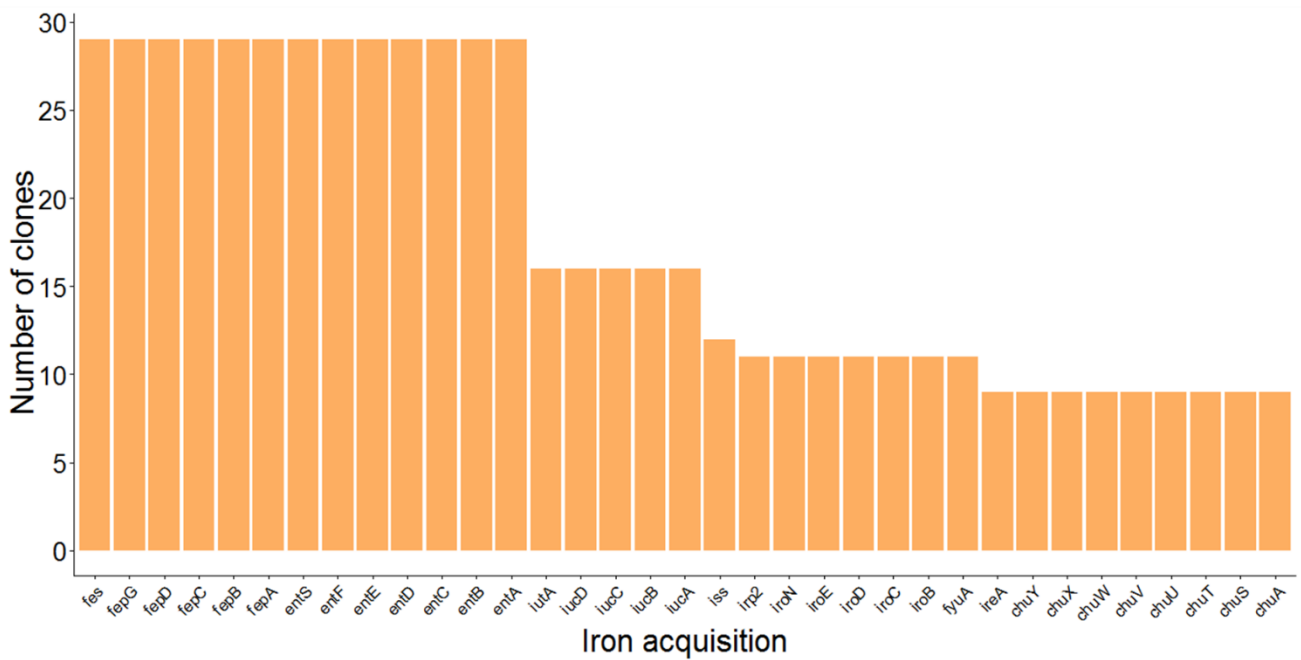
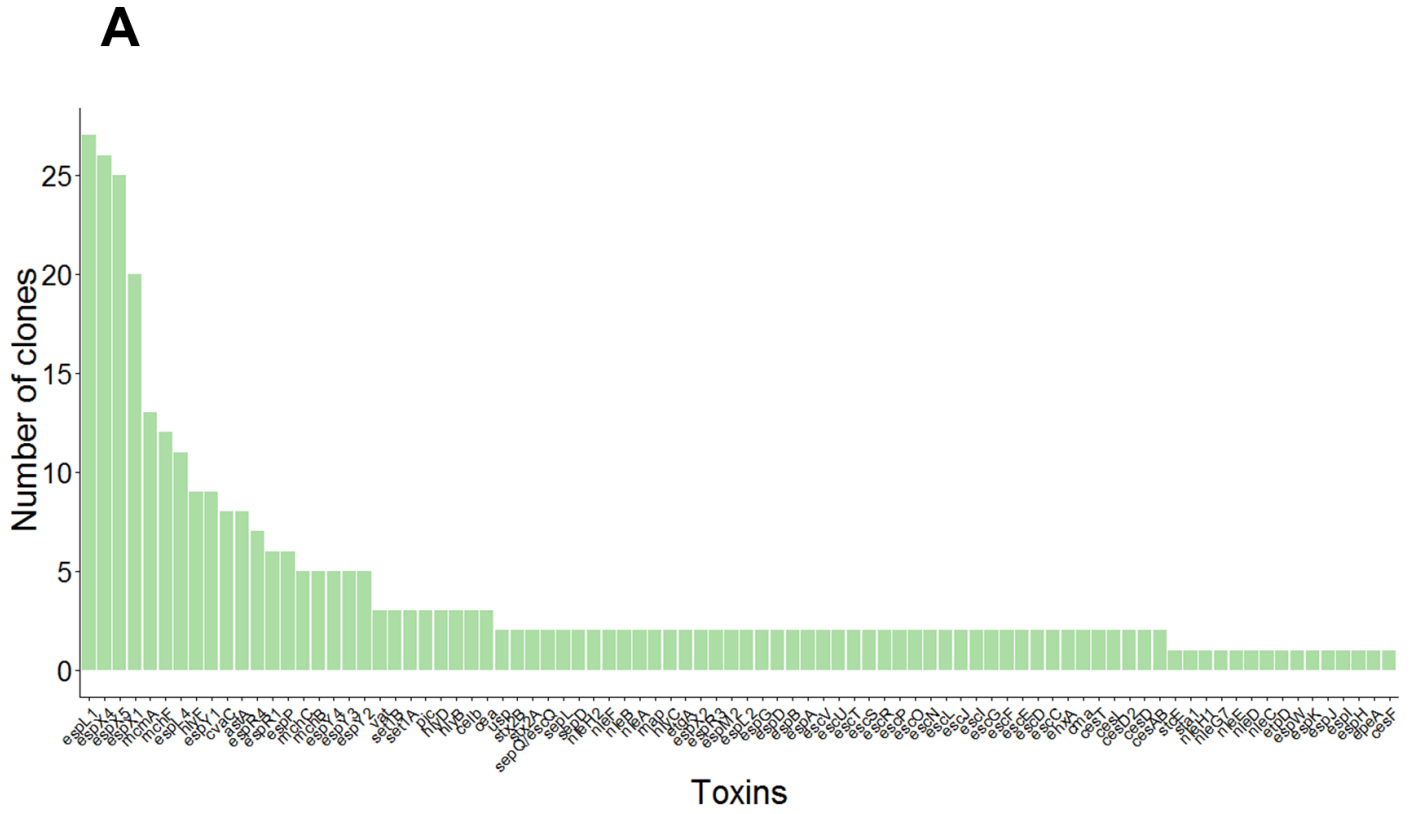


Figure 37. Gènes de virulence des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE. Les gènes codant pour une toxine sont indiqués dans le panel A, et ceux codant pour une protectine dans le panel B.



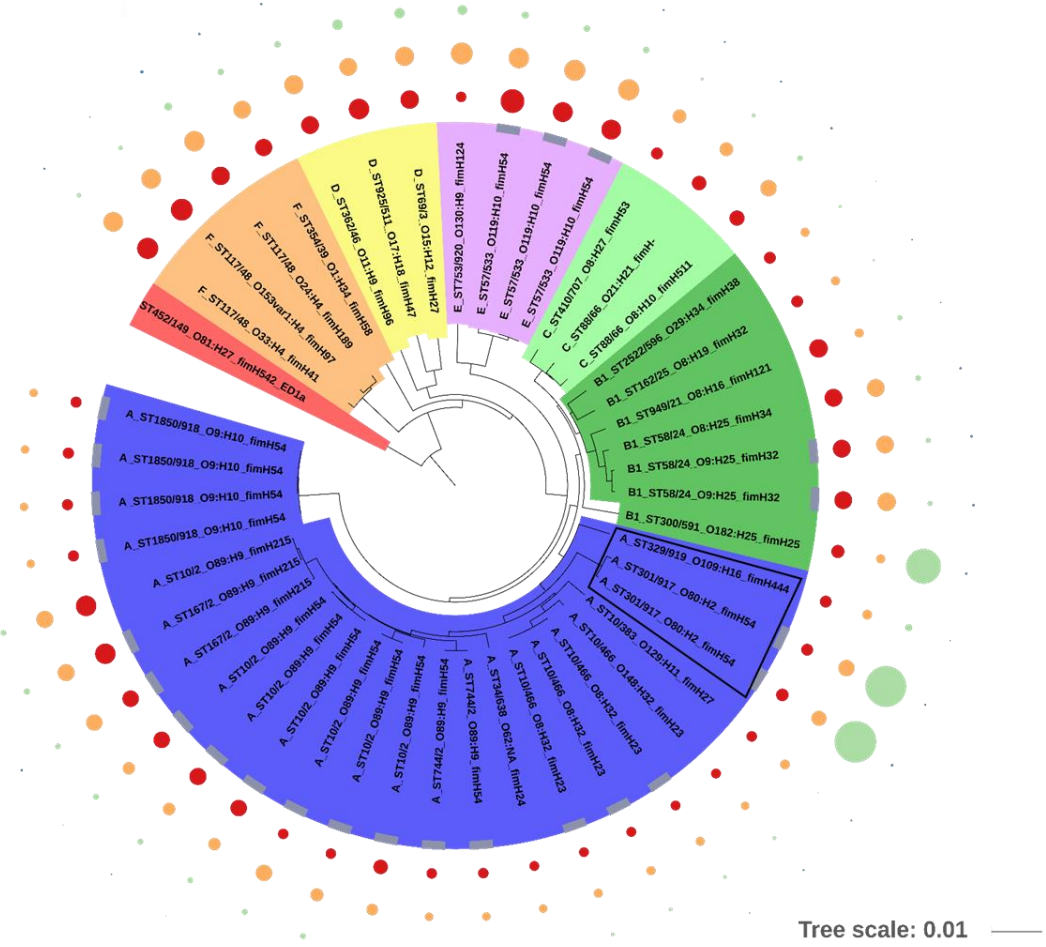
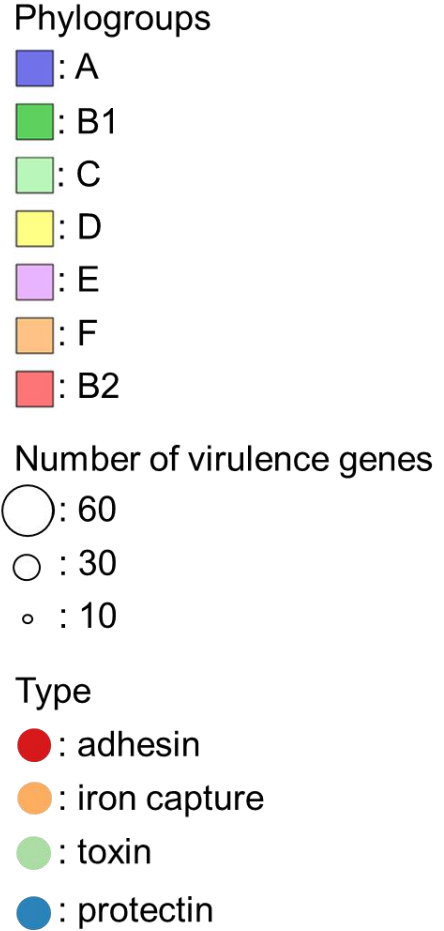
Les clones portaient plus de gènes codant pour des adhésines et des gènes impliqués dans la capture du fer que des gènes codant pour des toxines et des protectines (médiane valant respectivement 23, 24, 9, et 3 gènes, Table 15). Les clones possédaient donc plus de gènes codant pour des adhésines et impliqués dans la capture du fer que des gènes codant pour des toxines (Figure 38). En revanche, le maximum de gènes codant pour des toxines était de 63, contre respectivement 38 et 32 pour les adhésines et les gènes impliqués dans la capture du fer (Table 15). Cela indique qu'au moins un clone avait un contenu en gènes de virulence très enrichi en toxines. Sur la Figure 38, on voit que deux clones avaient un contenu enrichi en gènes codant pour des toxines, dont un porteur du gène *stx2* (clones « A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* », et « B1_ST300/591_O182:H25_ *fimH25* »). Les gènes codant pour des protectines étaient minoritaires par rapport aux trois autres classes (Table 15).

Table 15. Distribution du nombre de gènes de virulence dans les clones en fonction du type de virulence.

	Nombre de gènes détectés	Médiane	Min	Max	1 ^{er} quartile	3 ^{ème} quartile
Adhésines	64	23	15	38	18	28
Système de capture du fer	35	24	13	32	14	27
Toxines	86	9	2	62	6	11
Protectines	8	3	1	5	2	4
Total	193	66	34	109	37	71

Deux clones étaient porteurs du gène *stx2*. Il s'agissait des clones « A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* », et « A_ST329/919_O109:H16_ *fimH444* ». Le clone « A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* » était également porteur du gène *eae* (allèle 18) codant pour une intimine. Le contenu en gènes de virulence était le même pour les souches du clone « A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* », mis à part des variations dans la présence des gènes *hek* codant pour une adhésine, *iroE* et *iss* impliqués dans la capture du fer, *cea*, *nleB*, *nleC*, et *nleF* codant pour des toxines, et *ompT* codant pour une protectine.

Figure 38. Arbre de distance génétique des 45 isolats d'*E. coli* producteurs de BLSE construit avec la méthode mash et nombre de gènes de virulence en fonction du type de virulence. La distance entre deux génomes correspond à la proportion de k-mers de 21 nucléotides qu'ils partagent. L'identifiant de chaque souche est de format « groupe phylogénétique_sequence types_sérotype_allèle *fimH* ». Les feuilles de l'arbre sont colorées en fonction du groupe phylogénétique. Les clones pour lesquels plusieurs isolats ont été retrouvés sont indiqués par des rectangles gris. L'arbre a été raciné sur une souche du groupe phylogénétique B2, extérieure aux souches. Le terme « NA » dans le nom des clones signifie « gène absent ». Le nombre de gènes de virulence de chaque type sont indiqués à l'extérieur de l'arbre. Les clones porteurs de toxine de Shiga ont été encadrés en noirs.



Le contenu en gènes de virulence était identique entre les souches d'un même clone dans deux cas (clones « A_ST744/2_O89:H9_ *fimH54* » et « A_ST10/466_O8:H32_ *fimH23* », Figure 38), et identique à un gène près pour les souches de deux autres clones (clones « A_ST1850/918_O9:H10_ *fimH54* » dont une souche a acquis le gène *terC* codant pour une protectine, et « B1_ST58/24_O9:H25_ *fimH32* » dont une souche a acquis le gène *iucA* impliqué dans le système de capture du fer). Pour le clone « A_ST167/2_O89:H9_ *fimH215* », les mêmes gènes étaient présents dans les deux souches, mais le nombre de gènes de chaque souche variait de 71 à 63, avec la présence additionnelle des gènes *papX* et *afaA* à *afaE* pour les adhésines, *iss* pour le système de capture du fer, et *mchF* pour les toxines. Le contenu en gènes de virulence était le même pour les souches du clone « E_ST57/533_O119:H10_ *fimH54* », à l'exception de la présence additionnelle des gènes *papA* à *papD*, et *papH* à *papK*, et de l'absence de *iha* et *sfaX* pour les adhésines, de l'absence du gène *iss* impliqué dans la capture du fer et du gène *ompT* codant pour une protectine, et de la présence additionnelle du gène *mcmA* codant pour une toxine dans l'une des souches. Le clone « A_ST10/2_O89:H9_ *fimH54* » avait quatre génotypes de virulence distincts, dont le nombre de gènes codant pour des adhésines variait entre 16 et 26, le nombre de gènes impliqués dans la capture du fer variait entre 19 et 25, et le nombre de gènes codant pour des protectines variait de 1 à 3. Le nombre de gènes codant pour des toxines était le même pour toutes les souches et valait neuf.

Les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE possèdent des gènes de virulence de plusieurs types. Le virulome partagé par toutes les souches est constitué de gènes impliqués dans la capture du fer, et d'un gène codant pour une protectine. Le virulome de chaque souche est enrichi par un grand nombre de gènes de différents types, surtout des adhésines et des gènes impliqués dans la capture du fer (Figure 38). Ce virulome est extrêmement varié, notamment pour les gènes codant pour des toxines. Deux des souches porteuses d'un gène codant pour une toxine de Shiga étaient très enrichies en toxines par rapport aux autres. Dans la majorité des clones, le virulome variait peu entre les souches.

Synthèse

Parmi les 45 isolats, nous distinguons 29 clones avec la combinaison des cinq marqueurs obtenus de l'analyse des génomes complets. Les résultats obtenus sont cohérents avec l'étude

des profils PFGE. Toutefois, il s'est avéré que plusieurs souches séquencées appartenaient aux mêmes clones. Dans la ferme A, quatre, trois et deux souches appartenaient respectivement aux clones « A_ST1850/918_O9:H10_fimH54 », « A_ST10/466_O8:H32_fimH23 » et « E_ST57/533_O119:H10_fimH54 ». Dans la ferme B, deux souches appartenaient au même clone « A_ST167/2_O89:H9_fimH215 » et deux autres au clone « A_ST301/917_O80:H2_fimH54 ». Dans la ferme C, quatre et deux souches appartenaient respectivement aux clones « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 » et « A_ST744/2_O89:H9_fimH54 ». Pour les clones de la ferme A, la fin du profil de restriction de ces souches était flou pour certaines souches et a pu conduire à une erreur d'interprétation. Dans les fermes B et C, les profils des souches appartenant aux mêmes clones avaient des profils qui différaient d'au moins une bande. Dans la ferme B, cela peut s'expliquer par des transferts horizontaux, le génotype de résistance et de virulence étant différent entre ces clones. Dans les clones de la ferme C, les résistomes et les virulomes sont plus proches, voire identiques, entre les isolats. Un arbre phylogénétique basé sur les SNP du génome cœur permettrait de vérifier s'il s'agit de souches distinctes aux profils de restriction très proches ou de la même souche.

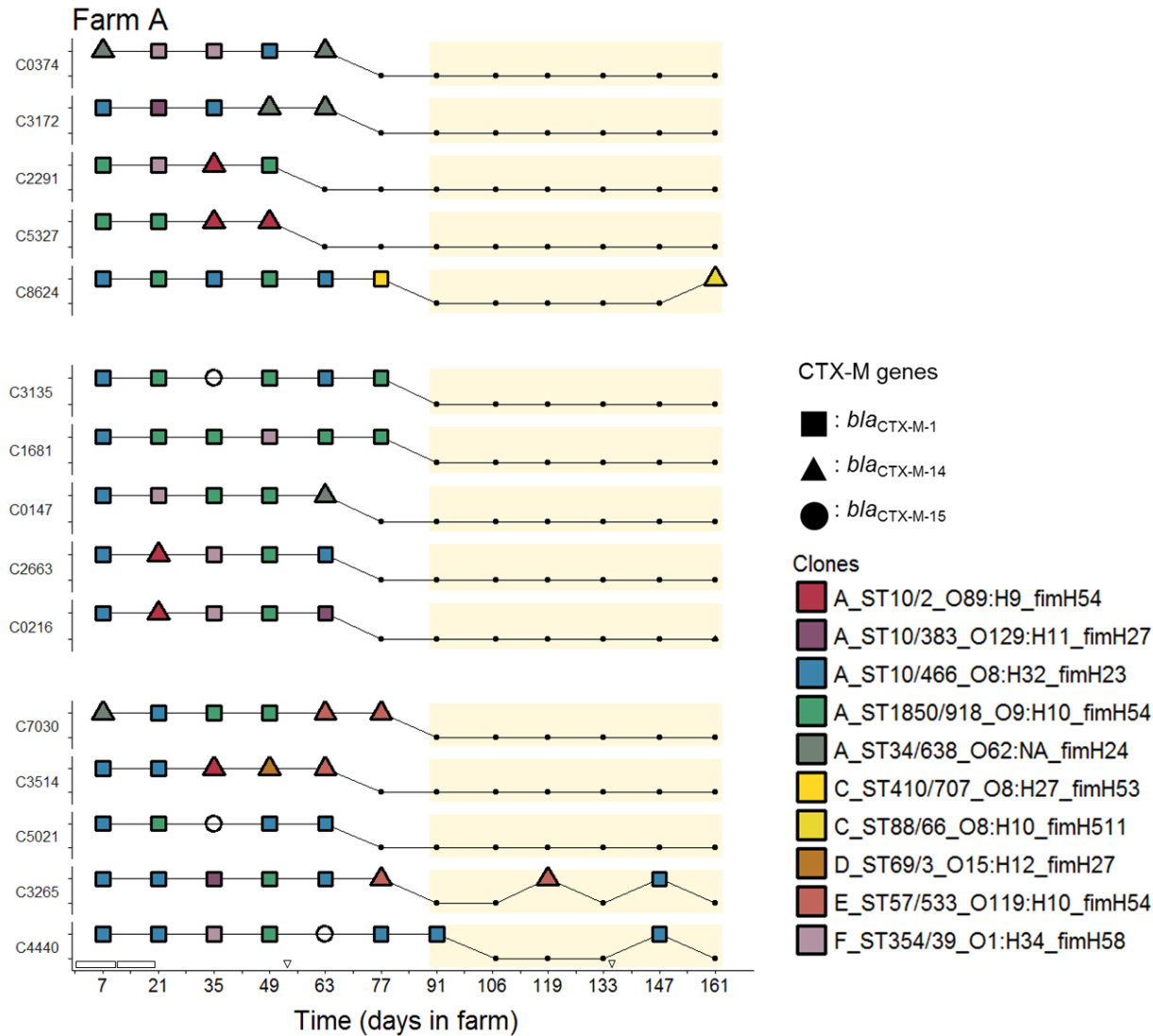
Les souches appartiennent à de nombreux clones répartis dans plusieurs groupes phylogénétiques, à l'exception du groupe B2, ce qui témoigne de la grande diversité de souches d'*E. coli* productrices de BLSE qui circulent dans les fermes d'engraissement. Le résistome et le virulome de souches appartenant au même clone varient, ce qui laisse supposer que certains de ces clones ont émergé depuis suffisamment longtemps pour voir apparaître des souches distinctes en leur sein. Des souches d'*E. coli* entérohémorragiques productrices de BLSE ayant un génotype multi-résistant ont été isolées dans les fèces des veaux de boucherie.

(iii) *Dynamique des clones d'E. coli producteurs de BLSE dans les fèces des veaux*Circulation des clones dans chaque ferme

Dans la ferme A, 10 clones ont été détectés. Cinq clones étaient porteurs respectivement d'un gène *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-14} (Figure 39). Aucun gène *bla*_{CTX-M-15} n'a été détecté chez les veaux de cette ferme. Au premier prélèvement, seuls trois clones sont détectés (clones « A_ST34/638_O62:NA_fimH24 », « A_ST10/466_O8:H32_fimH23 » et « A_ST1850/918_O9:H10_fimH54 », Figure 39). Onze veaux étaient colonisés par le clone « A_ST10/466_O8:H32_fimH23 ».

De nouveaux clones ont été détectés lors des prélèvements suivants. Au cours de l'engraissement, chaque veau était colonisé par une succession de clones, dont l'enchaînement variait d'un veau à l'autre. Ces clones n'ont jamais été détectés plus de deux fois de manière consécutive. Le clone « A_ST10/466_O8:H32_fimH23 » a été détecté à tous les prélèvements lors de la première moitié de l'engraissement, et était détecté dans deux veaux au dernier prélèvement (veaux C3265 et C4440, Figure 39). Il a été retrouvé chez 13 veaux sur 15 sur l'ensemble de l'engraissement. Le clone « A_ST1850/918_O9:H10_fimH54 » a également été détecté à tous les jours de prélèvements lors de la première période et au moins une fois chez 12 veaux (Figure 39). Trois clones ont été détectés au cours de la seconde période d'engraissement. Parmi eux, seul le clone « C_ST88/66_O119:H10_fimH511 » n'avait pas été détecté lors de la première moitié de l'engraissement (Figure 39). Dans cette ferme, où un traitement à la colistine a été donné pendant 10 jours à l'entrée, sept clones étaient porteurs du gène de résistance *mcr-1* (Figure 34 et Figure 39).

Figure 39. Détection des différents clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés chez les veaux de la ferme A au cours du temps. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons pour lesquels des *E. coli* producteurs de BLSE ont été isolés. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Les ronds vides correspondent à des souches dont le génome n'a pas été séquencé. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse. Les triangles et les rectangles vides représentent respectivement les traitements ayant couru sur un ou plusieurs jours.



Dans la ferme B, dix clones ont été détectés. Huit clones étaient porteurs d'un gène *bla*_{CTX-M-1} plasmidique, un clone était porteur d'un gène *bla*_{CTX-M-14} plasmidique (clone « B1_ST162/25_O8:H19_fimH32 »), et un clone était porteur d'un gène *bla*_{CTX-M-15} chromosomique (clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 »). Au premier prélèvement, deux clones étaient présents chez plusieurs veaux (veaux C6205 et C1601 partageant le clone « A_ST167/2_O89:H9_fimH215 », et veaux C1005 et C7640 partageant le clone « A_ST301/917_O80:H2_fimH54 », Figure 40). Le clone « B1_ST2522/596_O29:H34_fimH38 » a été isolé trois fois chez le veau C3253 (Figure 40). C'est le seul clone à avoir été isolé plusieurs fois au cours du temps dans cette ferme. Chez les veaux C1005, C2222 et C7640, il a été isolé dans les prélèvements suivants des clones différents de ceux isolés au premier prélèvement (clone « B1_ST58/24_O9:H25_fimH32 » au quatrième prélèvement chez le veau C1005, clone « B1_ST58/24_O8:H25_fimH34 » au deuxième prélèvement chez le veau C2222, Figure 40).

Dans la ferme C, 13 clones ont été détectés. Quatre clones étaient porteurs d'un gène *bla*_{CTX-M-1}, neuf d'un gène *bla*_{CTX-M-14}. Le gène *bla*_{CTX-M-15} a été retrouvé dans une souche appartenant au clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 », isolée deux fois chez le veau C5614 au début de l'engraissement (Figure 41). Au premier prélèvement, la plupart des veaux porteurs avaient un clone distinct des autres veaux. Les veaux C6230, C5071 et C3010 partageaient la même souche du clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 » (Figure 41). Les clones présents dans les premiers prélèvements étaient porteurs de gènes de résistance aux sulfamides, triméthoprim, et tétracycline, qui sont les antibiotiques utilisés au début de l'engraissement dans cette ferme (Figure 34 et Figure 41). Au cours du troisième prélèvement, on observe l'émergence d'un nouveau clone « A_ST744/2_O89:H9_fimH54 », qui n'avait jamais été détecté auparavant (Figure 41). Ce clone était présent chez 12 veaux sur 14 (tous sauf les veaux C2235 et C2391) au troisième prélèvement, dont les trois veaux initialement non porteurs. Ce clone ne persistait que chez six des veaux de manière transitoire au cours des deux prélèvements suivants (veaux C9826, C0196, C6230, C6567, C5071 et C3010), et a été isolé une dernière fois chez le veau C5071 au début de la deuxième moitié de l'engraissement. A partir du début de la deuxième période, un nouveau clone « B1_ST300/591_O182:H25_fimH25 » a émergé en l'espace de 15 jours chez cinq veaux

(veaux C5614, C6230, C1232, C2827 et C6567, Figure 41). Puis, un clone a émergé chez tous les veaux sur une période de 14 jours au 119^{ème} jour ou au 133^{ème} jour. Il s'agissait du clone « A_ST329/919_O109:H16_fimH444 », porteur d'un gène *bla*_{CTX-M-1} plasmidique et du gène *stx2* (Figure 41). Ce clone n'a été détecté chez aucun veau lors de la première période. Il ne persistait que chez deux veaux lors du dernier prélèvement.

Trois clones ont été isolés dans plusieurs fermes. Des souches appartenant au clone « A_ST10/2_O89:H9_fimH54 » ont été retrouvées circulant dans les trois fermes. Les souches de ce clone étaient porteuses d'un gène *bla*_{CTX-M-14} dans les fermes A et C et d'un gène *bla*_{CTX-M-15} dans les fermes B et C. Ces souches n'ont été détectées que durant les deux premiers mois d'engraissement. Deux souches appartenant au même clone « B1_ST58/24_O9:H25_fimH32 » et porteuses d'un gène *bla*_{CTX-M-1} ont été isolées chez un veau de la ferme B (veau C1005 au quatrième prélèvement, Figure 40) et un veau de la ferme C (veau C2391 au premier prélèvement, Figure 41). De même, deux souches du clone « E_ST57/533_O119:H10_fimH54 » porteuses d'un gène *bla*_{CTX-M-14} ont été isolées chez trois veaux de la ferme A (veaux C7030, C3514 et C3265 à partir du cinquième prélèvement, Figure 39) et un veau de la ferme C (veau C1232 au deuxième prélèvement, Figure 41).

Figure 40. Détection des différents clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés chez les veaux de la ferme B au cours du temps. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons pour lesquels des *E. coli* producteurs de BLSE ont été isolés. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Le rond vide correspond à une souche dont le génome n'a pas été séquencé. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse par des triangles vides.

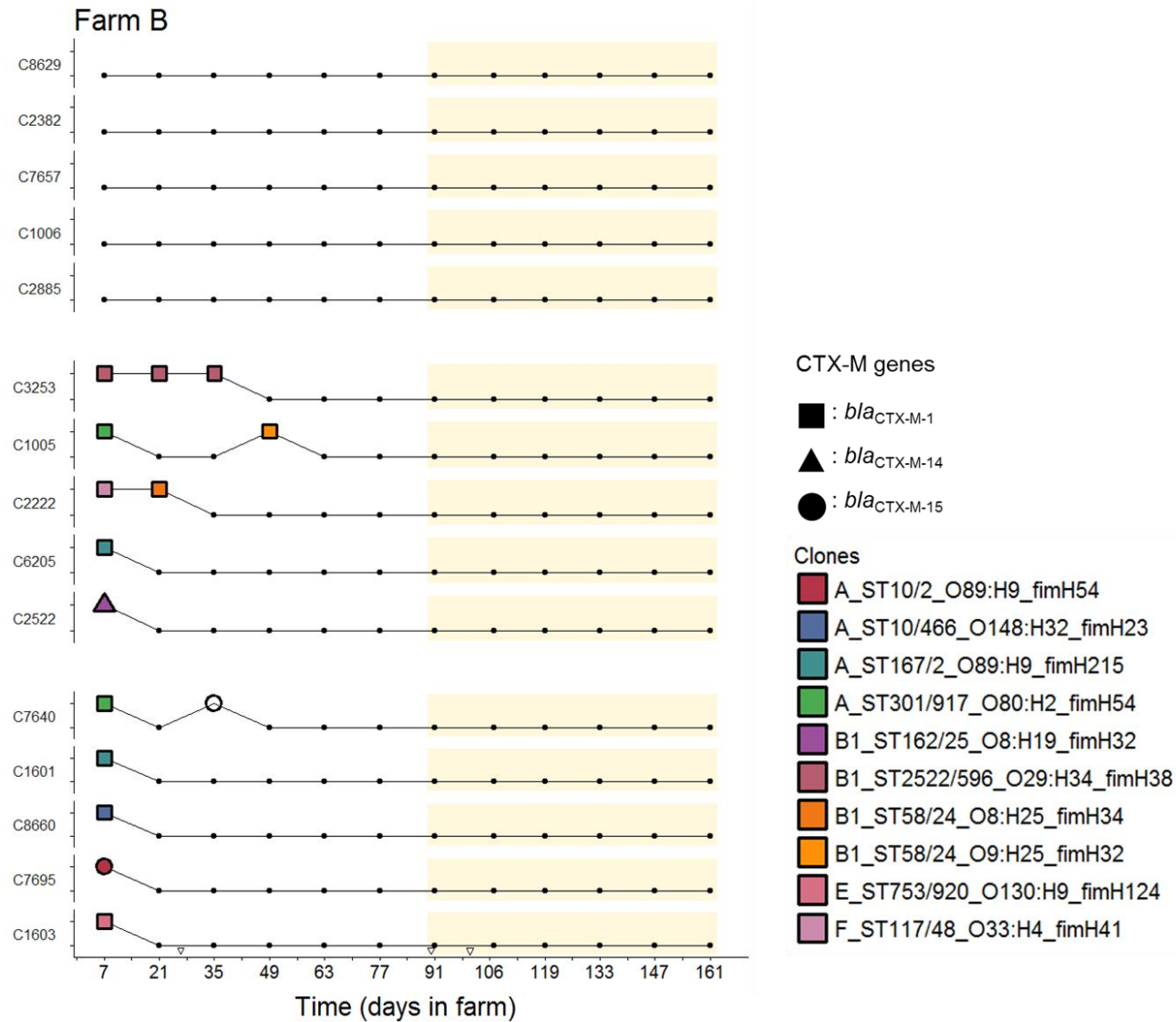
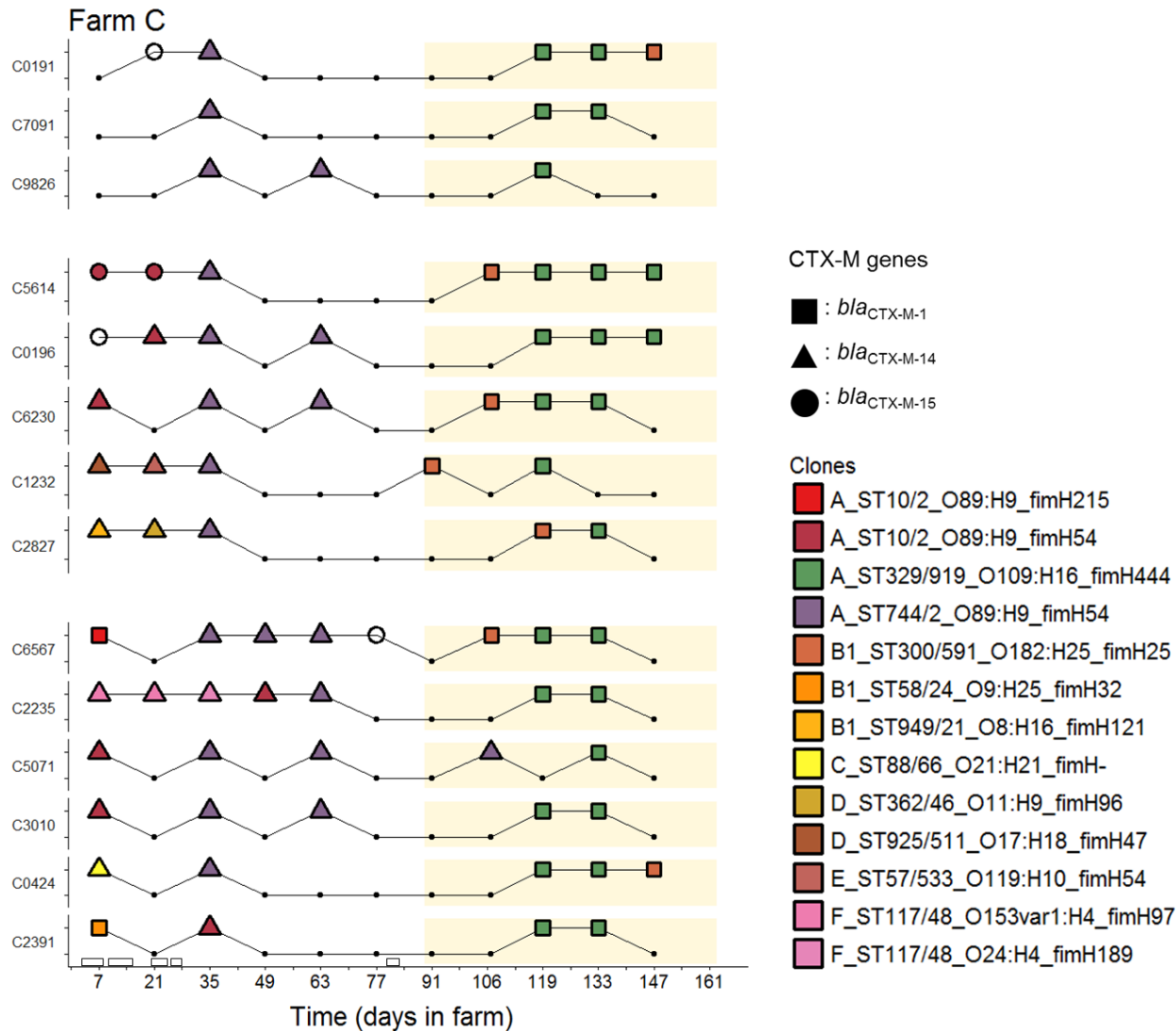


Figure 41. Détection des différents clones d'*E. coli* producteurs de BLSE isolés chez les veaux de la ferme C au cours du temps. Les points de grande taille et situés en hauteur correspondent à des échantillons pour lesquels des *E. coli* producteurs de BLSE ont été isolés. Les numéros des veaux sont indiqués à gauche de leur profil respectif et sont ordonnés par parc. Le fond beige marque la deuxième moitié de la période d'engraissement. Les ronds vides correspondent à des souches dont le génome n'a pas été séquencé. Les traitements antibiotiques sont indiqués au-dessus de l'abscisse. Les triangles et les rectangles vides représentent respectivement les traitements ayant couru sur un ou plusieurs jours.

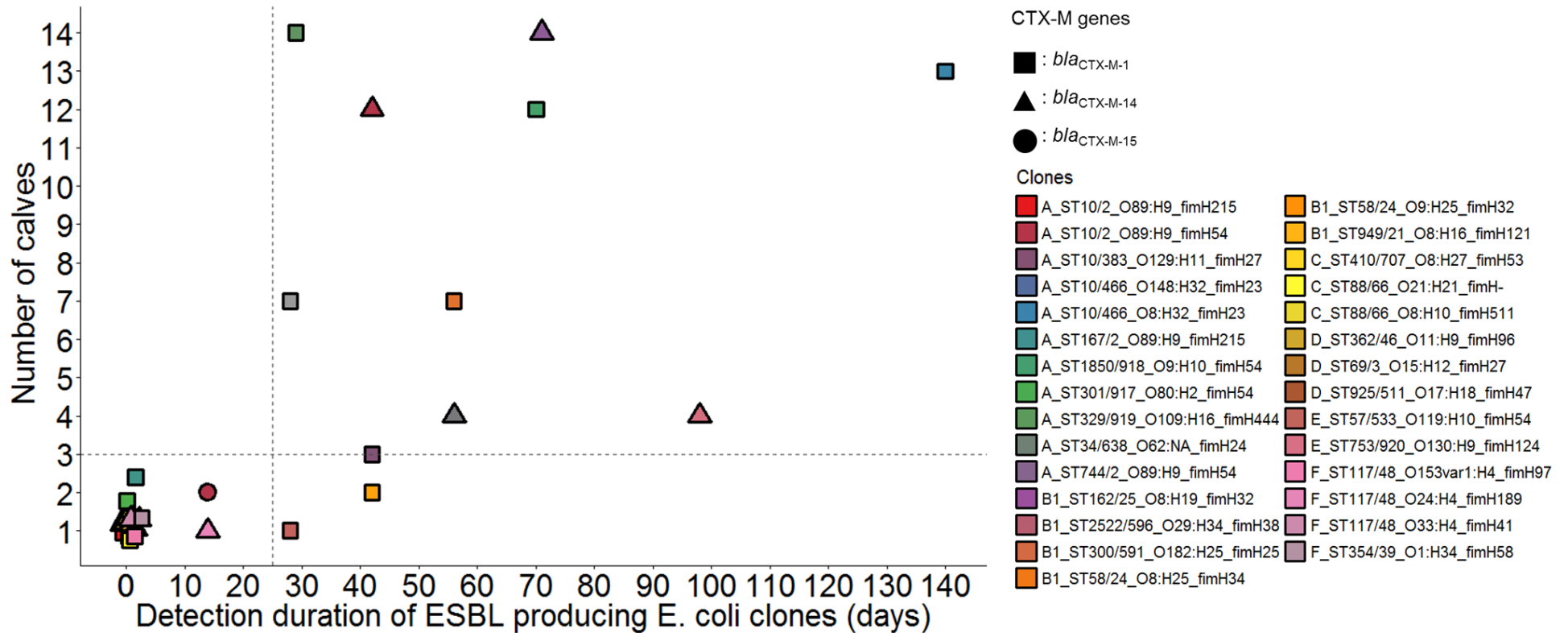


Dans la ferme A, la majorité des veaux étaient colonisés par un clone lors de la première semaine d'engraissement, puis une succession de clones a eu lieu au cours de la première moitié de l'engraissement chez tous les veaux, dont certains étaient détectés jusqu'à la fin de l'engraissement. Dans la ferme B, les veaux étaient colonisés par des clones différents en début d'engraissement qui ne diffusaient pas entre les veaux et ne se maintenaient pas à long terme. Dans la ferme C, deux épisodes de colonisation massive et transitoire des veaux ont eu lieu, au début et à la fin de l'engraissement, par deux clones du même groupe phylogénétique mais porteurs de gènes *bla_{CTX-M}* différents, et qui n'ont été détectés chez aucun veau en amont de l'épisode. Quelques rares clones ont été isolés dans plusieurs fermes.

Caractéristiques de diffusion et de persistance des clones

Dix-sept clones (59%) ont été détectés chez moins de trois veaux et sur une période inférieure à trois semaines (Figure 42). Beaucoup de clones n'ont été détectés que chez un veau et dans un seul prélèvement. La période maximale de détection d'un clone au sein d'un même veau est de 28 jours (clone « B1_ST2522/596_O29:H34_ *fimH38* », Figure 42). Ces clones circulent de manière transitoire dans les fermes et diffusent très peu entre les veaux. Cinq clones (17%) ont été isolés chez plus de onze veaux sur des périodes allant de 28 jours à 140 jours (Figure 42). Ces clones sont d'excellents colonisateurs du tube digestif des veaux et sont capables de circuler dans les fermes sur de longues périodes. Six clones (21%) ont été isolés chez quelques veaux (entre deux et sept) sur des périodes allant de 28 jours à 98 jours (Figure 42). Ces clones sont de bons colonisateurs et circulent également dans les fermes sur de longues périodes. Aucun clone présent chez plus de trois veaux n'a été détecté sur une période inférieure à un mois. Les clones capables de diffuser au sein des fermes persistent sur de plus longues périodes que les clones qui ne diffusent pas.

Figure 42. Nombre de veaux colonisés par un clone d'*E. coli* producteur de BLSE en fonction de sa durée de détection dans une ferme. Chaque point correspond à un clone. La durée de détection est la durée entre le jour du premier et du dernier prélèvement dans lesquels le clone a été détecté. Pour les clones retrouvés dans plusieurs fermes, la durée de détection la plus longue au sein d'une ferme est donnée. Les clones détectés dans le même nombre de veaux et sur une durée égale ont été espacés afin d'éviter leur superposition. Les lignes verticales et horizontales ont été tracées arbitrairement et respectivement à 25 jours et trois veaux.



Synthèse

Au cours de l'engraissement, trois phénotypes de portage d'*E. coli* producteurs de BLSE chez le veau apparaissent : des veaux non colonisés, des veaux colonisés en début d'engraissement dont le portage persiste, et des veaux colonisés en début d'engraissement dont le portage ne persiste pas au-delà de la première moitié de l'engraissement. Ces phénotypes sont répartis différemment selon les fermes et l'existence d'un traitement antibiotique prolongé reçu à l'entrée.

Les veaux de boucherie sont colonisés par de nombreuses souches d'*E. coli* productrices de BLSE phylogénétiquement diverses, exception faite du groupe B2. La majorité des souches possédaient les gènes *bla*_{CTX-M-1} et *bla*_{CTX-M-14}, sur des plasmides. Ces souches sont multi-résistantes, et les supports génétiques de ces résistances diffèrent. Elles partagent un génome cœur de virulence qui compte plusieurs gènes impliqués dans la capture du fer et le gène *ompA* codant pour une protectine. Les gènes codant pour des adhésines et ceux impliqués dans le système de capture du fer représentent la majorité du génotype de virulence d'une souche. Certaines sont capables d'enrichir leur répertoire avec des gènes additionnels codant pour des toxines, dont une STEC. La persistance de portage de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE dans les fermes d'engraissement passe par des colonisations successives des veaux par de nouveaux clones. Les clones ne semblent pas persister plus de deux mois dans le tube digestif d'un même veau. La majorité circule de manière transitoire dans les fermes et diffuse très peu entre les veaux. D'autres sont de bons colonisateurs et se maintiennent plus longtemps dans les fermes, en diffusant au sein du lot. La persistance des clones au cours du temps au sein des fermes semble augmenter avec le nombre de veaux qu'ils colonisent. Deux souches STEC productrices de BLSE ont été isolées, dont une ayant été excrétée par tous les veaux au sein d'une ferme sur une période de deux semaines en fin d'engraissement.

c. Discussion et perspectives

Plusieurs clones d'*E. coli* producteurs de BLSE circulent dans les fermes dès la première semaine d'engraissement. Une hypothèse est que ces clones pourraient avoir colonisé les veaux dans les élevages naisseurs et avoir été transportés avec les veaux dans les fermes d'engraissement. Un argument en faveur de ce scénario est l'existence de plusieurs clones porteurs de différents gènes *bla*_{CTX-M} lors du premier prélèvement dans la ferme B, où aucun traitement antibiotique n'a été donné et n'a donc pas pu favoriser un transfert de plasmides ou de souches portant les gènes *bla*_{CTX-M}. Par ailleurs, une étude a montré que la diversité d'origine des veaux était un facteur de risque de présence de bactéries résistantes aux antibiotiques en ferme d'engraissement (151).

Une partie des clones est détectée de manière transitoire chez un ou deux veaux. Une étude menée sur des carcasses de veaux de boucherie a montré que la quasi-totalité des souches d'*E. coli* productrices de BLSE étaient sous-dominantes dans la population d'*E. coli* (150). Ces deux faits suggèrent qu'une grande partie des souches d'*E. coli* productrices de BLSE portées par les veaux de boucherie ne persistent pas plus de deux semaines chez un même veau et sont présentes en faibles quantités dans le tube digestif. Le portage de gènes conférant une résistance aux céphalosporines de dernières générations concerne donc principalement une sous-population minoritaire de la flore d'*E. coli* du veau de boucherie.

Une association entre les traitements antibiotiques à l'entrée et la persistance des clones producteurs de BLSE semble exister. Ces clones sont porteurs de gènes de résistance à plusieurs familles antibiotiques. On observe notamment la présence et la persistance au cours du temps de sept clones ayant le gène *mcr-1* dans la ferme A, où un traitement à la colistine a été administré aux veaux pendant 10 jours. Dans la ferme C, les clones présents en début d'engraissement présentaient des gènes de résistance aux sulfamides, triméthoprime, et tétracycline, qui sont les antibiotiques utilisés au début de l'engraissement. Une étude basée sur le suivi de la consommation des stocks d'antibiotiques dans les fermes d'engraissement a montré que les traitements antibiotiques représentaient le facteur de risque le plus élevé pour le portage d'*E. coli* résistants en fin d'engraissement (109). Les traitements antibiotiques prolongés dans les fermes A et C ont probablement constitué un avantage sélectif pour les clones producteurs de BLSE, et ont donc favorisé leur portage par les veaux, au détriment de

clones sensibles. Ainsi, tout traitement antibiotique est susceptible de favoriser l'émergence d'*E. coli* producteurs de BLSE dans le tube digestif des veaux par le biais de la co-résistance. Toutefois, on remarque que l'association qui semble exister entre les traitements antibiotiques et le portage de clones producteurs de BLSE n'est pas linéaire. En effet, on observe l'émergence de clones chez des veaux dans les trois fermes à distance des traitements antibiotiques, et deux événements de colonisation massive des veaux par des clones producteurs de BLSE dans la ferme C. Cela suggère que d'autres mécanismes que la sélection par les antibiotiques sont impliqués dans le maintien de ces clones au sein du tube digestif des veaux. De plus, si les veaux des fermes A et C ont tous reçus des traitements antibiotiques prolongés à l'entrée, la persistance des clones producteurs de BLSE à l'échelle de la ferme est plus longue dans la ferme A que dans la ferme C. Ceci pourrait être en lien avec la nature des traitements antibiotiques utilisés et le spectre de résistance des populations commensales d'*E. coli* des veaux. En effet, la résistance aux sulfamides, triméthoprime, et tétracycline est fréquente dans la flore dominante d'*E. coli* du veau de boucherie (fréquences respectivement estimées à 61%, 40% et 80%) (150), contrairement à la colistine dont la fréquence chez les isolats de veaux a été estimée à 1% (225). On peut donc supposer que la flore dominante d'*E. coli* et la taille de population sensibles aux antibiothérapies étaient plus grandes dans la ferme A que dans la ferme C. Cela a pu favoriser une colonisation plus efficace et une persistance à plus long terme des veaux dans la ferme A par les clones producteurs de BLSE porteurs du gène *mcr-1*. Contrairement à la faible prévalence de ce gène dans les souches d'*E. coli* non productrices de BLSE, la proportion de clones porteurs du gène *mcr-1* parmi les producteurs de BLSE est en augmentation constante chaque année, et est, par exemple, passée de 5% en 2006 à 21% en 2014. Les différents antibiotiques auraient donc une efficacité de sélection des clones producteurs de BLSE dépendant du résistome de la flore commensale. La co-occurrence des gènes *bla_{CTX-M1}* et *mcr-1* sur un même plasmide de type IncHI2 a déjà été mise en évidence (225). Dans ce plasmide, ont également été retrouvés des gènes de résistance aux tétracyclines et aux sulfamides. Nous prévoyons d'étudier plus en détails le contenu plasmidique de ces souches, afin de caractériser les plasmides circulant et de pouvoir comparer l'efficacité de la diffusion des clones et des plasmides au sein des fermes. On peut déjà supposer que l'usage de la colistine en début d'engraissement rend le portage digestif de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE plus long que d'autres antibiotiques chez le veau de boucherie. La colistine étant l'une des molécules antibiotiques les plus souvent utilisées au

démarrage de l'engraissement du veau de boucherie (108), l'interdiction de son utilisation à cette période de la vie des veaux contribuerait certainement à la lutte contre les clones producteurs de BLSE, en maintenant un plus grand nombre de souches d'*E. coli* commensales dans le tube digestif des veaux et ainsi une barrière à la colonisation par des souches productrices de BLSE porteuses du gène *mcr-1*.

Les clones sont phylogénétiquement très divers. Des clones appartenant à tous les groupes phylogénétiques ont été détectés dans les fèces des veaux, excepté le groupe phylogénétique B2. Ce groupe phylogénétique est très prévalent chez l'homme, mais on en retrouve peu chez l'animal domestique (69, 70). La majorité des clones producteurs de BLSE appartiennent aux groupes phylogénétiques A, B1, et D, qui sont des groupes phylogénétiques très prévalents dans les populations commensales d'*E. coli* des bovins domestiques (69, 70). La fréquence des groupes phylogénétiques est cohérente avec ce qui a été déjà rapporté chez les souches résistantes aux antibiotiques du veau (67, 150, 226). De plus, trois clones appartenant au complexe clonal 87 (CC87), du groupe phylogénétique B1, ont été détectés. Le CC87 est un complexe clonal ayant connu un succès évolutif chez l'animal (146). Il constitue un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques chez les animaux, notamment à la tétracycline, l'amoxicilline, la streptomycine et les sulfamides. Il a été montré que le CC87 avait une grande capacité à accepter et donner des plasmides par conjugaison, et qu'il pouvait diffuser à l'homme par contacts rapprochés (146). Au sein du CC87, des souches productrices de BLSE appartenant au ST 58 ont été retrouvées dans les fermes B et C. Le ST 58 a déjà été isolé chez des veaux de boucherie à l'abattoir (150). Par ailleurs, le ST 57, du groupe phylogénétique E et isolé dans les fermes A et C, a déjà été détecté dans des fermes aux Pays-Bas, chez des souches porteuses du même gène *bla_{CTX-M 14}* (163). La présence de clones dans des fermes différentes et déjà isolés auparavant suggère que certaines lignées clonales sont répandues et circulent à plus large échelle qu'une ferme d'engraissement. Les gènes *bla_{CTX-M 1}* et *bla_{CTX-M 14}* étaient majoritaires au sein des souches productrices de BLSE, et associés à d'autres résistances, ce qui est cohérent avec les études menées chez le veau (226).

La présence d'un grand nombre de gènes codant pour des adhésines et impliqués dans la capture du fer chez tous les clones pourrait constituer un avantage adaptatif à la colonisation du tube digestif. En effet, l'implication dans la réussite de la colonisation du tube digestif d'ilots génomiques porteurs de gènes de virulence extra-intestinaux a été décrite (210, 227).

En possédant un arsenal d'adhésines, ces clones pourraient mieux adhérer à leur support et ainsi conserver un taux de croissance limité compte tenu des ressources, mais suffisant pour compenser leur élimination avec le mucus dégradé par le péristaltisme intestinal (81). La présence de certains gènes impliqués dans la capture du fer pourrait être une autre façon d'améliorer leur adaptation au tube digestif du veau de boucherie, dont l'alimentation essentiellement lactée est pauvre en fer, et qui permettrait une meilleure captation du fer par l'acquisition de gènes spécifiques. Les gènes *fes*, *fepA* à *fepD*, *fepG*, *entA* à *entF* et *entS* sont impliqués dans la synthèse cytoplasmique de l'entérobactine, son export hors de la cellule et son transport sous forme liée à un ion Fe^{3+} vers l'intérieur de la cellule (228). Leur présence a été détectée chez tous les clones. La présence d'autres gènes de virulence, tels que ceux impliqués dans le système de capture du fer de l'aérobactine (gènes *iucABCD*, *iutA*), de la salmochéline (*iroBCDEN*), de la yersiniabactine (gènes *irp2*, *fyuA*), et dans l'utilisation de l'hème (gènes *chuASTUVWXY*) suggère que des systèmes additionnels de capture du fer représentent un avantage dans le tube digestif du veau de boucherie.

En résumé, les groupes phylogénétiques des clones, la présence d'un CC adapté aux animaux et la présence de plusieurs systèmes de capture du fer laissent supposer que les clones qui circulent dans les fermes d'engraissement, et plus largement dans la filière, sont des clones adaptés à l'écosystème digestif des bovins.

Certains clones que nous appellerons « diffuseurs » sont d'excellents colonisateurs et diffusent très rapidement chez tous les veaux d'une ferme. Ils persistent à l'échelle de la ferme sur de longues périodes, et peuvent être à l'origine d'une colonisation massive de l'ensemble des veaux d'une ferme. La transmission pourrait être à la fois directe, le clone passant d'un veau à l'autre au sein d'un même parc et entre les parcs, et indirecte. Plusieurs études appuient l'hypothèse d'une transmission indirecte. En effet, une association entre le port des mêmes vêtements de travail plusieurs jours d'affilée par les soigneurs et la prévalence d'*E. coli* résistants chez des veaux de boucherie a été mise en évidence (109). Les éleveurs pourraient ici jouer le rôle de vecteur. En effet, les clones diffusaient chez les veaux de différents parcs au sein de chaque ferme, ce qui est cohérent avec une autre étude ayant suivi le portage d'*E. coli* producteurs de BLSE dans des fermes d'engraissement (163). Ces clones « diffuseurs » doivent passer par une étape intermédiaire hors du tube digestif, et donc être dotés d'une capacité de survie élevée dans l'environnement extérieur. Pour passer d'un

animal à l'autre, ils doivent être capables de résister à la dessiccation, aux rayons U.V., et aux baisses de température. Une capacité à former des biofilms peut constituer un avantage hors du tube digestif pour résister à ces conditions (229, 230). Ce phénotype a été retrouvé associé à la persistance de souches dans les systèmes de distribution d'eau potable (231). Ils doivent aussi réussir à passer le rumen, et la barrière stomacale. La résistance des souches d'*E. coli* à l'acide stomacal varie, car elle dépend de l'activité du régulateur de réponse au stress RpoS (232). Les clones transitoires ne diffusent pas, ou très peu entre les veaux. En revanche, les clones qui persistent au sein des fermes sont ceux qui colonisent beaucoup de veaux. Il existe un gradient de capacité de diffusion et de persistance des clones diffuseurs, dont certains sont détectés pendant 28 jours alors que d'autres persistent jusqu'à 140 jours. Une hypothèse pour expliquer ce gradient d'efficacité dans la colonisation d'hôtes et de persistance dans le temps pourrait être une différence d'abondance relative de ces clones dans les populations d'*E. coli* excrétées dans les fèces. Une étude chez l'homme a montré que lorsque l'abondance relative d'*E. coli* multi-résistants au retour de voyages à l'étranger était élevée, les personnes excrétaient plus longtemps ces *E. coli* que d'autres voyageurs dont l'abondance d'*E. coli* multi-résistants au retour de voyage était faible. On peut supposer la présence d'un ou plusieurs veaux « super-excréteurs » au début de la seconde moitié de l'engraissement dans la ferme C à l'origine de la colonisation de tous les veaux par un clone à la fois producteur de BLSE et de toxines de Shiga. Il a été montré que, pour persister au sein d'une ferme, une souche d'*E. coli* O157:H7 était capable de maintenir une double capacité à survivre dans le tube digestif et à l'extérieur des bovins, deux environnements très différents (233). La capacité de ce *E. coli* O157:H7 à former des biofilms dans les fèces de bovins était variable suivant la température, et maximale pour une température de 15°C, ce qui suggère un métabolisme adapté à la survie en milieu extérieur. La meilleure capacité des STEC à diffuser pourrait être liée à une meilleure capacité à former des biofilms dans les fèces de bovins que d'autres souches commensales bovines, ainsi que l'induction de certains gènes impliqués dans le stress chimique et nutritif (233). Ils pourraient donc survivre plus efficacement dans le fumier, maintenir une taille de population plus grande, et ainsi de coloniser de nouveaux veaux avec un inoculum plus grand.

Ces clones diffuseurs ont pu accumuler des mutations bénéfiques ou acquérir de nouveaux gènes au cours du temps (83), ce qui a entraîné une élévation de leurs capacités métaboliques pour les principales sources de nutriments de l'espèce ou l'investissement d'une nouvelle

niche écologique (100) leur permettant de continuer à circuler à bas bruit sur de longues périodes. Il est prévu d'explorer la répartition des gènes du virulome dans les clones regroupés en fonction de leur spectre d'efficacité de colonisation et de persistance dans le temps. Si un lien entre le virulome et la persistance ou l'efficacité de colonisation existe, il semblerait plus du fait de la présence de gènes particuliers que d'un nombre plus élevé. Par exemple, le clone « A_ST10/466_O8:H32_ *fimH23* » ayant persisté plus de quatre mois possédait un nombre total de gènes de virulence et pour chaque type de virulence faible (Figure 38). Nous envisageons également l'exploration du contenu du génome variable pour chercher des voies métaboliques différentes, afin d'explorer l'hypothèse d'un lien entre le métabolisme des clones et leur spectre d'efficacité de colonisation.

Si les clones producteurs de BLSE sont adaptés au tube digestif des veaux et capables de se transmettre grâce à une aptitude à survivre dans l'environnement accrue, on observe toutefois une décroissance de leur portage au cours du temps, notamment dans les fermes A et B. Aucun clone n'a été retrouvé chez le même veau sur une période supérieure à un mois, et plus de la moitié n'a été isolée qu'une seule fois. On peut supposer l'existence d'un coût de la résistance de la plupart des clones en l'absence de traitement antibiotique. Afin d'explorer cette hypothèse, nous prévoyons de chercher un lien entre la durée de portage de clones et la présence de gènes de résistance.

Aucune des souches STEC productrices de BLSE n'appartenait aux principaux sérogroupes pathogènes pour l'homme (O157, O26, O111, O103 et O145). En revanche, le clone « A_ST301/917_O80:H2_ *fimH54* » présentait les caractéristiques d'un pathotype hybride en émergence en France, décrit dans des syndromes hémolytiques et urémiques associés à des septicémies chez l'homme (234). Il était porteur des gènes *stx2*, *ehxA*, *efa1*, *espP* et de quatre gènes associés au plasmide pS88 (*iss*, *iroN*, *hlyF*, *ompT*) (235). Ce plasmide est responsable de méningites néonatales et est apparenté aux plasmides de souches pathogènes aviaires (235). Ce clone a déjà été décrit chez des veaux en 2017 en Belgique, dans une collection d'*E. coli* isolés dans des diarrhées (236). Des souches du séro groupe O80 porteuses des gènes *stx1*, *ehxA* et *eae* ont également été détectées en Espagne (237).

Il est prévu de soumettre ce travail pour publication dans une revue scientifique à comité de lecture.

Discussion générale & conclusion

Le portage d'*E. coli* pathogènes et résistants aux antibiotiques chez les bovins domestiques constitue un enjeu majeur de santé publique. La contamination des denrées alimentaires au cours du processus d'abattage ou lors de l'épandage du fumier sur les parcelles agricoles, suivie de leur consommation, font des cheptels bovins un réservoir de souches résistantes aux antibiotiques et pathogènes pour l'homme. Le risque est majoré pour les populations humaines en contact avec les animaux par une transmission oro-fécale directe (136). Les épidémies graves dues aux STEC (238), et la multiplication des infections à *E. coli* multi-résistants conduisant à des échecs thérapeutiques (104) rappellent l'importance de comprendre le jeu des forces qui régissent leur maintien au sein des populations commensales d'*E. coli* du réservoir bovin. Dans ces travaux, nous avons eu recours à deux modèles bovins pour comprendre la dynamique du portage fécal de souches d'*E. coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux populations commensales d'*E. coli* de vaches adultes en l'absence d'exposition antibiotique, dans une zone rurale proche d'un parc national au Zimbabwe. Parmi tous les troupeaux de la zone, ces vaches présentaient l'avantage de pâturer à la lisière du parc, dans une zone sans habitation humaine ni élevage. Nous avons identifié la zone dans laquelle vivaient ces bovins comme une zone où l'impact des activités humaines sur les communautés bactériennes des bovins était aussi faible que possible, l'élevage étant un système semi-pastoral dans une zone semi-aride où l'agriculture industrielle et d'autres formes d'industrie étaient absentes (239). Nous avons mis en évidence des populations commensales d'*E. coli* multiclones et spécifiques de leur hôte, mais dont le taux de rotation des clones dominants était similaire entre les vaches et la taille de population stable sur une courte période de temps.

Dans un second temps, nous avons étudié les communautés bactériennes de veaux de boucherie dans des fermes d'engraissement en Bretagne, où le secteur agricole est très développé, et dont la majeure partie des exploitations repose sur une production industrielle. La race prédominante dans la production du veau de boucherie est la race Holstein, dont la sélection a conduit à une diminution importante de la diversité génétique des individus. Les lots de veaux sont constitués de façon à ce qu'ils présentent le maximum de ressemblances en termes de sexe, d'âge, et de poids. Le type d'élevage de ces veaux est intensif, c'est-à-dire qu'ils sont élevés sur une surface réduite, dans des bâtiments fermés où la densité animale est élevée. Les conditions d'ambiance ne sont pas soumises aux aléas climatiques, et leur

alimentation est contrôlée tout au long de l'engraissement. Dès leur plus jeune âge, ils reçoivent par voie orale sur de longues périodes des traitements antibiotiques polychimiques. Dans une première étude, nous avons mis en évidence une transformation du microbiote fécal de ces veaux au cours de l'engraissement, avec une augmentation de la diversité et un phénomène de convergence accélérée dès le premier mois d'engraissement, aboutissant à une composition homogénéisée entre tous les veaux, avec une tendance à la ressemblance plus forte au sein de chaque ferme et un effet des antibiotiques sur la diversité limité dans le temps. Chez ces veaux, la taille de la population d'*E. coli* était probablement impactée par la dose de lactose, et atteignait un maximum lors du deuxième mois de l'engraissement, avec une influence probable des antibiotiques. Dans une seconde étude, nous avons montré que la grande majorité des veaux était colonisée par divers clones d'*E. coli* producteurs de BLSE, dont la persistance du portage semblait liée à l'antibiothérapie au démarrage et à la capacité de diffusion au sein d'une ferme, et dont certains étaient des souches de STEC émergentes.

Ces deux modèles bovins sont en opposition dans le spectre des élevages, et nous permettent de caractériser la part d'effet due aux conditions d'élevage, à l'hôte, et au contenu génomique des souches d'*E. coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques sur leur dynamique fécale.

Le premier fait marquant qui ressort de ces trois études est la variabilité de la composition des communautés bactériennes fécales entre des bovins partageant le même environnement à un jour donné. Une variabilité importante s'observe au niveau du microbiote fécal du veau de boucherie au début de l'engraissement (Figure 24). Du fait que les veaux soient d'origines diverses et présents depuis seulement une semaine dans la même ferme, on peut supposer que ces communautés bactériennes sont encore majoritairement composées de taxa bactériens ayant colonisé les veaux avant leur arrivée en ferme d'engraissement. Ces veaux passent en général moins d'une journée entre le départ de l'élevage naisseur et l'arrivée dans la ferme d'engraissement, et ne sont ni nourris ni abreuvés lors de cette étape, ce qui suggère que les bactéries qui composent le microbiote fécal des veaux de boucherie une semaine après leur arrivée sont issues d'une colonisation ayant eu lieu dans l'élevage naisseur. Cela est cohérent avec la variabilité des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE en début d'engraissement chez les veaux de la ferme B (Figure 40). Chez ces veaux qui n'ont pas été soumis à un traitement antibiotique, la diversité des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE une

semaine après leur arrivée est probablement le résultat d'une exposition et d'une colonisation par des clones différents circulant dans les élevages naisseurs.

La flore dominante et sous-dominante d'*E. coli* se composent de clones différents entre des vaches adultes au même jour, malgré des conditions de vie identiques (figure S1 de l'article paru dans *Applied and Environmental Microbiology*). Des fluctuations d'échantillonnage pourraient être la cause d'une telle variabilité, dans la mesure où une seule colonie a été prélevée dans tous les échantillons. Cependant, les échantillonnages répétés d'un jour à l'autre montrent qu'on isole souvent le même clone sur plusieurs jours. De plus, la caractérisation de 20 colonies durant trois jours de prélèvements pour chacune des vaches a montré que, dans la plupart des cas, prélever une colonie permettait d'obtenir le clone dominant (figure S1 de l'article paru dans *Applied and Environmental Microbiology*). Cette coexistence de plusieurs clones peut s'expliquer par la théorie du restaurant, développée par Leatham et ses collègues (81). Cette théorie stipule que les bactéries anaérobies du tube digestif sont regroupées localement sous la forme de biofilms dont la combinaison d'espèces varie d'un endroit à un autre. Ces biofilms fournissent aux *E. coli* qui y adhèrent des monosaccharides et des disaccharides différents, plutôt qu'un mélange parfait de nutriments accessibles à tous, comme le veut la théorie de la niche écologique développée par Freter (77). Ainsi, la colonisation d'un hôte par plusieurs clones d'*E. coli* pourrait s'expliquer par une ségrégation spatiale sous la forme de biofilms des bactéries anaérobies capables de dégrader le mucus et les fibres alimentaires. La variété des gènes codant pour des adhésines retrouvées chez les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE pourrait être due à des sites de liaison aux cellules de l'intestin différents entre les biofilms (240).

La variabilité des communautés microbiennes entre des bovins partageant le même environnement au moment de l'échantillonnage peut donc résulter d'une exposition antérieure à des sources de contamination microbienne différentes, dans une échelle de temps relativement courte. Elle peut également s'expliquer par la coexistence au sein d'un même individu de combinaisons de taxa bactériens associés sous forme de biofilms et liés par un réseau métabolique.

Le deuxième fait marquant est la succession d'états des communautés bactériennes des bovins au cours du temps. Chez les veaux de boucherie, cette succession d'états se traduit par une augmentation biphasique de la diversité bactérienne (Figure 20B, Figure 22B), associée à

l'augmentation de l'abondance de certains genres dominants, notamment *Prevotella* et *Faecalibacterium* (Figure 24). Cette dynamique globale qui conduit à une homogénéisation rapide du microbiote des veaux dans toutes les fermes est « orientée » par des forces communes à tous les jeunes bovins de cette étude. Une des limites de ce travail est que c'est une étude observationnelle, pour laquelle nous n'avons pas fait de suivi de marqueurs biologiques chez les veaux qui soient susceptibles d'être associés à la diversité et la composition du microbiote d'un individu, et que nous aurions pu inclure comme covariables pour en tester les effets sur les paramètres de nos modèles (195, 241).

Il est intéressant de noter que le microbiote des veaux de boucherie semble présenter des similitudes avec celui des enfants en bas âge, dont l'alimentation est principalement constituée de lait. En effet, les mêmes genres dominants sont retrouvés chez l'enfant en bas âge et le veau de boucherie, comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, ou encore *Faecalibacterium* (Figure 24) (195, 242). Dans les deux cas, la présence de ces genres et la diversité du microbiote semblent liées à l'apport en fibres, protéines et lipides (242). Enfin, les transformations du microbiote fécal des veaux de boucherie passent au moins par une étape de convergence accélérée (Figure 20B, Figure 22B), comme chez l'enfant (196). Ainsi, un suivi du développement du microbiote des veaux de boucherie en lien avec les apports nutritionnels pourrait constituer un modèle intéressant pour comprendre l'impact de l'alimentation sur le développement du microbiote fécal de l'enfant en bas âge.

En parallèle, le nombre d'*E. coli*/g varie de manière non linéaire au cours du temps chez le veau de boucherie, et suit l'expansion de l'une des niches nutritionnelles de l'espèce (Figure 29). Nous n'avons pas mis en évidence d'association significative entre *E. coli* et des genres qui aurait pu évoquer l'influence négative ou positive d'une compétition ou d'une coopération sur l'évolution des quantités d'*E. coli* au cours du temps. La seule association forte retrouvée est celle avec *Enterococcus* (Figure 28), dont certaines des espèces présentes chez les bovins sont aussi capables de digérer le lactose (199). On peut donc supposer que les bactéries du genre *Enterococcus* et *E. coli* se partagent la niche, dans une relation neutre, comme cela est supposé être fréquent au sein des communautés microbiennes (42, 43). L'absence de lien autre qu'avec *Enterococcus* pourrait être due à plusieurs choses. D'une part, nous avons pu manquer de puissance si la taille d'effet de cette association présumée existante est faible. D'autre part, les *E. coli* pourraient être associés à un ou plusieurs réseaux métaboliques plutôt qu'à des taxa particuliers, comme stipulé dans la théorie du restaurant (81). Les *E. coli* et

genres bactériens excrétés dans les fèces peuvent résulter d'un mélange de souches provenant d'endroits différents du tube digestif, ce qui pourrait expliquer l'absence de lien à partir d'un échantillon de fèces. Enfin, l'alimentation des veaux semble être la force principale s'exerçant sur les quantités fécales d'*E. coli* chez les bovins, puisqu'elles suivent l'évolution de la dose de lactose chez les veaux de boucherie, et que leur nombre est stable chez les vaches adultes, en l'absence de modifications des habitudes alimentaires.

Le travail sur les vaches adultes suggère que la flore commensale d'*E. coli* des veaux de boucherie est multiclonale et se compose d'un clone dominant et plusieurs sous-dominants (figure S1 de l'article paru dans *Applied and Environmental Microbiology*). Ceci est cohérent avec une étude menée à l'abattoir sur des veaux de boucherie, où il a été montré que le clone d'*E. coli* dominant était quasiment toujours différent du clone d'*E. coli* producteur de BLSE détecté (150). Au sein des populations totales d'*E. coli* des veaux, une succession de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE s'observe au cours du temps. Ces clones ne persistent pas plus de deux mois chez un même individu (Figure 39, Figure 40, et Figure 41). Dans une échelle de temps beaucoup plus courte, on observe une succession de clones d'*E. coli* dominants chez les vaches adultes, qui persistent rarement plus de quelques jours (figure S1 de l'article paru dans *Applied and Environmental Microbiology*). Ceci est permis par un temps de génération très court d'*E. coli* chez son hôte (75, 100), et une capacité à s'adapter à son nouvel environnement en quelques jours (83). On peut donc supposer qu'il existe au cours de l'engraissement du veau de boucherie une succession de populations commensales d'*E. coli* productrices de BLSE en compétition pour les ressources avec le reste de la population, probablement le lactose, qui conduisent à leur expansion et leur effondrement successifs dans un contexte d'évolution des interactions avec le microbiote environnant.

Cette succession de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE, notamment dans la première moitié de l'engraissement, peut être due à des événements de colonisation incessants entre les veaux de boucherie. En effet, les veaux restent au même endroit, dans un lieu où la densité animale est élevée, au contact des excréments des autres veaux. Au contraire, les vaches adultes se déplacent toute la journée à la recherche de nourriture sur de grandes étendues (243). Le contact entre ces vaches est moins intense qu'entre les veaux de boucherie, et l'exposition aux excréments des autres animaux est moins fréquente. La proportion faible de clones d'*E. coli* partagés entre les vaches adultes, et la proportion élevée de clones producteurs de BLSE circulant entre les veaux de boucherie, indiquent qu'il faut des contacts

étroits et suffisamment prolongés pour une diffusion efficace des clones d'*E. coli* au sein d'un lot de bovins. La différence observée entre les deux études suggère donc que l'appartenance à un même troupeau n'est pas une condition suffisante pour qu'un clone d'*E. coli* colonise de manière successive et répétée différents animaux et persiste de manière prolongée dans le troupeau. Cette dernière affirmation doit cependant être nuancée du fait de la faible taille d'échantillon dans l'étude menée sur les vaches adultes. La mise en contact prolongée et répétée des veaux de boucherie avec les matières fécales de leurs congénères peut également expliquer la diversité β plus faible entre les veaux d'une même ferme (Figure 17), qui se traduit par un partage d'UTO plus grand. La transmission peut également se faire par l'intermédiaire d'un vecteur. Des arguments dans ce sens s'observent dans les deux modèles. Chez les veaux, la diffusion des clones producteurs de BLSE n'était pas plus intense au sein des parcs qu'entre les parcs d'une même ferme, et semble plutôt être médiée par un facteur environnemental commun à tous, comme par exemple l'éleveur, qui a déjà été identifié comme un facteur de risque de prévalence élevée d'*E. coli* résistants aux antibiotiques chez les veaux de boucherie (244). Chez les vaches adultes, une étude à laquelle j'ai participé lors de mon M2 a montré que le partage d'une même zone de pâture et d'un point d'eau avec des buffles sauvages induisait une transmission de souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques depuis les bovins domestiques vers les buffles sauvages (66). Un protocole de télémétrie avait montré que ces deux troupeaux s'évitaient, et occupaient l'espace à des heures différentes (243). Enfin, la diffusion des souches ne semble pas être seulement liée à des facteurs environnementaux et aux interactions au sein du troupeau. Les capacités de résistance aux stress environnementaux des souches peuvent également expliquer la différence que l'on observe dans la succession de clones d'*E. coli*. Une résistance accrue dans l'environnement conduit au maintien d'une taille de population suffisante pour coloniser un nouvel hôte. Cette résistance dans l'environnement extérieur diffère entre les souches commensales bovines (233), et pourrait expliquer le gradient de pouvoir colonisateur qui existe entre les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE, avec la colonisation massive par un STEC producteur de BLSE à la fin de l'engraissement chez les veaux de la ferme C (Figure 41).

Le troisième fait marquant est l'effet des traitements antibiotiques sur le développement du microbiote fécal des veaux, et sur la persistance des *E. coli* producteurs de BLSE au sein des fermes d'engraissement. Les seuls effets des traitements antibiotiques que nous avons pu

mettre en évidence concernent les veaux de boucherie, les vaches adultes n'ayant pas été exposées aux antibiotiques durant le suivi. Ces effets concernent les traitements antibiotiques au démarrage, qui ont eu lieu le même jour que les premiers prélèvements fécaux. Il n'y a pas eu d'effet détecté des traitements antibiotiques réalisés à distance des prélèvements. Cela peut être dû à un manque de puissance, et un schéma d'échantillonnage inadapté pour étudier les effets spécifiques de ces prises d'antibiotiques. On observe une diminution de la diversité microbienne chez les veaux au cours d'un traitement antibiotique, par rapport aux veaux non traités (Figure 20A et Figure 22A). Aucun effet n'a été détecté sur les quantités d'*E. coli* (Figure 27A). Cette absence d'effet s'explique facilement à la lumière de l'étude sur les clones producteurs de BLSE, qui a révélé que tous les clones étaient multi-résistants, et porteurs de gènes de résistance aux principales familles antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire (Figure 34). Tous les veaux sous traitements antibiotiques au démarrage étaient colonisés par des clones présentant des résistances aux molécules utilisées. Ces traitements ont permis de sélectionner les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE porteurs de multiples résistances qui persistent par la suite dans les fermes.

Aucune disparition de genre n'a été observée chez les veaux lors d'un traitement antibiotique par rapport aux veaux non traités. Aucune émergence d'un ou plusieurs genres atypiques par rapport aux veaux non traités n'a été observée chez les veaux sous traitement (Figure 24A). Au cours d'une exposition antibiotique, les communautés bactériennes du veau de boucherie ont donc une diversité diminuée du fait de la surabondance variable d'un ou de quelques genres constitutifs du microbiote fécal du veau de boucherie, et une sélection de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE et multi-résistants s'opère par le biais de la co-résistance.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet à long terme des traitements antibiotiques sur la dynamique du microbiote fécal des veaux de boucherie. Au contraire, on constate une résilience forte du microbiote fécal aux traitements antibiotiques polychimiques et prolongés. Cela peut-être dû à la forte empreinte développementale qui résulte de forces s'appliquant sur l'écosystème digestif des bovins en croissance. En revanche, on observe une persistance plus longue des *E. coli* producteurs de BLSE dans les fermes où des traitements antibiotiques ont été donnés en début d'engraissement. De plus, une modulation de l'évolution de la quantité d'*E. coli* s'observe dans les fermes où ces traitements antibiotiques ont été donnés (Figure 27B). On peut donc supposer que cette évolution reflète la dynamique des clones producteurs de BLSE, qui seraient dominants dans la flore d'*E. coli* chez les veaux sous

traitement antibiotique. Il a été montré que les *E. coli* producteurs de BLSE appartenait à la flore sous-dominante d'*E. coli* du veau de boucherie à la fin de l'engraissement (150). Chez l'homme, la durée de portage de souches d'*E. coli* multi-résistantes est proportionnelle à leur abondance relative au sein de la flore d'*E. coli* (245). On peut donc supposer que la décroissance de portage des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE au cours du temps chez les veaux de boucherie est liée à une décroissance de leur abondance relative. Une diminution de la fréquence de portage de clones producteurs de BLSE en parallèle de celle du nombre d'*E. coli* /g s'observe entre le 50^{ème} et le 100^{ème} jour (Figure 39 et Figure 41). La combinaison entre les traitements antibiotiques prolongés au démarrage et le schéma de dose de poudre de lait par kilo pourraient donc expliquer la sélection puis la persistance des clones producteurs de BLSE durant la première moitié de l'engraissement. On serait ici dans la situation de nettoyage de la niche nutritionnelle par les antibiotiques suivie d'une expansion de cette niche, augmentant ainsi la probabilité qu'une exposition conduise à une colonisation pérenne, c'est-à-dire à l'établissement d'une population stable. La combinaison de ces deux facteurs est fort probable pour expliquer cette persistance de portage.

Les clones d'*E. coli* résistants aux antibiotiques isolés chez les bovins adultes et les veaux de boucherie présentaient tous des caractéristiques génétiques de clones adaptés aux bovins. On peut donc supposer que ces clones ont un arsenal génétique leur permettant de persister au sein de la flore commensale d'*E. coli* et que les traitements antibiotiques ne sont pas une condition nécessaire pour qu'un bovin porte des clones d'*E. coli* résistants. Toutefois, les clones résistants aux antibiotiques persistent moins longtemps que d'autres clones sensibles chez la vache adulte. Chez les veaux de boucherie, les clones d'*E. coli* producteurs de BLSE ne persistent pas en l'absence de pression antibiotique au démarrage de l'engraissement (Figure 40). Les antibiotiques induisent des changements dans la population commensale d'*E. coli* et sélectionnent les clones porteurs de la résistance. Chez les veaux de boucherie, ces clones porteurs de résistance augmentent en taille de population grâce à un accès augmenté aux ressources et une diminution de la compétition avec les autres *E. coli*. Leur taux de croissance dépassant le taux d'élimination, ces souches seraient capables de persister plus longtemps après arrêt de l'exposition antibiotique.

Dans cette thèse, nous avons donc mis en évidence une dynamique du microbiote fécal du veau de boucherie au cours de l'engraissement qui se caractérise par une augmentation de la diversité et une homogénéisation de la composition bactérienne, sous l'influence :

- d'une forte empreinte développementale intrinsèque aux veaux,
- de l'exposition à des bactéries antérieure à l'engraissement, au sein des élevages naisseurs,
- d'une exposition prolongée aux antibiotiques dans les premières semaines de l'engraissement,
- des nutriments disponibles, avec le lactose qui gouverne la taille des populations commensales d'*E. coli* et la diversification du régime alimentaire qui conduit probablement à l'émergence de certains genres,
- de son environnement direct, probablement du fait des contacts étroits entre les veaux qui favorisent une contamination oro-fécale croisée et participent à des spécificités dans chaque élevage,
- d'une résilience élevée aux traitements antibiotiques longs et prolongés.

Nous avons également mis en évidence chez les veaux de boucherie une colonisation massive et persistante par des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE en début d'engraissement, du fait de fortes pressions antibiotiques entraînant une co-sélection par d'autres gènes de résistance, suivie de l'expansion d'une des niches nutritionnelles d'*E. coli*. Par ailleurs, les veaux excrètent une grande diversité de clones d'*E. coli* producteurs de BLSE, avec un phénotype de portage variable sur l'ensemble de la période. Des STEC sont retrouvés parmi les clones producteurs de BLSE des veaux de boucherie, ce qui est une preuve directe que des bactéries à la fois multi-résistantes et pathogènes pour l'homme peuvent émerger au sein du réservoir bovin.

La complexité de l'épidémiologie de ces clones d'*E. coli* multi-résistants et pathogènes peut résulter de trois facteurs :

- la fréquence à laquelle un bovin est exposé aux clones d'*E. coli* capables de coloniser son tractus digestif. Cette fréquence augmente avec la densité animale et l'exposition aux fèces des autres bovins,
- la probabilité qu'un événement d'exposition conduise à une colonisation pérenne, c'est-à-dire à l'établissement d'une population. Cette probabilité dépend de la capacité d'un clone

à résister dans l'extérieur, passer le tractus digestif, et s'établir en s'adaptant au nouvel écosystème digestif, en présence de compétiteurs.

- le temps moyen durant lequel une bactérie peut persister au sein d'un hôte ou, en d'autres termes, le taux avec lequel un hôte élimine ses populations bactériennes commensales, qui se caractérise dans l'espèce *E. coli* par un taux de rotation des clones élevés.

Perspectives

Les perspectives sont maintenant de confronter les données des deux études menées chez les veaux de boucherie, pour identifier des facteurs du microbiote associés au portage des *E. coli* producteurs de BLSE. Nous avons déjà recherché un lien entre l'évolution de la diversité et le phénotype de portage des veaux, afin d'évaluer l'existence d'un effet barrière du microbiote fécal contre le portage d'*E. coli* producteurs de BLSE. Nous avons comparé par ANOVA les paramètres estimés lors de la modélisation des indices de diversité α entre les veaux non colonisés, les veaux colonisés en début d'engraissement dont le portage ne persistait pas au-delà de la première moitié de l'engraissement, et les veaux colonisés en début d'engraissement dont le portage persistait. Aucune association significative n'a été trouvée. Nous envisageons maintenant de rechercher plus spécifiquement un lien entre le portage des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE et certains taxa du microbiote fécal des veaux de boucherie, ainsi que cela a déjà été fait dans des travaux chez l'homme (246). Dans une étude menée chez des personnes vivant dans une communauté isolée en Guyane française, le portage d'entérobactéries productrices de BLSE était associé à des modifications de l'abondance relative de certains genres, et ce malgré une alimentation et une exposition aux antibiotiques identique entre les porteurs d'entérobactéries productrices de BLSE et les non porteurs (246).

Dans un deuxième temps, nous avons prévu d'étudier chez les veaux la composition génomique d'un pool d'une centaine d'isolats d'*E. coli* par échantillon de fèces afin d'avoir une meilleure vision de la diversité des *E. coli* à un temps donné et de son évolution au cours du temps. Dans cette analyse, les isolats sont récupérés sur gélose Drigalski puis le pool est séquencé par la technologie Illumina. Cette approche de métagénomique est en cours de validation dans l'unité. Au cours de ma thèse, j'ai généré les données sur les 308 échantillons sur lesquels s'appuie ce travail. Cela permettra d'abord d'évaluer l'abondance relative des clones producteurs de BLSE dans la population totale d'*E. coli* et ainsi voir s'ils font partie de la flore dominante. Nous pourrons comparer ces abondances relatives aux quantités de gènes *bla*_{CTX-M} que j'ai estimées par une approche de PCR quantitative. Puis, nous chercherons à comparer l'évolution de ces populations dans le temps afin de rechercher une association avec la diffusion et la persistance des clones producteurs de BLSE. Enfin, nous pourrons rechercher des associations entre le résistome et le virulome de la flore d'*E. coli* dominante et le portage de clones producteurs de BLSE. Entre autres, l'analyse du résistome nous permettra de mieux

comprendre le lien observé entre les traitements antibiotiques et le portage des clones d'*E. coli* producteurs de BLSE.

Dans un troisième temps, nous envisageons de rechercher au sein des génomes d'*E. coli* producteurs de BLSE des gènes associés à la persistance et à la colonisation par des études d'association de type « Genome Wide Association Study ». En fonction des résultats, il pourra être envisagé de comparer les capacités métaboliques des clones producteurs de BLSE en étudiant leurs capacités de croissance en présence de sources de carbone différentes (247).

Bibliographie

1. Escherich T. 1988. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. *Rev Infect Dis* 10:1220–1225.
2. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH. 2007. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 45:1025–1029.
3. Hall IC, O’Toole E. 1934. Bacterial flora of first specimens of meconium passed by fifty new-born infants. *Am J Dis Child* 47:1279–1285.
4. Snyder ML. 1936. The bacterial flora of meconium specimens collected from sixty-four infants within four hours after delivery. *J Pediatr* 9:624–632.
5. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 6:23129.
6. Nagpal R, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, Nomoto K, Yamashiro Y. 2016. Sensitive quantitative analysis of the meconium bacterial microbiota in healthy term infants born vaginally or by cesarean section. *Front Microbiol* 7.
7. Karstrup CC, Klitgaard K, Jensen TK, Agerholm JS, Pedersen HG. 2017. Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology* 99:41–47.
8. Alipour MJ, Jalanka J, Pessa-Morikawa T, Kokkonen T, Satokari R, Hynönen U, Iivanainen A, Niku M. 2018. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Sci Rep* 8:10437.
9. Mayer M, Abenthum A, Matthes JM, Kleeberger D, Ege MJ, Hölzel C, Bauer J, Schwaiger K. 2012. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Vet Microbiol* 161:179–185.
10. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 159:187–193.
11. Guzman CE, Bereza-Malcolm LT, De Groef B, Franks AE. 2015. Presence of selected methanogens, fibrolytic bacteria, and Proteobacteria in the gastrointestinal tract of neonatal dairy calves from birth to 72 hours. *PLoS One* 10:e0133048.
12. Smith HW. 1961. The development of the bacterial flora of the faeces of animals and man: the changes that occur during ageing. *J Appl Bacteriol* 24:235–241.
13. Klein-Jöbstl D, Schornsteiner E, Mann E, Wagner M, Drillich M, Schmitz-Esser S. 2014. Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. *Front Microbiol* 5:622.
14. Edrington TS, Dowd SE, Farrow RF, Hagevoort GR, Callaway TR, Anderson RC, Nisbet DJ. 2012. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. *J Dairy Sci* 95:4519–4525.
15. Lukás F, Koppová I, Kudrna V, Kopecný J. 2007. Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol (Praha)* 52:99–104.
16. Smith HW. 1965. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J Pathol Bacteriol* 90:495–513.

17. Meale SJ, Li S, Azevedo P, Derakhshani H, Plaizier JC, Khafipour E, Steele MA. 2016. Development of Ruminant and Fecal Microbiomes Are Affected by Weaning But Not Weaning Strategy in Dairy Calves. *Front Microbiol* 7:582.
18. Oikonomou G, Teixeira AGV, Foditsch C, Bicalho ML, Machado VS, Bicalho RC. 2013. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium species* with health and growth. *PLoS One* 8:e63157.
19. Xie G, Duff GC, Hall LW, Allen JD, Burrows CD, Bernal-Rigoli JC, Dowd SE, Guerriero V, Yeoman CJ. 2013. Alteration of digestive tract microbiome in neonatal Holstein bull calves by bacitracin methylene disalicylate treatment and scours. *J Anim Sci* 91:4984–4990.
20. Gomez DE, Arroyo LG, Costa MC, Viel L, Weese JS. 2017. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves. *J Vet Intern Med*.
21. Oultram J, Phipps E, Teixeira AGV, Foditsch C, Bicalho ML, Machado VS, Bicalho RC, Oikonomou G. 2015. Effects of antibiotics (oxytetracycline, florfenicol or tulathromycin) on neonatal calves' faecal microbial diversity. *Vet Rec* 177:598.
22. Uyeno Y, Sekiguchi Y, Kamagata Y. 2010. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Lett Appl Microbiol* 51:570–577.
23. Dodd D, Mackie RI, Cann IKO. 2011. Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. *Mol Microbiol* 79:292–304.
24. Durso LM, Harhay GP, Smith TPL, Bono JL, Desantis TZ, Harhay DM, Andersen GL, Keen JE, Laegreid WW, Clawson ML. 2010. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Appl Environ Microbiol* 76:4858–4862.
25. Kim M, Wells JE. 2016. A meta-analysis of bacterial diversity in the feces of cattle. *Curr Microbiol* 72:145–151.
26. Shanks OC, Kelty CA, Archibeque S, Jenkins M, Newton RJ, McLellan SL, Huse SM, Sogin ML. 2011. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl Environ Microbiol* 77:2992–3001.
27. Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeenhan T, Hagevoort RG, Edrington TS. 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol* 8:125.
28. Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, Fourreau F, David A, Daubié A-S, Hignard C, Loison O, Picard B, Denamur E. 2015. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen* 4:604–615.
29. Malmuthuge N, Griebel PJ, Guan LL. 2014. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. *Appl Environ Microbiol* 80:2021–2028.
30. Dias J, Marcondes MI, Motta de Souza S, Cardoso da Mata B, Noronha MF, Resende RT, Machado FS, Mantovani HC, Dill-McFarland KA, Suen G. 2018. Assessing bacterial community dynamics across the gastrointestinal tract of dairy calves during pre-weaning development. *Appl Environ Microbiol*.
31. Malmuthuge N, Li M, Chen Y, Fries P, Griebel PJ, Baurhoo B, Zhao X, Guan LL. 2012. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiol Ecol* 79:337–347.

32. Smith HW. 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J Pathol Bacteriol* 89:95–122.
33. Mao S, Zhang M, Liu J, Zhu W. 2015. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Sci Rep* 5:16116.
34. Crespo-Piazuelo D, Estellé J, Revilla M, Criado-Mesas L, Ramayo-Caldas Y, Óvilo C, Fernández AI, Ballester M, Folch JM. 2018. Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions. *Sci Rep* 8:12727.
35. Sekelja M, Rud I, Knutsen SH, Denstadli V, Westereng B, Næs T, Rudi K. 2012. Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin. *Appl Environ Microbiol* 78:2941–2948.
36. Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. 2011. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev* 35:681–704.
37. Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L, Bouet S, Chevalier-Curt MJ, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M. 2013. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol* 11:61.
38. Schmidt B, Mulder IE, Musk CC, Aminov RI, Lewis M, Stokes CR, Bailey M, Prosser JI, Gill BP, Pluske JR, Kelly D. 2011. Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PloS One* 6:e28284.
39. Harada N, Hanaoka R, Horiuchi H, Kitakaze T, Mitani T, Inui H, Yamaji R. 2016. Castration influences intestinal microflora and induces abdominal obesity in high-fat diet-fed mice. *Sci Rep* 6:23001.
40. 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 Biol* 12:R50.
41. Stein RR, Bucci V, Toussaint NC, Buffie CG, Räscht G, Pamer EG, Sander C, Xavier JB. 2013. Ecological modeling from time-series inference: insight into dynamics and stability of intestinal microbiota. *PLoS Comput Biol* 9:e1003388.
42. Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. 2015. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* 350:663–666.
43. Marino S, Baxter NT, Huffnagle GB, Petrosino JF, Schloss PD. 2014. Mathematical modeling of primary succession of murine intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:439–444.
44. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8:207–217.
45. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. 1993. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci* 90:4384–4388.
46. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui ME, Frapy E, Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Le Bouguéneq C, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jéhanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon C, Rouy Z, Ruf CS, Schneider D, Tournet J, Vacherie B, Vallenet D, Médigue C, Rocha EPC, Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5:e1000344.
47. Bobay L-M, Rocha EPC, Touchon M. 2013. The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. *Mol Biol Evol* 30:737–751.

48. Kallonen T, Brodrick HJ, Harris SR, Corander J, Brown NM, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. 2017. Systematic longitudinal survey of invasive *Escherichia coli* in England demonstrates a stable population structure only transiently disturbed by the emergence of ST131. *Genome Res.*
49. Gordon DM, Geyik S, Clermont O, O'Brien CL, Huang S, Abayasekara C, Rajesh A, Kennedy K, Collignon P, Pavli P, Rodriguez C, Johnston BD, Johnson JR, Decousser J-W, Denamur E. 2017. Fine-scale structure analysis shows epidemic patterns of Clonal Complex 95, a cosmopolitan *Escherichia coli* lineage responsible for extraintestinal infection. *mSphere* 2.
50. Ochman H, Selander RK. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 157:690–693.
51. Selander RK, Levin BR. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 210:545–547.
52. Chaudhuri RR, Henderson IR. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 12:214–226.
53. Jauregui F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S. 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9:560.
54. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia coli* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ Microbiol* 13:2468–2477.
55. Lecointre G, Rachdi L, Darlu P, Denamur E. 1998. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol* 15:1685–1695.
56. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bouguéneq C, Denamur E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21:1085–1094.
57. Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol* 10:2484–2496.
58. Clermont O, Gordon D, Denamur E. 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiol Read Engl* 161:980–988.
59. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MCJ, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60:1136–1151.
60. Ochman H, Wilson AC. 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* 26:74–86.
61. Abraham S, Gordon DM, Chin J, Brouwers HJM, Njuguna P, Groves MD, Zhang R, Chapman TA. 2012. Molecular characterization of commensal *Escherichia coli* adapted to different compartments of the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 78:6799–6803.
62. Ahmed S, Olsen JE, Herrero-Fresno A. 2017. The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group. *PLOS ONE* 12:e0178623.
63. Hinton M, Rixson PD, Allen V, Linton AH. 1984. The persistence of drug resistant *Escherichia coli* strains in the majority faecal flora of calves. *J Hyg (Lond)* 93:547–557.
64. Sears HJ, Janes H, Saloum R, Brownlee I, Lamoreaux LF. 1956. Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in man and dog under varying conditions. *J Bacteriol* 71:370–372.

65. Schlager TA, Hendley JO, Bell AL, Whittam TS. 2002. Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect Immun* 70:1225–1229.
66. Mercat M, Clermont O, Massot M, Ruppe E, de Garine-Wichatitsky M, Miguel E, Valls Fox H, Cornelis D, Andremont A, Denamur E, Caron A. 2015. *Escherichia coli* population structure and antibiotic resistance at a buffalo/cattle interface in Southern Africa. *Appl Environ Microbiol* 82:1459–1467.
67. Coura FM, de Araújo Diniz S, Mussi JMS, Silva MX, Lage AP, Heinemann MB. 2016. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. *Folia Microbiol (Praha)*.
68. Gordon DM. 2001. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiol Read Engl* 147:1079–1085.
69. Escobar-Páramo P, Le Menac'h A, Le Gall T, Amarin C, Gouriou S, Picard B, Skurnik D, Denamur E. 2006. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environ Microbiol* 8:1975–1984.
70. Smati M, Clermont O, Le Gal F, Schichmanoff O, Jauréguy F, Eddi A, Denamur E, Picard B, Coliville Group. 2013. Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Appl Environ Microbiol* 79:5005–5012.
71. Skurnik D, Ruimy R, Andremont A, Amarin C, Rouquet P, Picard B, Denamur E. 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 57:1215–1219.
72. Marshall B, Petrowski D, Levy SB. 1990. Inter- and intraspecies spread of *Escherichia coli* in a farm environment in the absence of antibiotic usage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6609–6613.
73. Chang D-E, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS, Conway T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7427–7432.
74. Tramontano M, Andrejev S, Pruteanu M, Klünemann M, Kuhn M, Galardini M, Jouhten P, Zelezniak A, Zeller G, Bork P, Typas A, Patil KR. 2018. Nutritional preferences of human gut bacteria reveal their metabolic idiosyncrasies. *Nat Microbiol* 3:514–522.
75. Ghalayini M, Launay A, Bridier-Nahmias A, Clermont O, Denamur E, Lescat M, Tenailon O. 2018. Evolution of a dominant natural isolate of *Escherichia coli* in the human gut over the course of a year suggests a neutral evolution with reduced effective population size. *Appl Env Microbiol* 84:e02377–17.
76. Rang CU, Licht TR, Midtvedt T, Conway PL, Chao L, Krogfelt KA, Cohen PS, Molin S. 1999. Estimation of Growth Rates of *Escherichia coli* BJ4 in Streptomycin-Treated and Previously Germfree Mice by In Situ rRNA Hybridization. *Clin Diagn Lab Immunol* 6:434–436.
77. Freter R, Brickner H, Botney M, Cleven D, Aranki A. 1983. Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun* 39:676–685.
78. Leatham MP, Stevenson SJ, Gauger EJ, Krogfelt KA, Lins JJ, Haddock TL, Autieri SM, Conway T, Cohen PS. 2005. Mouse intestine selects nonmotile flhDC mutants of *Escherichia coli* MG1655 with increased colonizing ability and better utilization of carbon sources. *Infect Immun* 73:8039–8049.
79. Fabich AJ, Leatham MP, Grissom JE, Wiley G, Lai H, Najar F, Roe BA, Cohen PS, Conway T. 2011. Genotype and phenotypes of an intestine-adapted *Escherichia coli* K-12 mutant selected by animal passage for superior colonization. *Infect Immun* 79:2430–2439.

80. Sousa A, Ramiro RS, Barroso-Batista J, Güleresi D, Lourenço M, Gordo I. 2017. Recurrent reverse evolution maintains polymorphism after strong bottlenecks in commensal gut bacteria. *Mol Biol Evol* 34:2879–2892.
81. Leatham-Jensen MP, Fridodt-Møller J, Adediran J, Mokszycki ME, Banner ME, Caughron JE, Krogfelt KA, Conway T, Cohen PS. 2012. The streptomycin-treated mouse intestine selects *Escherichia coli* envZ missense mutants that interact with dense and diverse intestinal microbiota. *Infect Immun* 80:1716–1727.
82. Lescat M, Launay A, Ghalayini M, Magnan M, Glodt J, Pintard C, Dion S, Denamur E, Tenaillon O. 2016. Using long-term experimental evolution to uncover the patterns and determinants of molecular evolution of an *Escherichia coli* natural isolate in the streptomycin-treated mouse gut. *Mol Ecol*.
83. Barroso-Batista J, Sousa A, Lourenço M, Bergman M-L, Sobral D, Demengeot J, Xavier KB, Gordo I. 2014. The first steps of adaptation of *Escherichia coli* to the gut are dominated by soft sweeps. *PLoS Genet* 10:e1004182.
84. Riley MA, Gordon DM. 1996. The ecology and evolution of bacteriocins. *J Ind Microbiol* 17:151–158.
85. Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58:611–647.
86. Adiba S, Nizak C, van Baalen M, Denamur E, Depaulis F. 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* 5:e11882.
87. Steinberg KM, Levin BR. 2007. Grazing protozoa and the evolution of the *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding prophage. *Proc Biol Sci* 274:1921–1929.
88. 2013. Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA J* 11:3138.
89. Smith D, Blackford M, Younts S, Moxley R, Gray J, Hungerford L, Milton T, Klopfenstein T. 2001. Ecological relationships between the prevalence of cattle shedding *Escherichia coli* O157:H7 and characteristics of the cattle or conditions of the feedlot pen. *J Food Prot* 64:1899–1903.
90. Lammers G a. C, McConnel CS, Jordan D, Ayton MS, Morris S, Patterson EI, Ward MP, Heller J. 2015. Synchronization of *E. coli* O157 shedding in a grass-fed beef herd: a longitudinal study. *Epidemiol Infect* 143:3244–3255.
91. Smith RP, Paiba GA, Ellis-Iversen J. 2010. Longitudinal study to investigate VTEC O157 shedding patterns in young cattle. *Res Vet Sci* 88:411–414.
92. Williams KJ, Ward MP, Dhungyel OP. 2015. Daily variations in *Escherichia coli* O157 shedding patterns in a cohort of dairy heifers at pasture. *Epidemiol Infect* 143:1388–1397.
93. Lammers G a. C, Jordan D, McConnel CS, Heller J. 2016. Daily shedding dynamics of *E. coli* O157 in an Australian grass-fed beef herd. *Epidemiol Infect* 144:2948–2955.
94. Jones M, Octavia S, Lammers G, Heller J, Lan R. 2017. Population and evolutionary dynamics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in a beef herd: A longitudinal study. *Environ Microbiol*.
95. Schamberger GP, Phillips RL, Jacobs JL, Diez-Gonzalez F. 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *Appl Environ Microbiol* 70:6053–6060.

96. Naylor SW, Low JC, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, Pearce MC, McKendrick IJ, Smith DGE, Gally DL. 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun* 71:1505–1512.
97. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC, Moon HW. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* 65:1842–1848.
98. Zhao T, Tkalcic S, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Zhao P. 2003. Pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves and evaluation of fecal shedding by treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 66:924–930.
99. Nart P, Naylor SW, Huntley JF, McKendrick IJ, Gally DL, Low JC. 2008. Responses of cattle to gastrointestinal colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 76:5366–5372.
100. Miranda RL, Conway T, Leatham MP, Chang DE, Norris WE, Allen JH, Stevenson SJ, Laux DC, Cohen PS. 2004. Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect Immun* 72:1666–1676.
101. Fabich AJ, Jones SA, Chowdhury FZ, Cernosek A, Anderson A, Smalley D, McHargue JW, Hightower GA, Smith JT, Autieri SM, Leatham MP, Lins JJ, Allen RL, Laux DC, Cohen PS, Conway T. 2008. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect Immun* 76:1143–1152.
102. Tkalcic S, Zhao T, Harmon BG, Doyle MP, Brown CA, Zhao P. 2003. Fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in weaned calves following treatment with probiotic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 66:1184–1189.
103. Méheust D, Chevance A, Moulin G. 2017. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016. Anses – Agence nationale du médicament vétérinaire.
104. World Health Organization. WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO.
105. Briand P, Dupuy C, Parle L. 2016. Rapport sur l'évaluation du plan écoantibio 2012-2016. 16041. Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux.
106. Pardon B, Catry B, Dewulf J, Persoons D, Hostens M, De Bleecker K, Deprez P. 2012. Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. *J Antimicrob Chemother* 67:1027–1038.
107. Sans P, de Fontguyon, G. 2009. Veal calf industry economics. *Rev Médecine Vét* 160:420–424.
108. Jarrige N, Cazeau G, Morignat E, Chanteperdrix M, Gay E. 2017. Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage in white veal calves in France. *Prev Vet Med* 144:158–166.
109. Bosman AB, Wagenaar JA, Stegeman JA, Vernooij JCM, Mevius DJ. 2014. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* in veal calves is associated with antimicrobial drug use. *Epidemiol Infect* 142:1893–1904.
110. 1948. Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. *Br Med J* 2:769–782.
111. Livermore DM. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 16 Suppl 1:S3–10.
112. Cattoir V, Lesprit P, Lascols C, Denamur E, Legrand P, Soussy C-J, Cambau E. 2006. In vivo selection during ofloxacin therapy of *Escherichia coli* with combined topoisomerase mutations that confer high resistance to ofloxacin but susceptibility to nalidixic acid. *J Antimicrob Chemother* 58:1054–1057.

113. Duval-Iflah Y, Raibaud P, Tancrede C, Rousseau M. 1980. R-plasmic transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infect Immun* 28:981–990.
114. Doucet-Populaire F, Trieu-Cuot P, Andremont A, Courvalin P. 1992. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36:502–504.
115. Akiba T, Koyama K, Ishiki Y, Kimura S, Fukushima T. 1960. On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Jpn J Microbiol* 4:219–227.
116. de Lastours V, Cambau E, Guillard T, Marcade G, Chau F, Fantin B. 2012. Diversity of individual dynamic patterns of emergence of resistance to quinolones in *Escherichia coli* from the fecal flora of healthy volunteers exposed to ciprofloxacin. *J Infect Dis* 206:1399–1406.
117. Martin JN, Rose DA, Hadley WK, Perdreau-Remington F, Lam PK, Gerberding JL. 1999. Emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in the AIDS era. *J Infect Dis* 180:1809–1818.
118. Madec J-Y, Lazizzera C, Châtre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, Ménard M-F, Lebreton P, Rambaud T. 2008. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. *J Clin Microbiol* 46:1566–1567.
119. 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* 108:4554–4561.
120. 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 Biol* 6.
121. Burdet C, Nguyen TT, Saint-Lu N, Sayah-Jeanne S, Hugon P, Sablier-Gallis F, Ferreira S, Andremont A, Mentré F, Gunzburg JD. 2018. Change in bacterial diversity of fecal microbiota drives mortality in a hamster model of antibiotic-induced *Clostridium difficile* colitis. *Antimicrob Agents Chemother* 4:S382–S382.
122. Pereira RV, Siler JD, Ng JC, Davis MA, Warnick LD. 2014. Effect of preweaned dairy calf housing system on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli*. *J Dairy Sci* 97:7633–7643.
123. Faber F, Tran L, Byndloss MX, Lopez CA, Velazquez EM, Kerrinnes T, Nuccio S-P, Wangdi T, Fiehn O, Tsolis RM, Bäumlér AJ. 2016. Host-mediated sugar oxidation promotes post-antibiotic pathogen expansion. *Nature* 534:697–699.
124. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, No D, Liu H, Kinnebrew M, Viale A, Littmann E, van den Brink MRM, Jenq RR, Taur Y, Sander C, Cross JR, Toussaint NC, Xavier JB, Pamer EG. 2015. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* 517:205–208.
125. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499:219–222.
126. Allen HK, Looft T, Bayles DO, Humphrey S, Levine UY, Alt D, Stanton TB. 2011. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *mBio* 2.
127. Nguyen TT, Guedj J, Chachaty E, de Gunzburg J, Andremont A, Mentré 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 Comput Biol* 10:e1003840.
128. Berge ACB, Epperson WB, Pritchard RH. 2005. Assessing the effect of a single dose florfenicol treatment in feedlot cattle on the antimicrobial resistance patterns in faecal *Escherichia coli*. *Vet Res* 36:723–734.

129. Corpet DE. 1987. Antibiotic residues and drug resistance in human intestinal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 31:587–593.
130. Fleury MA, Jouy E, Eono F, Cariolet R, Couet W, Gobin P, Le Goff O, Blanquet-Diot S, Alric M, Kempf I. 2016. Impact of two different colistin dosing strategies on healthy piglet fecal microbiota. *Res Vet Sci* 107:152–160.
131. Andersson DJ, Hughes D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8:260–271.
132. de Lastours V, Bleibtreu A, Chau F, Burdet C, Duval X, Denamur E, Fantin B. 2014. Quinolone-resistant *Escherichia coli* from the faecal microbiota of healthy volunteers after ciprofloxacin exposure are highly adapted to a commensal lifestyle. *J Antimicrob Chemother* 69:761–768.
133. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, an der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Müller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365:1771–1780.
134. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny P-H, El Mniai A, Boussadia Y, Goujon C, Ralaimazava P, Campa P, Girard P-M, Wyplosz B, Vittecoq D, Bouchaud O, Le Loup G, Pialoux G, Perrier M, Wieder I, Moussa N, Esposito-Farèse M, Hoffmann I, Coignard B, Lucet J-C, Andremont A, Matheron S. 2015. High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 61:593–600.
135. Kaspar CW, Burgess JL, Knight IT, Colwell RR. 1990. Antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify sources of fecal contamination in water. *Can J Microbiol* 36:891–894.
136. Aubry-Damon H, Grenet K, Sall-Ndiaye P, Che D, Cordeiro E, Bougnoux M-E, Rigaud E, Le Strat Y, Lemanissier V, Armand-Lefèvre L, Delzescaux D, Desenclos J-C, Liénard M, Andremont A. 2004. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerg Infect Dis* 10:873–879.
137. Ho P-L, Lo W-U, Lai EL, Law PY, Leung SM, Wang Y, Chow K-H. 2015. Clonal diversity of CTX-M-producing, multidrug-resistant *Escherichia coli* from rodents. *J Med Microbiol* 64:185–190.
138. Williams SH, Che X, Paulick A, Guo C, Lee B, Muller D, Uhlemann A-C, Lowy FD, Corrigan RM, Lipkin WI. 2018. New York City house mice (*Mus musculus*) as potential reservoirs for pathogenic bacteria and antimicrobial resistance determinants. *mBio* 9.
139. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 72:2145–2155.
140. Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. 2013. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin Microbiol Rev* 26:744–758.
141. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Kobisch M, Madec J-Y. 2006. CTX-M-1- and CTX-M-15-type β -lactamases in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from food-producing animals in France. *Int J Antimicrob Agents* 28:402–407.
142. Geser N, Stephan R, Hächler H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* 8:21.
143. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon J-M, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. 2012. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One* 7:e46547.

144. Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park Y-J, Lavigne J-P, Pitout J, Johnson JR. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61:273–281.
145. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* 66:1–14.
146. Skurnik D, Clermont O, Guillard T, Launay A, Danilchanka O, Pons S, Diancourt L, Lebreton F, Kadlec K, Roux D, Jiang D, Dion S, Aschard H, Denamur M, Cywes-Bentley C, Schwarz S, Tenaillon O, Andremont A, Picard B, Mekalanos J, Brisse S, Denamur E. 2016. Emergence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin spreading in humans. *Mol Biol Evol* 33:898–914.
147. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* 71:1394–1404.
148. Lim S-K, Lee H-S, Nam H-M, Cho Y-S, Kim J-M, Song S-W, Park Y-H, Jung S-C. 2007. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. *Int J Food Microbiol* 116:283–286.
149. Gay E, Haenni M, Jarrige N, Jouy E, Lupo A, Madec J-Y. 2017. Résapath - Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2016. scientifique, Anses, Lyon et Ploufragan - Plouzané, France.
150. Haenni M, Châtre P, Métayer V, Bour M, Signol E, Madec J-Y, Gay E. 2014. Comparative prevalence and characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in dominant versus subdominant enteric flora in veal calves at slaughterhouse, France. *Vet Microbiol* 171:321–327.
151. Di Labio E, Regula G, Steiner A, Miserez R, Thomann A, Ledergerber U. 2007. Antimicrobial resistance in bacteria from Swiss veal calves at slaughter. *Zoonoses Public Health* 54:344–352.
152. Snow LC, Warner RG, Cheney T, Wearing H, Stokes M, Harris K, Teale CJ, Coldham NG. 2012. Risk factors associated with extended spectrum β -lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales. *Prev Vet Med* 106:225–234.
153. Awosile B, McClure J, Sanchez J, Rodriguez-Lecompte JC, Keefe G, Heider LC. 2018. *Salmonella enterica* and extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* recovered from Holstein dairy calves from 8 farms in New Brunswick, Canada. *J Dairy Sci* 0.
154. Duse A. 2015. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in faeces from preweaned dairy calves. Doctoral thesis.
155. Watson E, Jeckel S, Snow L, Stubbs R, Teale C, Wearing H, Horton R, Toszeghy M, Tearne O, Ellis-Iversen J, Coldham N. 2012. Epidemiology of extended spectrum β -lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm. *Vet Microbiol* 154:339–346.
156. Donaldson SC, Straley BA, Hegde NV, Sawant AA, DebRoy C, Jayarao BM. 2006. Molecular epidemiology of ceftiofur-resistant *Escherichia coli* isolates from dairy calves. *Appl Environ Microbiol* 72:3940–3948.
157. Horton RA, Duncan D, Randall LP, Chappell S, Brunton LA, Warner R, Coldham NG, Teale CJ. 2016. Longitudinal study of CTX-M ESBL-producing *E. coli* strains on a UK dairy farm. *Res Vet Sci* 109:107–113.
158. Brunton LA, Reeves HE, Snow LC, Jones JR. 2014. A longitudinal field trial assessing the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. *Prev Vet Med* 117:403–412.

159. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernández Escámez PS, Girones R, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Kuile BT, Threlfall J, Wahlström H, Bengtsson B, Bouchard D, Randall L, Tenhagen B-A, Verdon E, Wallace J, Brozzi R, Guerra B, Liebana E, Stella P, Herman L. 2017. Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. *EFSA J* 15:n/a–n/a.
160. Duse A, Waller KP, Emanuelson U, Unnerstad HE, Persson Y, Bengtsson B. 2013. Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Vet Scand* 55:49.
161. Liebana E, Batchelor M, Hopkins KL, Clifton-Hadley FA, Teale CJ, Foster A, Barker L, Threlfall EJ, Davies RH. 2006. Longitudinal farm study of extended-spectrum β -lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* 44:1630–1634.
162. Hordijk J, Wagenaar JA, van de Giessen A, Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Kant A, Mevius D. 2013. Increasing prevalence and diversity of ESBL/AmpC-type β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from veal calves from 1997 to 2010. *J Antimicrob Chemother* 68:1970–1973.
163. Hordijk J, Mevius DJ, Kant A, Bos MEH, Graveland H, Bosman AB, Hartskeerl CM, Heederik DJJ, Wagenaar JA. 2013. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother* 68:2468–2476.
164. Eisenhart C. 1947. The assumptions underlying the analysis of variance. *Biometrics* 3:1–21.
165. Verbeke G, Molenberghs G. 2000. *Linear Mixed Models for Longitudinal Data*. Springer-Verlag, New York.
166. Pinheiro J, Bates D. 2000. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag, New York.
167. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team. 2018. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-137.
168. R Development Core Team. 2005. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
169. O'Neill J. 2014. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
170. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5:58–65.
171. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326:1694–1697.
172. Thomas V, Clark J, Doré J. 2015. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol* 10:1485–1504.
173. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6:1621–1624.
174. Andrews. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
175. 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. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541.
176. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35:7188–7196.
 177. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584.
 178. Stackebrandt E, Goebel BM. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846–849.
 179. Richter M, Rosselló-Móra R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19126–19131.
 180. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Peer YV de, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* 3:733–739.
 181. Hughes JB, Bohannan BJM. 2004. Application of ecological diversity statistics in microbial ecology, 2nd ed. G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. L Akkermans & J. D. van Elsas.
 182. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, Knight R, Ley RE. 2014. Conducting a microbiome study. *Cell* 158:250–262.
 183. Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 43:1–11.
 184. Lozupone C, Knight R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71:8228–8235.
 185. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. 2007. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 73:1576–1585.
 186. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267.
 187. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511–521.
 188. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300.
 189. Heinrichs AJ, Hargrove GL. 1987. Standards of weight and height for Holstein heifers. *J Dairy Sci* 70:653–660.
 190. Van Vleck Pereira R, Lima S, Siler JD, Foditsch C, Warnick LD, Bicalho RC. 2016. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. *PloS One* 11:e0147525.
 191. Pereira RVV, Carroll LM, Lima S, Foditsch C, Siler JD, Bicalho RC, Warnick LD. 2018. Impacts of feeding preweaned calves milk containing drug residues on the functional profile of the fecal microbiota. *Sci Rep* 8:554.
 192. Jarrige N, Chantepedrix M, Gay E. 2018. Exposition des veaux de boucherie aux antibiotiques. *Bull Épidémiologique Santé Anim Aliment*.

193. Dill-McFarland KA, Breaker JD, Suen G. 2017. Microbial succession in the gastrointestinal tract of dairy cows from 2 weeks to first lactation. *Sci Rep* 7:40864.
194. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, Blugeon S, Bridonneau C, Furet J-P, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré 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. *Proc Natl Acad Sci* 105:16731–16736.
195. Balamurugan R, George G, Kabeerdoss J, Hepsiba J, Chandragunasekaran AMS, Ramakrishna BS. 2010. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. *Br J Nutr* 103:335–338.
196. de Muinck EJ, Trosvik P. 2018. Individuality and convergence of the infant gut microbiota during the first year of life. *Nat Commun* 9.
197. Beukers AG, Zaheer R, Cook SR, Stanford K, Chaves AV, Ward MP, McAllister TA. 2015. Effect of in-feed administration and withdrawal of tylosin phosphate on antibiotic resistance in enterococci isolated from feedlot steers. *Front Microbiol* 6.
198. Beukers AG, Zaheer R, Goji N, Amoako KK, Chaves AV, Ward MP, McAllister TA. 2017. Comparative genomics of *Enterococcus spp.* isolated from bovine feces. *BMC Microbiol* 17:52.
199. Vermette CJ, Russell AH, Desai AR, Hill JE. 2010. Resolution of phenotypically distinct strains of *Enterococcus spp.* in a complex microbial community using cpn60 universal target sequencing. *Microb Ecol* 59:14–24.
200. Ju T, Shoblak Y, Gao Y, Yang K, Fouhse J, Finlay BB, So YW, Stothard P, Willing BP. 2017. Initial gut microbial composition as a key factor driving host response to antibiotic treatment, as exemplified by the presence or absence of commensal *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*.
201. Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM, Stanton TB. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1691–1696.
202. Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, Haesebrouck F, Butaye P, Catry B, Dewulf J. 2012. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Prev Vet Med* 106:53–62.
203. Vaishnav S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. 2011. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334:255–258.
204. Thymann T, Sørensen KU, Hedemann MS, Elnif J, Jensen BB, Banga-Mboko H, Leser TD, Sangild PT. 2007. Antimicrobial treatment reduces intestinal microflora and improves protein digestive capacity without changes in villous structure in weanling pigs. *Br J Nutr* 97:1128–1137.
205. Khachatryan AR, Hancock DD, Besser TE, Call DR. 2004. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* 70:752–757.
206. Colonna B, Ranucci L, Fradiani PA, Casalino M, Calconi A, Nicoletti M. 1992. Organization of aerobactin, hemolysin, and antibacterial resistance genes in lactose-negative *Escherichia coli* strains of serotype O4 isolated from children with diarrhea. *Infect Immun* 60:5224–5231.
207. Der Vartanian M. 1988. Differences in excretion and efficiency of the aerobactin and enterochelin siderophores in a bovine pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 56:413–418.

208. Harel J, Fairbrother J, Forget C, Desautels C, Moore J. 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet Microbiol* 38:139–155.
209. Le Bouguéne C, Bertin Y. 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. *Vet Res* 30:317–342.
210. Diard M, Garry L, Selva M, Mosser T, Denamur E, Matic I. 2010. Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. *J Bacteriol* 192:4885–4893.
211. Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y. 2006. PCR classification of CTX-M-Type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 50:791–795.
212. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelski AD, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, Clingenpeel SR, Woyke T, McLean JS, Lasken R, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2013. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol* 20:714–737.
213. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. 2018. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microb Genomics* 4.
214. Weissman SJ, Chattopadhyay S, Aprikian P, Obata-Yasuoka M, Yarova-Yarovaya Y, Stapleton A, Ba-Thein W, Dykhuizen D, Johnson JR, Sokurenko EV. 2006. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59:975–988.
215. Inouye M, Dashnow H, Raven L-A, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, Zobel J, Holt KE. 2014. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med* 6.
216. Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. 2016. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res* 26:1721–1729.
217. Seeman T. ABRicate.
218. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67:2640–2644.
219. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, Jin Q. 2005. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* 33:D325–328.
220. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM. 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 52:1501–1510.
221. Ondov BD, Treangen TJ, Melsted P, Mallonee AB, Bergman NH, Koren S, Phillippy AM. 2016. Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol* 17:132.
222. Evans J, Sheneman L, Foster J. 2006. Relaxed neighbor joining: a fast distance-based phylogenetic tree construction method. *J Mol Evol* 62:785–792.
223. Letunic I, Bork P. 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 44:W242–245.
224. Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenailon O, Denamur E. 2008. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol* 10:1000–1006.

225. Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V, Dumoulin R, Nordmann P, Madec J-Y. 2016. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *Lancet Infect Dis* 16:281–282.
226. Valat C, Auvray F, Forest K, Métayer V, Gay E, Peytavin de Garam C, Madec J-Y, Haenni M. 2012. Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Appl Environ Microbiol* 78:4677–4682.
227. Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E, Tenaillon O. 2007. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol* 24:2373–2384.
228. Braun V. 2003. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci J Virtual Libr* 8:s1409–1421.
229. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745.
230. Ingle DJ, Clermont O, Skurnik D, Denamur E, Walk ST, Gordon DM. 2011. Biofilm formation by and thermal niche and virulence characteristics of *Escherichia* spp. *Appl Env Microbiol* 77:2695–2700.
231. Murphy HM, Payne SJ, Gagnon GA. 2008. Sequential UV- and chlorine-based disinfection to mitigate *Escherichia coli* in drinking water biofilms. *Water Res* 42:2083–2092.
232. Bleibtreu A, Gros P-A, Laouénan C, Clermont O, Le Nagard H, Picard B, Tenaillon O, Denamur E. 2013. Fitness, stress resistance, and extraintestinal virulence in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81:2733–2742.
233. Segura A, Auffret P, Bibbal D, Bertoni M, Durand A, Jubelin G, Kérourédan M, Brugère H, Bertin Y, Forano E. 2018. Factors involved in the persistence of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strain in bovine feces and gastro-intestinal content. *Front Microbiol* 9:375.
234. Soysal N, Mariani-Kurkdjian P, Smail Y, Liguori S, Gouali M, Loukiadis E, Fach P, Bruyand M, Blanco J, Bidet P, Bonacorsi S. 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hybrid pathotype O80:H2 as a new therapeutic challenge. *Emerg Infect Dis* 22:1604–1612.
235. Peigne C, Bidet P, Mahjoub-Messai F, Plainvert C, Barbe V, Médigue C, Frapy E, Nassif X, Denamur E, Bingen E, Bonacorsi S. 2009. The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infect Immun* 77:2272–2284.
236. Thiry D, Saulmont M, Takaki S, De Rauw K, Duprez J-N, Iguchi A, Piérard D, Mainil JG. 2017. Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. *Emerg Infect Dis* 23:2093–2095.
237. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *J Clin Microbiol* 42:645–651.
238. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis* 11:603–609.
239. Valls-Fox H, Chamaillé-Jammes S, Garine-Wichatitsky M de, Perrotton A, Courbin N, Miguel E, Guerbois C, Caron A, Loveridge A, Stapelkamp B, Muzamba M, Fritz H. 2018. Water and cattle shape habitat selection by wild herbivores at the edge of a protected area. *Anim Conserv* 21:365–375.
240. McWilliams BD, Torres AG. 2014. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* adhesins. *Microbiol Spectr* 2.

241. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto J-M, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker J-D, Raes J, Hansen T, MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500:541–546.
242. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14691–14696.
243. Miguel E, Grosbois V, Caron A, Boulinier T, Fritz H, Cornélis D, Foggin C, Makaya PV, Tshabalala PT, de Garine-Wichatitsky M. 2013. Contacts and foot and mouth disease transmission from wild to domestic bovines in Africa. *Ecosphere* 4:1–32.
244. Bosman AB, Wagenaar JA, Wagenaar J, Stegeman A, Vernooij H, Mevius D. 2012. Quantifying antimicrobial resistance at veal calf farms. *PLoS One* 7:e44831.
245. Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, Consigny P-H, El Mniai A, Boussadia Y, Goujon C, Ralaimazava P, Campa P, Girard P-M, Wyplosz B, Vittecoq D, Bouchaud O, Le Loup G, Pialoux G, Perrier M, Wieder I, Moussa N, Esposito-Farèse M, Hoffmann I, Coignard B, Lucet J-C, Andremont A, Matheron S. 2015. High rate of acquisition but short duration of carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after travel to the tropics. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 61:593–600.
246. Gosalbes MJ, Vázquez-Castellanos JF, Angebault C, Woerther P-L, Ruppé E, Ferrús ML, Latorre A, Andremont A, Moya A. 2015. Carriage of Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and composition of the gut microbiota in an amerindian community. *Antimicrob Agents Chemother* 60:507–514.
247. Sabarly V, Bouvet O, Glodt J, Clermont O, Skurnik D, Diancourt L, de Vienne D, Denamur E, Dillmann C. 2011. The decoupling between genetic structure and metabolic phenotypes in *Escherichia coli* leads to continuous phenotypic diversity. *J Evol Biol* 24:1559–1571.
248. Rajilić-Stojanović M, Jonkers DM, Salonen A, Hanevik K, Raes J, Jalanka J, de Vos WM, Manichanh C, Golic N, Enck P, Philippou E, Iraqi FA, Clarke G, Spiller RC, Penders J. 2015. Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences, or epiphenomena? *Am J Gastroenterol* 110:278–287.
249. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. 2015. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol* 12:81–90.

Annexe 1 : L'analyse du microbiote fécal par séquençage du gène de l'ARNr 16S

Figure 43. (A) Les différents niveaux taxonomiques dans la classification du vivant. Les niveaux souvent utilisés pour étudier le microbiote fécal sont le phylum et le genre (encadrés). (B) Exemple de taxonomie avec l'espèce *E. coli*. (C) arbre phylogénétique représentant les phyla bactériens et quelques genres fréquemment retrouvés dans le microbiote fécal, adapté de (248). Les couleurs correspondent aux niveaux taxonomiques de (A).

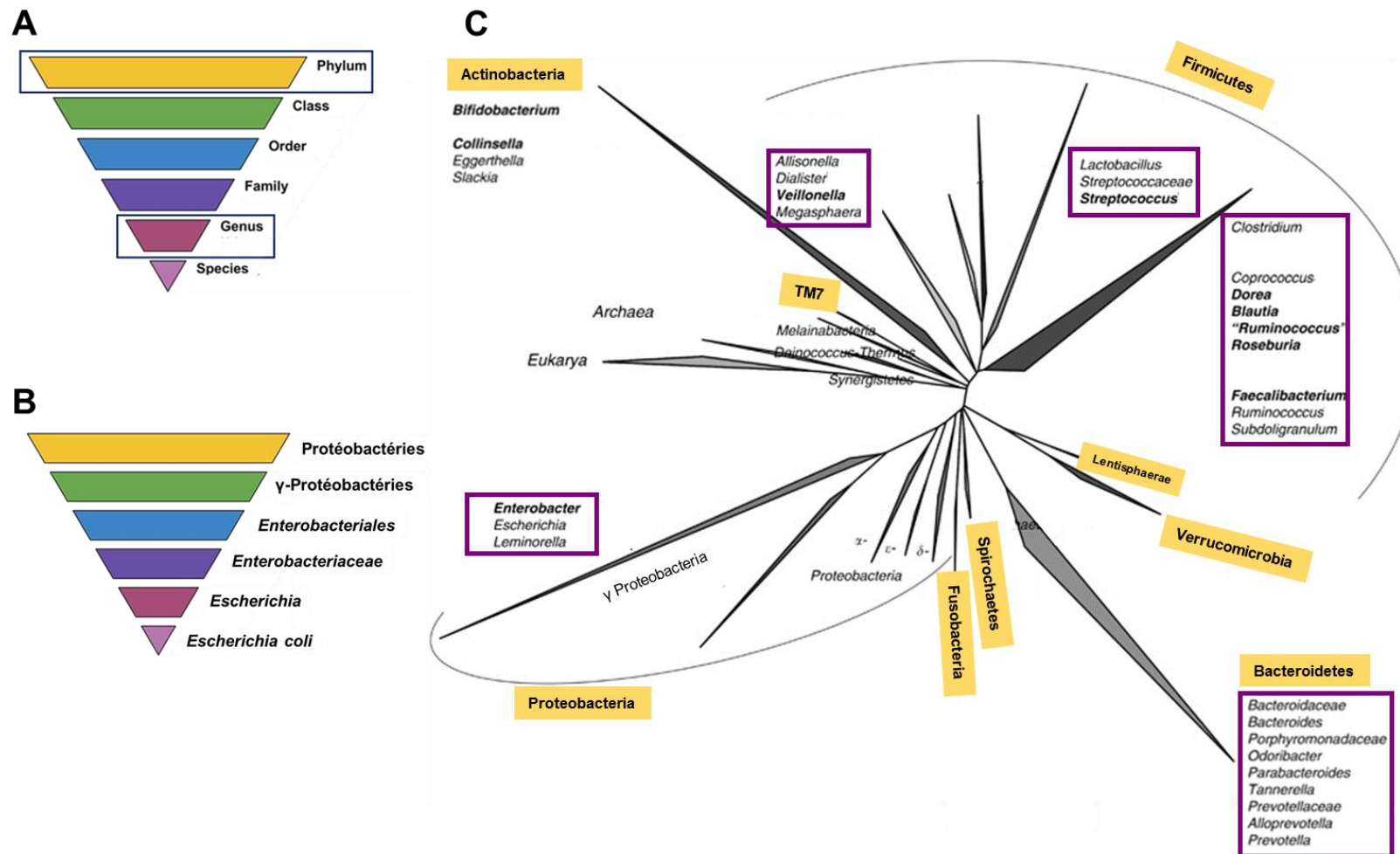
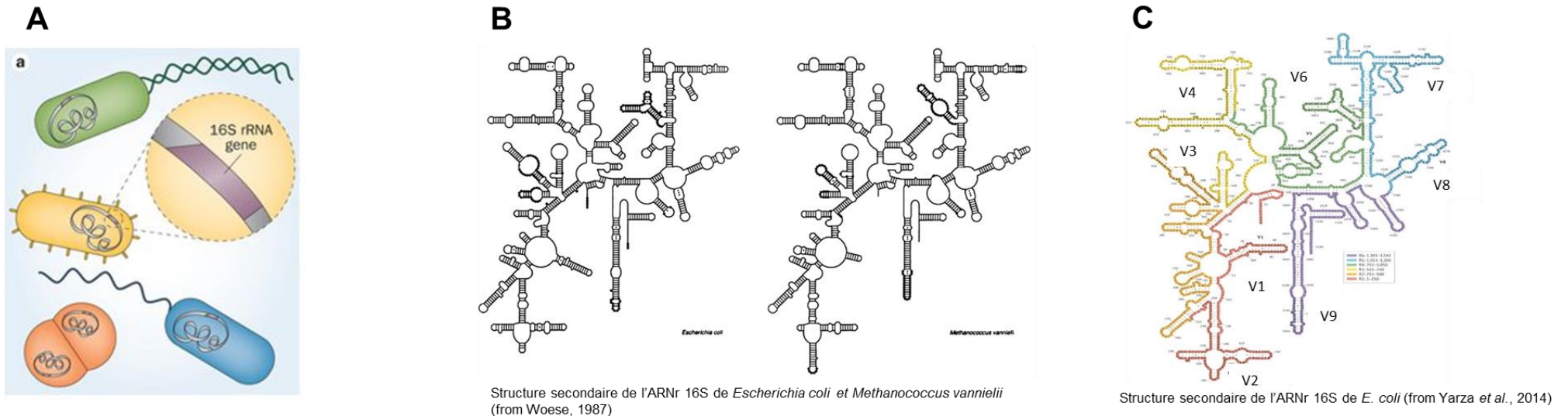


Figure 44. Justification de l'utilisation du gène de l'ARNr 16S comme marqueur taxonomique dans l'étude des communautés bactériennes. (A) Le gène de l'ARNr 16S est présent chez toutes les bactéries et archées car il code pour un produit très conservé au sein des bactéries et des archées. Illustration tirée de (249). (B) structure secondaire de l'ARNr 16S chez *E. coli* (à gauche) et *Methanococcus vannielii*, une archée (à droite), produit du gène ciblé par les études de communautés bactériennes. (C) Régions dites hypervariables de l'ARNr 16S, ciblées par le séquençage haut débit pour étudier les communautés bactériennes.



• Présent chez toutes les bactéries et archées

- Fonction hautement conservée
- Code pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique des eubactéries et archées



« Chronomètre moléculaire » (Woese, 1987)

- Vitesse d'évolution lente → séquence suffisamment conservée entre lignées bactériennes éloignées
- Longue molécule (env. 1540 nt.) dont la vitesse d'apparition de mutations aléatoires varie en fonction des régions, ce qui permet de capter l'ensemble des relations phylogénétiques au sein des eubactéries et archées (du phylum à l'espèce)

• Constituée de 9 régions hypervariables

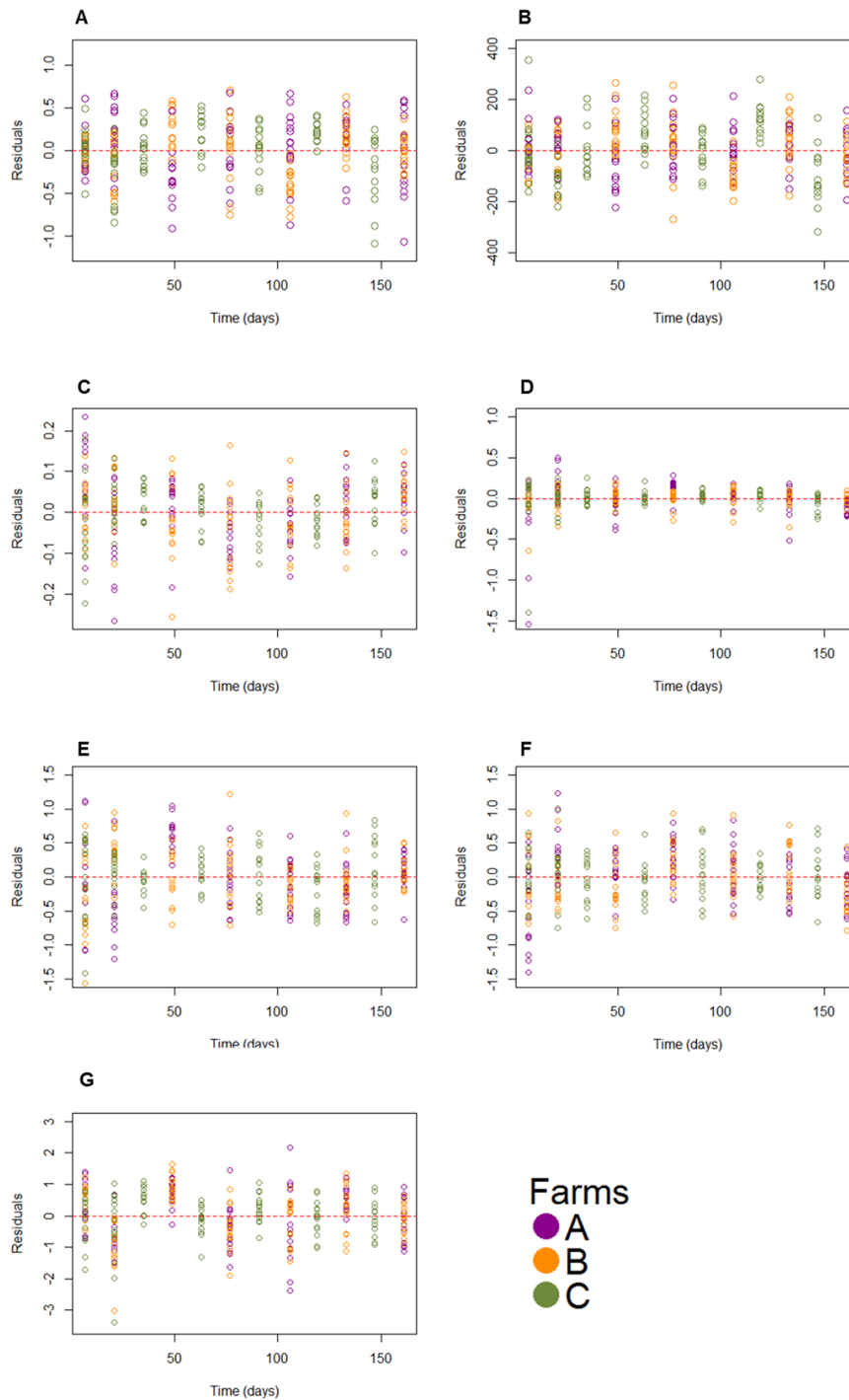
- Tailles des amplicons compatibles avec des techniques de séquençage haut débit à prix abordable et de bonne qualité

• Séparées par des régions conservées

- Sites de liaison d'amorces hautement conservés → design d'amorces (quasi)universels

Annexe 2 : Résidus des modèles de l'étude n°1 sur les veaux de boucherie

Figure 45. Résidus en fonction du temps des différents modèles. Les résidus représentés dans (A) et (B) sont respectivement ceux des modèles de l'indice de Shannon et du nombre d'UTO. Les résidus représentés dans (C), (D), (E) et (F) sont respectivement ceux des modèles des abondances relatives des Firmicutes, des Bacteroidetes, des Actinobactéries et des Protéobactéries. (G) représente les résidus du modèle du nombre d'*E. coli*/g.



Annexe 3 : Évolution de l'abondance relative des 10 genres dominants du microbiote fécal aux autres temps de prélèvement

Figure 46. Abondances relatives des 10 taxa les plus abondants à l'échelle des genres chez tous les veaux au (A) troisième échantillonnage (35^{ème} jour pour la ferme C, 49^{ème} jour pour les fermes A et B), et (B) quatrième échantillonnage (63^{ème} jour pour la ferme C, 77^{ème} jour pour les fermes A et B). Les veaux sont ordonnés selon les valeurs croissantes d'indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut de chaque graphique. Les points sous les graphiques indiquent l'indice de Shannon (points du haut) et le nombre d'UTO (points du bas). Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes

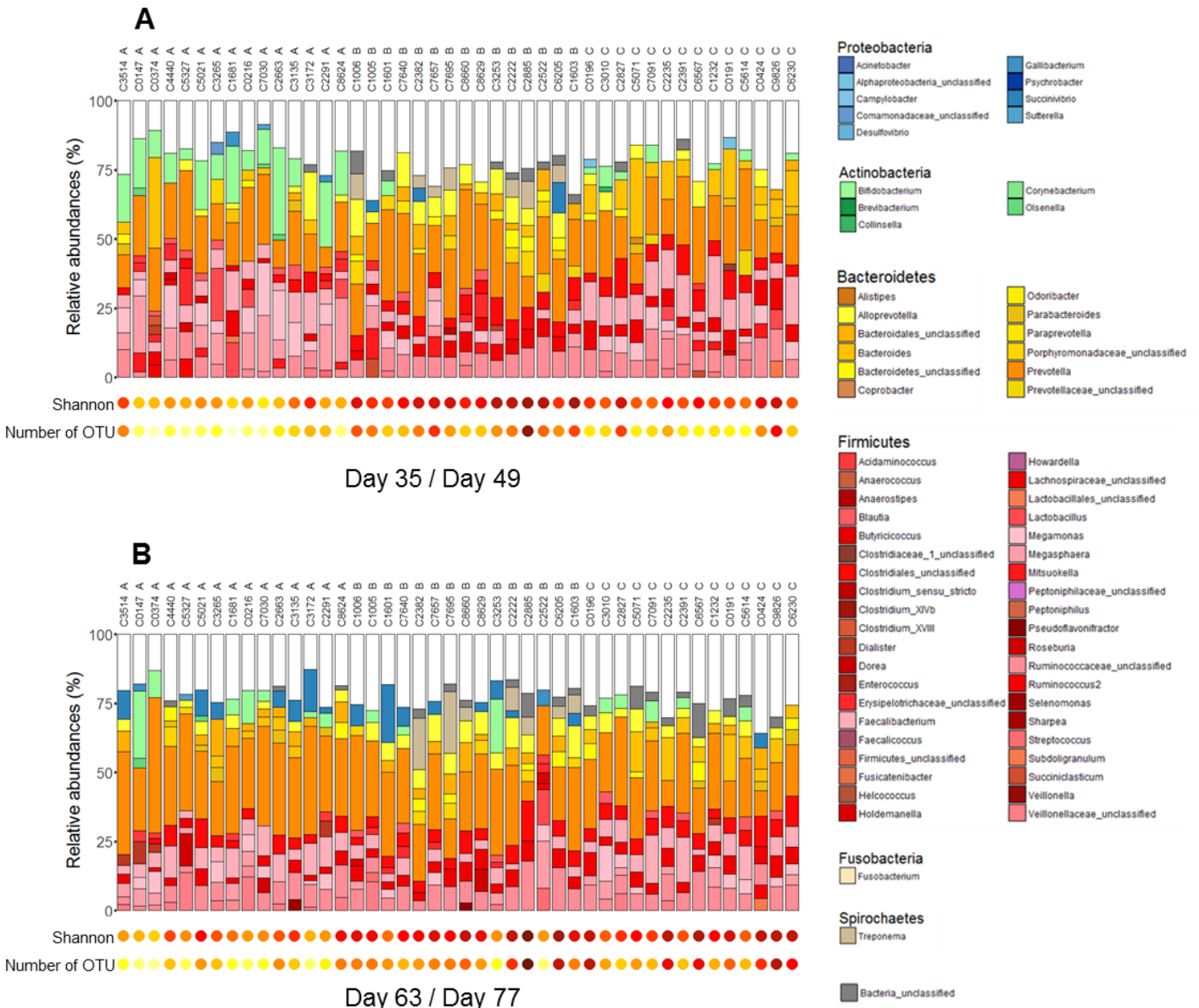
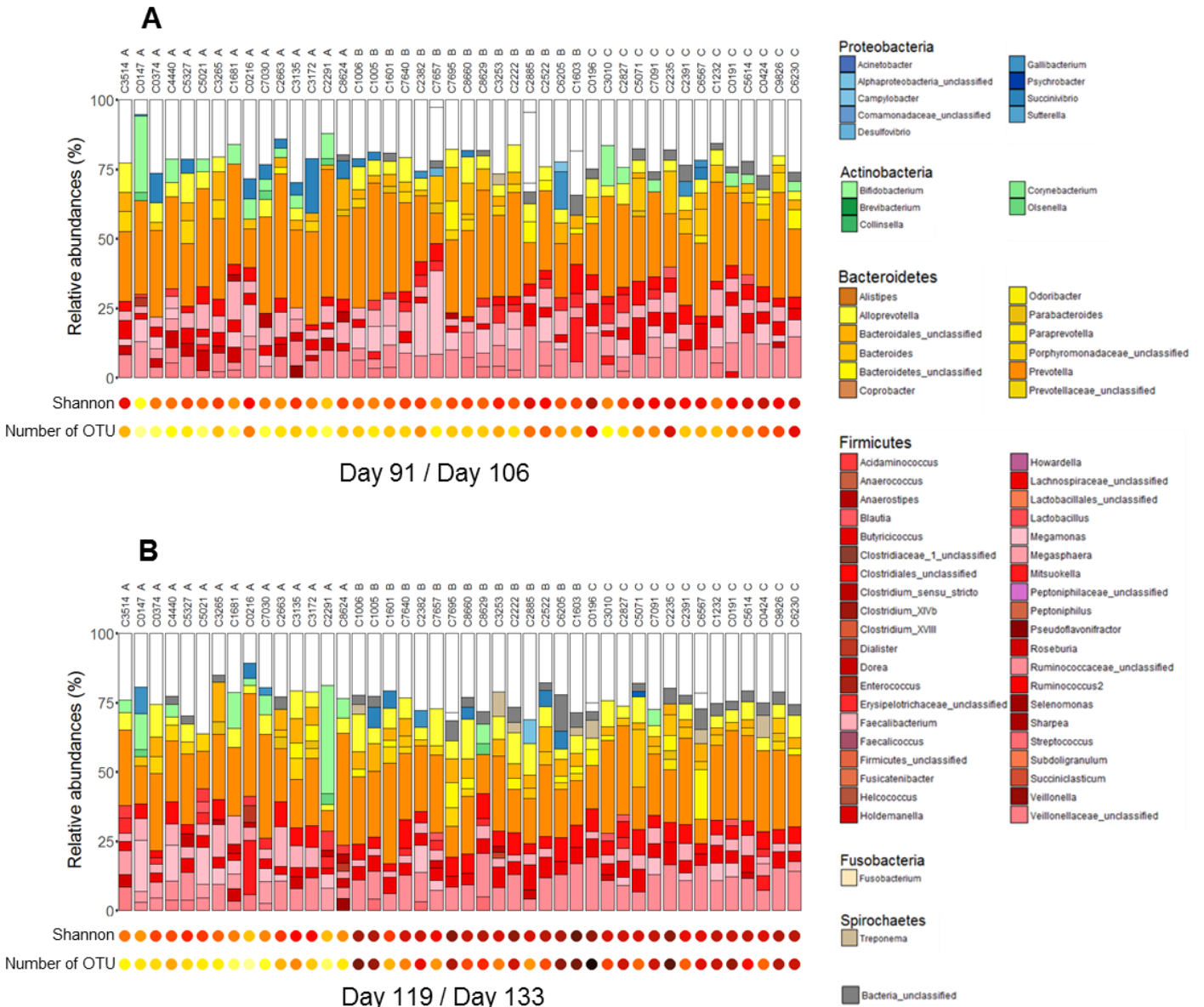


Figure 47. Abondances relatives des 10 taxa les plus abondants à l'échelle des genres chez tous les veaux au (A) cinquième échantillonnage (91^{ème} jour pour la ferme C, 106^{ème} jour pour les fermes A et B), et (B) sixième échantillonnage (119^{ème} jour pour la ferme C, 133^{ème} jour pour les fermes A et B). Les autres taxa détectés sont représentés par des barres blanches. Les veaux sont ordonnés selon les valeurs croissantes d'indice de Shannon au 7^{ème} jour. Le numéro des veaux et la ferme sont indiqués en haut de chaque graphique. Les points sous les graphiques indiquent l'indice de Shannon (points du haut) et le nombre d'UTO (points du bas). Le code couleur fait référence au phylum de chaque taxa, et la palette a été construite afin de maximiser la distinction entre les teintes



Annexe 4 : Article n°2

L'article présenté dans cette annexe est paru dans le numéro de novembre 2016 de la revue francophone des laboratoires. J'ai réalisé ce travail bibliographique sur la variabilité des populations commensales d'*E. coli* chez l'homme à différentes échelles géographiques et temporelles durant ma première année de thèse.

Diversité des populations d'*Escherichia coli* et leurs variations au cours du temps au sein du microbiote intestinal

Mériil Massot^{a,b}, Bertrand Picard^{a,c,d}, Erick Denamur^{a,b,e}

RÉSUMÉ

Escherichia coli est la bactérie aéro-anaérobie facultative commensale de l'intestin de l'Homme et des autres mammifères la plus abondante. Il s'agit également du premier agent responsable d'infections extra-intestinales. Depuis les années 2000, on la retrouve au premier rang des espèces clés impliquées dans l'émergence et la diffusion des résistances acquises aux antibiotiques, servant entre autre de vecteur aux gènes codant pour les β -lactamases à spectre étendu de type CTX-M. De par son spectre d'hôtes très large, *E. coli* est donc au centre d'un véritable enjeu de santé publique mondiale. Dès lors, il est important d'étudier la structure génétique de la population d'*E. coli* dans le tube digestif, fruit de pressions de sélection qui découlent à la fois de son environnement immédiat, et de celui de son hôte. L'espèce se décline en 7 groupes phylogénétiques principaux A, B1, B2, C, D, E et F. Les souches de ces groupes phylogénétiques ont des capacités de colonisation du tube digestif et de pathogénicités intestinales et extra-intestinales différentes. Le caractère particulièrement virulent des souches pathogènes du groupe B2 serait une conséquence secondaire de leur aptitude à coloniser de manière efficace le tube digestif d'un individu. Cette dualité entre commensalisme et pathogénèse opportuniste fait de *E. coli* un parfait marqueur pour surveiller l'émergence au sein des flores commensales de souches potentielles virulentes et résistantes aux antibiotiques.

β -lactamases à spectre étendu - commensal - *Escherichia coli* - groupes phylogénétiques - microbiote intestinal - pathogène opportuniste.

1. Où se rencontre la bactérie *Escherichia coli*?

Connue du grand public à travers les annonces dans la presse de rappels de steaks, légumes, ou autres lots de fromages contaminés, on oublie parfois que nous vivons

- INSERM, IAME, UMR1137, Paris, France
- Univ Paris Diderot, IAME, UMR1137, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
- APHP, Hôpitaux Universitaires Paris Seine Saint-Denis, Site Avicenne, Bobigny, France
- Univ Paris Nord, IAME, UMR1137, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France
- APHP, Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val-de-Seine, Site Bichat Claude-Bernard, Paris, France

* Correspondance
meril.massot@inserm.fr

article reçu le 15 février 2016, accepté le 6 avril 2016.
© 2016 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

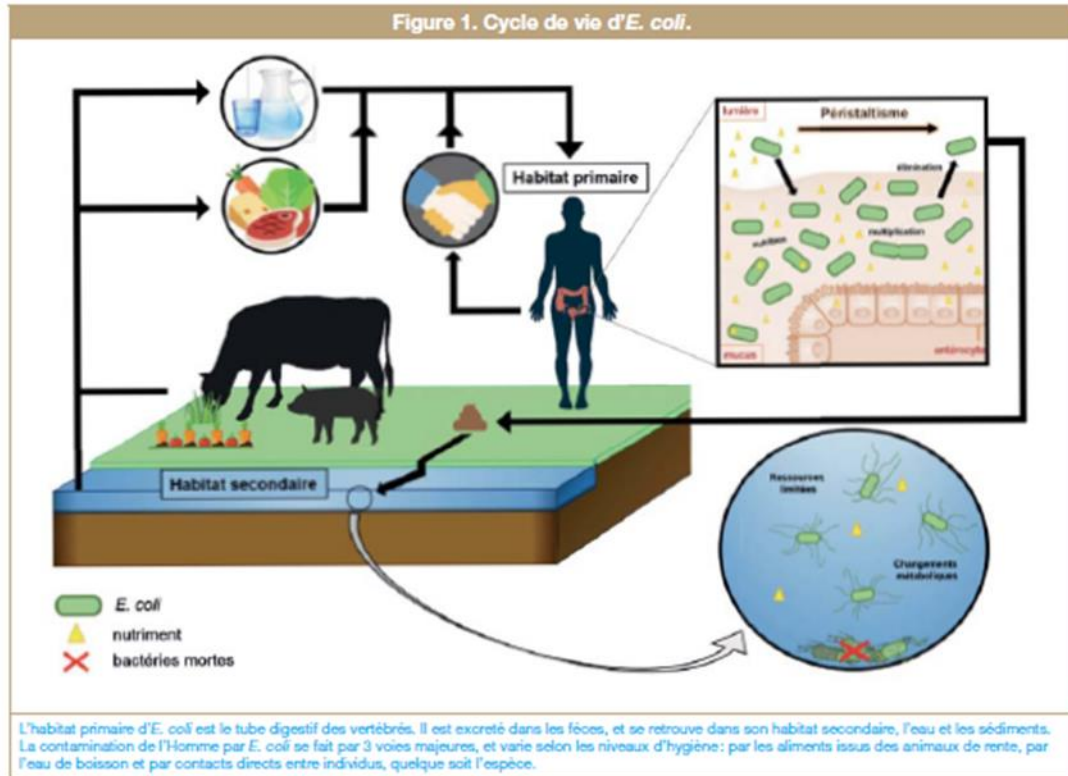
Diversity and variability in populations of *E. coli* over time within the gut microbiota

Escherichia coli is the most common commensal aerobic bacterium in the gut microbiota of human and others mammals. It can nevertheless cause a broad range of diseases from various diarrheal diseases to extra-intestinal diseases. Since 2000, it is one of the most abundant bacterium that participate to the emergence and diffusion of factors coding for resistance to antibiotics, for example, genes coding for extended spectrum β -lactamases, such as CTX-M. Because of its broad host spectrum and the severity of the diseases it causes, the fight against resistant pathogenic *E. coli* is a priority for the world health. It is therefore valuable to study the genetic structure of the gut *E. coli* populations, where drivers such as antibiotic treatments lead to the emergence and diffusion of resistance genes. The species is divided in seven main phylogenetic groups named A, B1, B2, C, D, E and F. The gut colonization efficiency and the ability to cause intestinal or extra-intestinal diseases vary among these groups. The virulence of the pathogenic strains of the phylogenetic group B2 could be a by-product of their great ability to colonize the gut. *E. coli* is a good marker to survey the emergence in the gut microbiota of resistant pathogens, because of its dualism between commensalism and pathogenicity.

Extended spectrum β -lactamases - commensal - *Escherichia coli* - phylogenetic groups gut microbiota - opportunistic pathogen.

au quotidien en bonne entente avec *E. coli*. D'où vient la part ambiguë de la relation que nous entretenons avec elle? On retrouve *E. coli* partout dans notre environnement, plus particulièrement dans le tube digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud. Quatre-vingt-dix pour cent des humains hébergent des *E. coli* dans leurs intestins [1, 2], contre 56 % des autres mammifères, 23 % des oiseaux et 10 % des reptiles [3]. Les populations de *E. coli* intestinales se comptent à des niveaux de l'ordre de 10^7 à 10^9 Unité Formant Colonie par gramme (UFC/g) de fèces ce qui en fait la bactérie aéro-anaérobie facultative majoritaire de notre tube digestif. Il s'agit de l'une des premières espèces à coloniser l'intestin encore stérile du nouveau-né à partir de la flore digestive de la mère si la naissance a lieu par les voies naturelles, ou de l'environnement si elle

Dossier scientifique



se fait par césarienne [1]. Sa colonisation du tube digestif dans les premières heures de vie d'un nourrisson est cruciale pour l'installation de la flore intestinale dite bénéfique, puisqu'en consommant l'oxygène dans le milieu intestinal, *E. coli* créerait un environnement pauvre en oxygène et donc favorable aux bactéries anaérobies [2]. Malgré cette domination sur le reste de la flore aérobie du tube digestif, les populations d'*E. coli* restent toutefois 100 à 10 000 fois moins nombreuses que la masse de bactéries anaérobies présentes dans le tube digestif [2]. *E. coli* cohabite avec d'autres espèces de micro-organismes, bactéries, majoritairement anaérobies, eucaryotes ou encore bactériophages (virus des bactéries), qu'on regroupe sous le terme de flore ou microbiote intestinal, et qui représentent un total de 10^{14} bactéries, et 10^{15} particules de bactériophages par gramme de matières fécales. *E. coli* est établie sur toute la longueur du tube digestif à partir du duodénum, avec un maximum de concentration au niveau du colon et du caecum [4]. Son métabolisme est adapté au mucus synthétisé par les cellules caliciformes de l'épithélium intestinal (figure 1) [2]. Au sein de sa niche écologique nutritionnelle, *E. coli* utilise principalement les sucres comme source de carbone, dont le gluconate [5]. Cette bactérie optimise sa croissance en alternant une respiration aérobie et micro-aérobie. Il en résulte une vitesse de croissance élevée, avec un temps de génération de l'ordre de 120 minutes *in vivo* [6]. Cela lui confère un avantage par rapport à la flore compétitrice. *E. coli* peut coopérer avec d'autres bactéries. Par exemple, elle peut bénéficier de la dégradation par des bactéries anaérobies

de polysaccharides du mucus ou des fibres alimentaires. On qualifie généralement la relation entre *E. coli* et son hôte de « commensale », c'est-à-dire que l'un des deux organismes bénéficie de cette interaction sans que l'autre n'en tire un avantage particulier. Dans le cas d'*E. coli*, elle profite de son hôte en détournant des nutriments issus de la digestion pour sa propre consommation. Elle est également protégée contre certains stress, et bénéficie d'un environnement stable. Le terme de mutualisme serait plus approprié que celui de commensalisme, dans la mesure où la présence de populations d'*E. coli* dans le tube digestif constitue un avantage certain pour l'individu. Ces bactéries agissent directement sur leur hôte, en stimulant le système immunitaire [7], et en modulant son appétit et sa satiété grâce à des protéines mimant des hormones agissant sur les circuits neuronaux impliqués dans la régulation de l'appétit [8]. Elles jouent également un rôle de barrière contre d'éventuels agents pathogènes, telles que les salmonelles ou les clostridies, en prévenant la colonisation du tube digestif, via l'occupation de sa niche écologique et la production de bactériocines [9]. Du fait de la dégradation du mucus qui tapisse l'épithélium intestinal et de son élimination par le péristaltisme, les bactéries se retrouvent dans la lumière du tube digestif de leur hôte, et sont éliminées avec les matières fécales dans l'environnement (figure 1) [2]. L'eau, et les sédiments constituent l'habitat secondaire d'*E. coli*. Les concentrations d'*E. coli* dans les sédiments sont hautement corrélées à celles des eaux qui les recouvrent, bien qu'en général, les

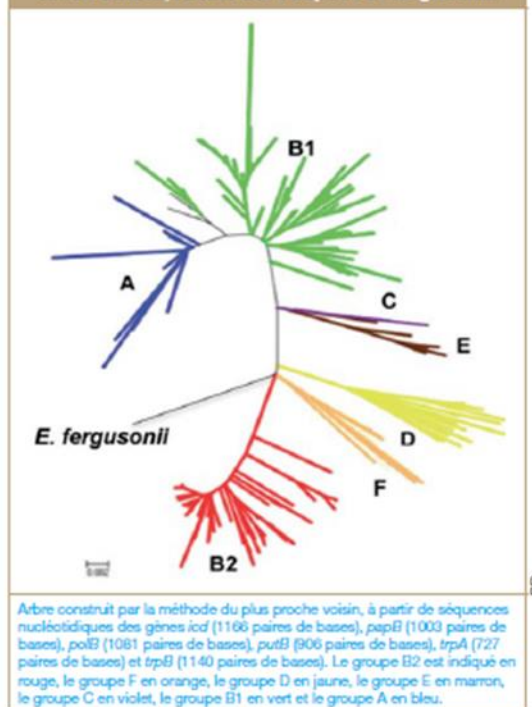
concentrations dans les sédiments soient 100 à 1000 fois supérieures [10]. Le cycle de vie d'*E. coli* implique une transition phénotypique et métabolique entre l'habitat primaire et secondaire, car leurs conditions physico-chimiques, le microbiote environnemental, ainsi que les sources de nutriments qu'ils offrent diffèrent considérablement. La présence d'*E. coli* en quantité variable dans l'environnement résulte directement de sa capacité à survivre dans des conditions environnementales plus ou moins stressantes. Au cours du temps, une sélection s'opère. Elle est toutefois contrebalancée par l'arrivée permanente de bactéries en provenance de l'habitat primaire, ce qui permet de maintenir une population relativement stable dans l'environnement [11]. Cependant, toutes les souches d'*E. coli* retrouvées dans l'eau ne sont pas uniquement d'origine humaine ou animale, et il a été prouvé que certaines souches peuvent s'adapter au milieu extérieur, y survivre, voire y persister [12]. Le nombre total de bactéries constituant l'espèce *E. coli* a été estimé à environ 10^{20} individus, répartis sur tous les continents, qu'elles soient présentes dans le tube digestif d'un être vivant ou dans l'environnement [2].

2. Une structure de population clonale qui permet la distinction de 7 groupes phylogénétiques principaux

Comment réconcilier le fait de retrouver à divers endroits du monde des souches de *E. coli* identiques, ou présentant des associations spécifiques d'allèles, avec l'immense diversité génotypique, phénotypique et de niches écologiques spécifiques qui existe au sein d'un hôte donné? Derrière cette question se cache celle de l'évolution de la structure génétique de l'espèce. Il est reconnu aujourd'hui que *E. coli* est une espèce clonale, c'est-à-dire qu'une population donnée est issue d'une seule cellule bactérienne par reproduction asexuée, et que l'hétérogénéité entre souches est le fruit des mutations ponctuelles sur le brin d'ADN. Dans le cas d'*E. coli*, ce mode de reproduction s'accompagne d'un taux de recombinaisons génétiques non négligeable, ce qui a conduit peu à peu certaines souches à diverger et à donner naissance à de nouvelles lignées de clones, à l'origine de la diversité génétique immense que l'on retrouve aujourd'hui [13]. Néanmoins, ces phénomènes de brassage génétique n'altèrent pas la topologie globale de la phylogénie de l'espèce. Il existe pour chaque souche un signal phylogénétique clair. Des différences génomiques importantes au sein de l'espèce ont ainsi été mises en évidence, d'abord par l'analyse des variants protéiques par la technique du « MultiLocus Enzyme Electrophoresis » (MLEE) [14], puis grâce à l'analyse de l'ADN, notamment par la technique du « MultiLocus Sequence Typing » [15]. Ces techniques ont permis de subdiviser l'espèce *E. coli* en 7 groupes phylogénétiques principaux dénommés A, B1, B2, C, D, E et F (figure 2) [16, 17]. Une PCR simple et rapide est désormais disponible pour identifier le groupe phylogénétique d'une souche [18]. Si les genres *Salmonella* et *Escherichia* divergent au temps de l'âge d'or des dinosaures, 120 à 160 millions d'années avant notre ère,

l'émergence d'*E. coli* suit l'apparition des mammifères et de leur alimentation lactée. L'ancêtre d'*E. coli* devient capable de métaboliser le lactose grâce aux gènes portés sur l'opéron lactose, et donc à utiliser les ressources présentes dans le tube digestif de cette nouvelle classe d'animaux amenée à connaître une explosion radiative majeure à l'âge tertiaire [19]. Les souches du groupe B2 ont été les premières à émerger dans l'évolution, il y a 23 à 30 millions d'années [20]. Le groupe D puis le groupe E auraient ensuite émergé. Enfin, l'ancêtre commun des groupes frères C, A et B1 serait apparu il y a 3 millions d'années (figure 2) [20, 21]. Cette histoire évolutive se retrouve dans l'occupation des mêmes niches écologiques pour les souches des groupes A et B1, et différentes de celles qu'occupent les souches des groupes B2 et D, ce qui témoigne de la grande plasticité du génome de cette espèce, lui permettant de s'adapter à de nombreuses conditions environnementales et métaboliques. Ces phylogroupes se déclinent eux-mêmes en sous-groupes, dont les plus étudiés pour leur pouvoir pathogène sont, parmi les 10 sous-groupes actuellement décrits dans le groupe B2, les « Sequence Types complex » I, VII, IX et X [17], en référence à la technique du MLST, et pour l'émergence de certaines résistances, le sous-groupe Clonal Group A (CGA) du groupe phylogénétique D [22]. En addition à ces groupes phylogénétiques, on décrit également cinq clades appartenant au genre *Escherichia*, dont le phénotype est très proche voire identique à celui des *E. coli* mais dont les caractères génotypiques les différencient des souches d'*E. coli sensu stricto* [23].

Figure 2. Arbre phylogénétique de l'espèce *E. coli sensu stricto*, raciné sur l'espèce *E. fergusonii*.



Dossier scientifique

3. Les souches pathogènes intestinales et extra-intestinales

Le pouvoir pathogène d'*E. coli* fut découvert dès la fin du XIX^e siècle, peu de temps après l'isolement et la description de la bactérie par Théodore Escherich [24]. *E. coli* se distingue par une remarquable variété de pathotypes, responsables d'infections intestinales ou extra-intestinales. On classe les souches d'*E. coli* pathogènes intestinales sous la dénomination commune « Intestinal Pathogenic *E. coli* » (InPEC). Au sein des InPEC, on distingue des pathotypes, au nombre de 6, en fonction de l'expression de leur virulence : les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC), et *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC). Un 7^e pathovar serait responsable de la toxi-infection alimentaire collective de 2011 en Allemagne [16,25], qui a coûté la vie à plusieurs dizaines de personnes à la suite de consommation de graines germées, et présente des caractéristiques à la fois d'EHEC et d'EAEC. L'étape commune à tous ces pathotypes et préliminaire à l'expression de la virulence est l'adhésion aux entérocytes, ce qui leur permet de résister au péristaltisme intestinal et à l'élimination hors de l'hôte. Les mécanismes du pouvoir pathogène de ces différents pathotypes sont très divers et leur virulence est multifactorielle. Le tableau clinique est dominé par une diarrhée dont les caractéristiques symptomatologiques dépendent du pathotype, et qui constitue un moyen de dissémination vers de nouveaux hôtes.

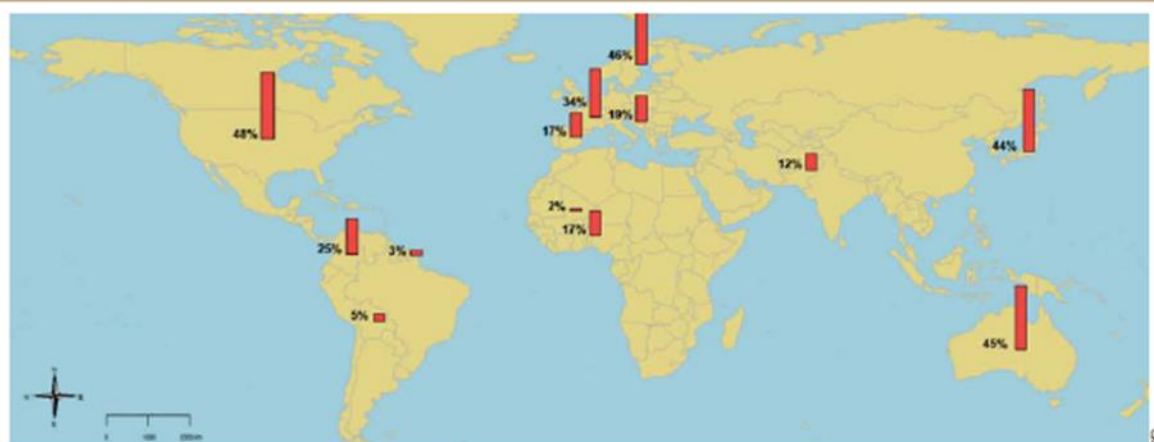
Les souches d'*E. coli* responsables d'infections extra-intestinales sont regroupées sous la dénomination « Extra-Intestinal Pathogenic *E. coli* » (ExPEC), et appartiennent pour la plupart aux groupes phylogénétiques B2 et D. On distingue deux pathotypes majoritaires : les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et les *E. coli* responsables de méningites néonatales (NMEC). On isole également le colibacille dans

des infections localisées dans d'autres parties anatomiques du corps humain, comme des infections pulmonaires, ostéo-articulaires, des endocardites, des infections sur dispositifs intravasculaires ou sur matériel chirurgical. Des bactériémies peuvent compliquer ces infections et disséminer le colibacille vers d'autres sites, aggravant le pronostic. Il est intéressant de noter que ces souches ExPEC sont distinctes des InPEC, car elles ne provoquent pas d'infections intestinales, bien qu'elles soient capables de coloniser le tube digestif.

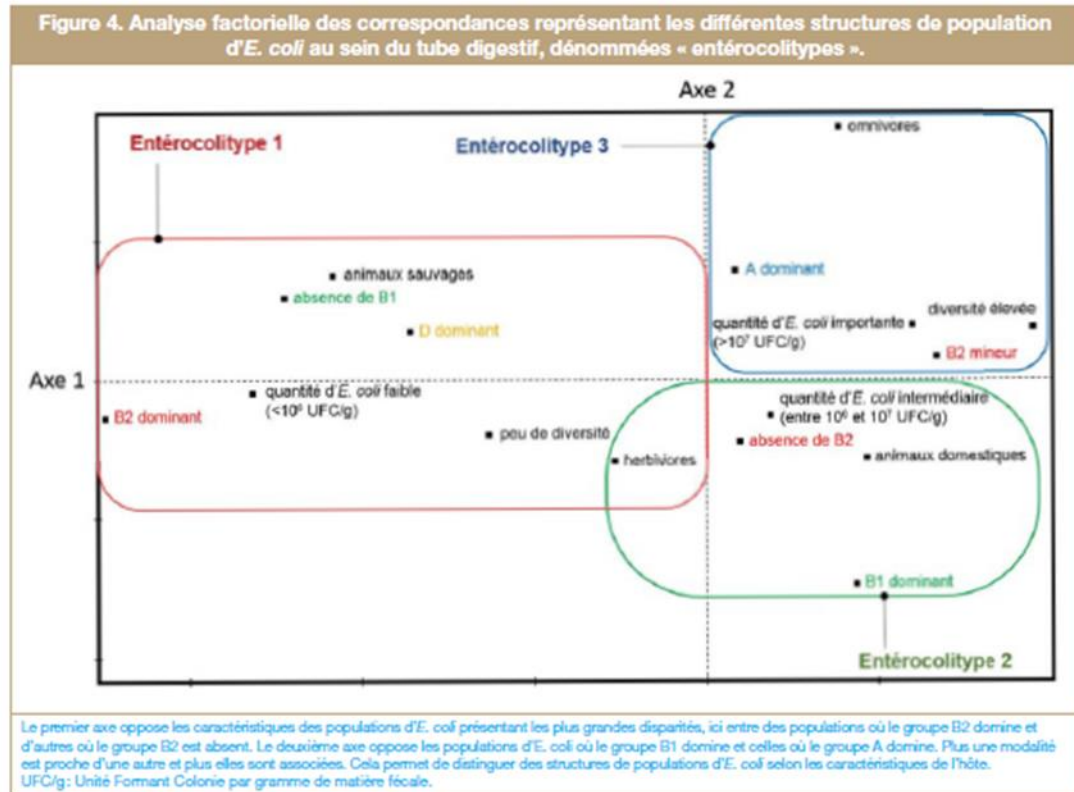
4. Une grande diversité des populations commensales d'*E. coli* pour une grande diversité d'hôtes

Il a été établi qu'à tout moment, un individu héberge au moins une souche d'*E. coli* dominante, c'est-à-dire qui représente plus de la moitié des souches d'*E. coli* isolées [26], avec d'autres souches présentes à des niveaux moindres. La diversité génétique des souches d'*E. coli* existant au sein de son hôte, soit le nombre de souches génétiquement différentes qu'on peut observer dans un échantillon de matière fécale, peut s'approcher par la prévalence des différents groupes clonaux au sein d'un échantillon. On distingue 3 catégories : le groupe phylogénétique dominant, dont la prévalence est supérieure à 50 %, le ou les groupes intermédiaires, dont la prévalence est comprise entre 10 % et 50 % et les groupes mineurs, dont la prévalence ne dépasse pas 10 % [27]. Les clones appartenant à ces deux derniers groupes sont considérés comme sous-dominants dans l'échantillon. Cette structure a été mise en évidence chez l'Homme [26], mais aussi chez des animaux, tels que le chien [26]. Le groupe phylogénétique dominant le plus fréquent chez l'Homme dans les pays industrialisés est principalement B2 (figure 3),

Figure 3. Répartition mondiale des souches d'*E. coli* du groupe phylogénétique B2 dans la flore commensale des populations humaines à partir d'une revue de la littérature.



Les prévalences des souches du groupe B2 dans chaque pays sont indiquées par les diagrammes en barres.



suivi des groupes A, D et B1 (43 %, 24 %, 21 % et 12 %, respectivement) [2]. Quels sont les éléments favorisant la colonisation de notre tube digestif par un groupe phylogénétique donné ? De manière générale, on peut séparer les facteurs influençant la structure génétique des populations d'*E. coli* en 2 catégories : les caractéristiques de l'hôte et celles de l'environnement. En effet, les particularités de l'hôte, tels que l'espèce à laquelle il appartient, sa masse corporelle, l'anatomie et la physiologie de son tube digestif, les temps de rétention du bol alimentaire, et le régime alimentaire sont des prédicteurs fiables de la distribution des groupes phylogénétiques au sein du spectre d'hôtes. La relation étroite qui existe entre l'hôte et sa flore d'*E. coli* a permis de distinguer trois types de structures de populations majeures, ou « entérocolotypes » caractérisés par des associations de groupes phylogénétiques (figure 4) [28], à l'image des « entérotypes » décrits chez l'Homme sur des associations d'espèces et de genres bactériens du microbiote global [29]. Par exemple, l'environnement intestinal des herbivores semble favoriser les souches du groupe phylogénétique D. Cependant, l'état de domesticité d'un herbivore favorise l'établissement de souches du groupe phylogénétique B1 [28]. Du reste, il semblerait que le groupe phylogénétique du clone dominant influencerait lui aussi sur la structure de population. Avec une souche dominante appartenant au groupe phylogénétique B2, la probabilité d'observer d'autres groupes phylogénétiques dans la population sera faible, tandis qu'avec une souche

dominante A, on détectera d'autres groupes phylogénétiques mineurs (figure 4) [28]. Ces données supportent l'hypothèse que la virulence extra-intestinale associée aux souches du groupe B2 serait un coproduit du commensalisme [30]. Il a été montré que les îlots de pathogénicité, dans lesquels se regroupent les gènes de virulence extra-intestinaux, et qu'on retrouve associés au groupe phylogénétique B2, sont impliqués dans la colonisation intestinale [30]. Des souches possédant l'îlot *pks* coloniseraient de manière plus efficace le tube digestif que d'autres bactéries, en ralentissant le renouvellement de l'épithélium intestinal [28]. Un grand nombre de gènes de virulence extra-intestinaux exprimés par le groupe phylogénétique B2 auraient permis à ces souches d'être d'excellentes colonisatrices du tube digestif, empêchant l'établissement de souches d'autres groupes phylogénétiques ayant perdu ses caractères ancestraux [31].

Les facteurs environnementaux, tels que le climat, jouent également un rôle prépondérant sur la variabilité qui existe entre les structures génétiques d'*E. coli* de deux populations d'une même espèce hôte. En effet, un individu vivant en zone tropicale a tendance à abriter plus de souches d'*E. coli* génétiquement différentes qu'un autre vivant en zone tempérée. Le groupe phylogénétique dominant au sein de la flore d'une personne peut également changer suivant les conditions climatiques dans lesquelles il vit. Cela s'illustre par une étude qui a comparé les populations commensales d'*E. coli* de français expatriés en Guyane

Dossier scientifique

Française depuis peu avec celles de personnes résidant en France métropolitaine et des Amérindiens guyanais. Il a été montré que les populations d'*E. coli* présents dans le microbiote des expatriés présentaient une diversité de souches intermédiaire entre ceux des deux autres populations. De plus, ces expatriés hébergeaient moins de souches du groupe phylogénétique B2 que les français restés en métropole (figure 3), et moins de souches du groupe A que les natifs amérindiens [32].

En résumé, la structure de répartition des groupes phylogénétiques d'*E. coli* au sein de son hôte est le jeu de forces complexes et multifactorielles. Chaque combinaison de ces facteurs conduit à une structure spécifique et propre à chaque individu. La virulence d'une souche hors du tube digestif serait une conséquence indirecte de la conservation et de l'expression de gènes ancestraux impliqués dans le commensalisme et la survie dans le tube digestif, qui constitue l'habitat primaire du colibacille.

5. Une population bactérienne qui fluctue au cours du temps

Cette structure de population est dynamique et interagit avec son hôte. On peut distinguer des souches dites résidentes, qui s'établissent de façon stable dans le tube digestif pendant des mois, voire des années, et des souches transitoires, qui ne persistent pas plus de quelques semaines dans la flore intestinale. Au fil du temps, et par l'apport constant de nouvelles souches d'*E. coli* par l'alimentation [33], l'eau de boisson, ou encore les mains (figure 1), les souches résidentes sont peu à peu remplacées par de nouvelles [26]. Il semblerait que chez l'Homme, la perte d'une souche résidente soit suivie par l'apparition d'une ou

plusieurs souches peu persistantes, avant qu'une nouvelle souche résidente ne s'établisse de manière pérenne [26]. On trouve chez l'Homme, une, deux, voire trois souches résidentes qui coexistent sur des périodes plus ou moins longues. Souches dominantes et résidentes sont fréquemment les mêmes [26].

Dans une perspective plus large, on a observé une évolution de la structure de population dans la population parisienne entre les années 1980, 2000 et 2010, avec une augmentation de la prévalence du groupe phylogénétique B2 (9,4 % dans les années 1980, 22,7 % en 2000 et 34 % en 2010) (figure 5) et une diminution concomitante du groupe A (52,8 %, 27,3 % et 28,7 % respectivement) (figure 5) [34]. L'évolution des flores commensales d'*E. coli* de la population parisienne sur ces 30 dernières années reflète sans doute un changement des facteurs socio-économiques de la société française, tels que les habitudes alimentaires et le niveau d'hygiène.

6. Le microbiote intestinal, l'épicentre de l'émergence de la résistance chez *E. coli*

Aujourd'hui, le microbiote intestinal est reconnu comme le lieu d'émergence de nombreux facteurs de résistance aux antibiotiques, de leur amplification et de leur dissémination au sein d'une population, ce qui en fait un acteur essentiel à l'origine de la multiplication des infections à germes antibiorésistants [35]. Cette place centrale du microbiote intestinal dans la résistance aux antimicrobiens résulte de l'association de 3 facteurs. Premièrement, la densité très importante de bactéries au sein d'un environnement clos autorise des échanges nombreux de nutriments mais aussi et surtout de matériel génétique. Deuxièmement, la diversité de ces espèces, estimée à plus de 500 espèces de micro-organismes, fait du tube digestif le réservoir d'un pool de matériel génétique très varié. Enfin, la prise d'antibiotiques par l'hôte entraîne l'arrivée de molécules antibiotiques dans l'intestin, faisant disparaître ou modifiant le métabolisme de la flore sensible. Cette pression de sélection favorise la multiplication des échanges de matériel génétique codant pour des résistances et déstabilise l'ensemble de la flore intestinale par le jeu complexe des relations de coopération/prédation/compétition qui régit cet écosystème. La conjonction de ces trois facteurs fait du microbiote intestinal un terrain favorable à l'établissement de bactéries résistantes aux antibiotiques suite à la disparition de la flore sensible, qu'elles proviennent de l'extérieur ou qu'elles émergent du microbiote lui-même, par la possession ou l'acquisition de gènes codant pour des facteurs de résistance présents chez d'autres espèces du microbiote. Le niveau de perturbation d'un traitement antibiotique sur le microbiote d'un individu est fonction de l'étendue du spectre de la molécule administrée et de son mode d'élimination. Plus une molécule antibiotique a un spectre large et une élimination biliaire, et plus le risque qu'elle affecte l'équilibre du microbiote intestinal est important. Des études ont montré que les effets d'une prise d'antibiotiques sur la flore intestinale pouvaient persister jusqu'à quatre ans après le traitement [35].

Figure 5. Évolution de l'abondance relative des groupes phylogénétiques d'*E. coli* commensaux chez des Parisiens dans les années 1980, 2000 et 2010.

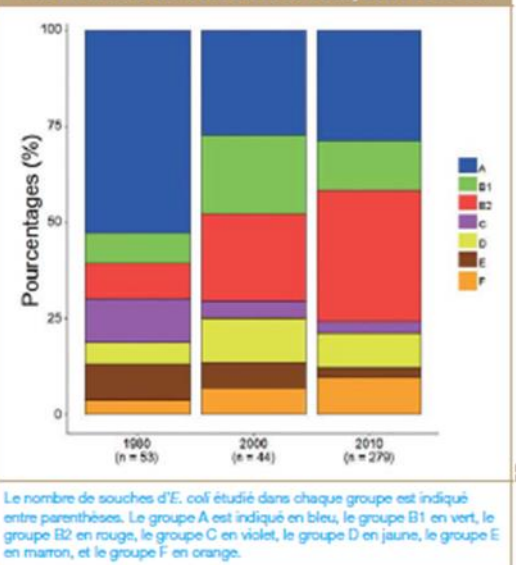
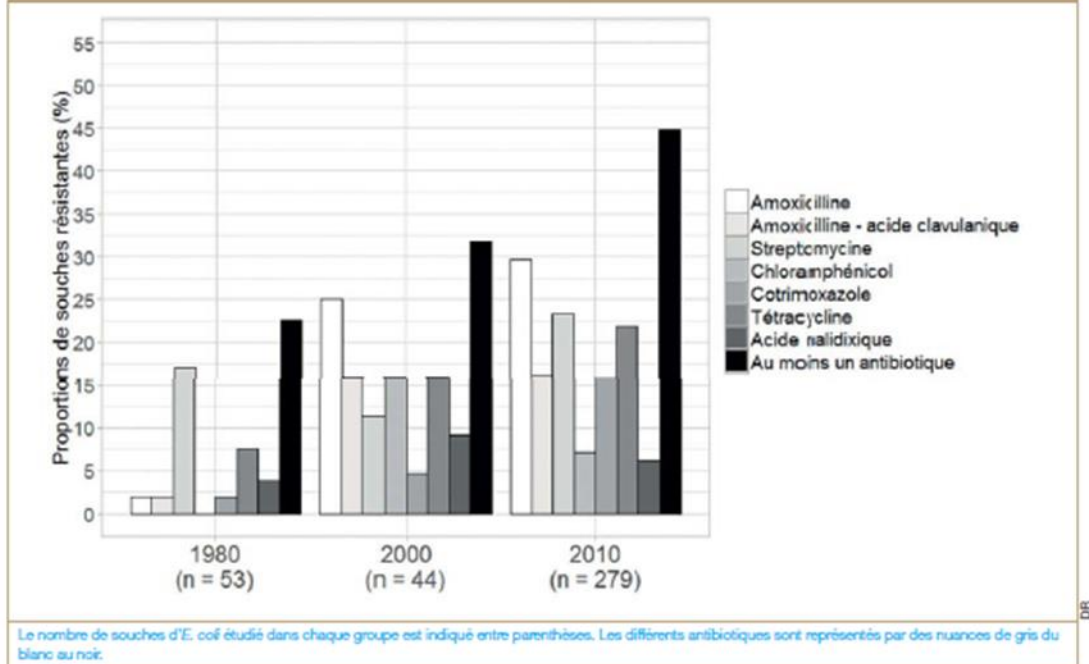


Figure 6. Évolution du portage d'*E. coli* commensaux antibiorésistants chez des Parisiens dans les années 1980, 2000 et 2010.



Au sein du microbiote intestinal, les bactéries appartenant au genre *Escherichia* et plus particulièrement à l'espèce *E. coli* sont majoritairement incriminés [36], de par la grande plasticité de leur génome, leur capacité à résister dans l'environnement et à se transmettre d'un individu à un autre, quelles que soient leurs espèces respectives. *E. coli* est capable d'acquérir du matériel génétique via des éléments génétiques mobiles tels que les transposons, les plasmides, ou des bactériophages. On retrouve très souvent sur ces éléments génétiques mobiles d'autres gènes codant pour des facteurs de résistance à d'autres antibiotiques, à l'origine des bactéries multi-résistantes, tel que celles appartenant au groupe clonal CGA. Les souches du CGA sont responsables d'infections du tractus urinaire chez la femme et ont un plasmide qui porte des gènes de résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfonamides, à la tétracycline et au triméthoprime, lequel plasmide a participé à la dissémination réussie de ces clones dans le monde entier [22].

L'émergence de ces facteurs de résistance au sein du microbiote intestinal est corrélée à la pression de sélection globale exercée par l'utilisation des antibiotiques à l'échelle d'une population, qui ne cesse de croître depuis les années 1940 [37]. Depuis les années 1980, on observe dans la population parisienne une augmentation du nombre de souches commensales d'*E. coli* résistants pour plusieurs familles d'antibiotiques (figure 6) [34]. Parmi les antibiotiques étudiés, seul le nombre de souches résistantes à la streptomycine stagne, ce qui peut s'expliquer par une diminution de la consommation de streptomycine, longtemps prescrite en France dans le cadre du traitement de la tuberculose,

associée à une co-sélection des gènes de résistance à d'autres antibiotiques sur des éléments génétiques mobiles. Parmi les antibiotiques les plus prescrits, partout dans le monde, on retrouve à la première place les β -lactamines, qui sont utilisées dans de nombreuses indications, aussi bien chez l'Homme que chez nos animaux domestiques. La résistance aux β -lactamines chez les entérobactéries, plus particulièrement chez *E. coli*, est principalement due à la production d'enzymes appelées β -lactamases à large spectre (principalement de type TEM-1) et plus récemment β -lactamases à spectre étendu (BLSE), codées par des familles de gènes différents, dénommés *bla*TEM, *bla*SHV et surtout *bla*CTX-M. Si le signalement de souches pathogènes d'*E. coli* productrices de BLSE a commencé dans les années 1980, le portage fécal d'*E. coli* producteurs de BLSE dans le milieu communautaire a été rapporté pour la première fois en Espagne en 2001 et l'année suivante en Pologne. En quelques années, les études attestant de la présence de ces *E. coli* producteurs de BLSE dans le tube digestif d'individus en bonne santé se sont multipliées à travers le monde. La dynamique de propagation de ces *E. coli* semble s'être accélérée à la fin des années 2000. Avant 2008, les taux de portage dans la flore intestinale d'individus en bonne santé relevés partout dans le monde ne dépassaient jamais le seuil des 10 %. Après cette date, on assiste à des augmentations fulgurantes de la prévalence de ces bactéries au sein de certaines populations, comme dans des zones rurales en Thaïlande où la prévalence était de 69 % en 2010 [37]. L'émergence d'*E. coli* producteurs de BLSE dans le microbiote intestinal de nos animaux de rente et leur propagation vers l'Homme à travers la chaîne

Dossier scientifique

agro-alimentaire sont un élément à mettre en cause. Les écosystèmes humains et animaux dans lesquels surviennent ces résistances sont perméables entre eux (figure 1) et des comparaisons génétiques de souches entre ces deux compartiments indiquent l'existence d'une circulation de souches résistantes et d'éléments génétiques mobiles véhiculant des gènes de résistance.

On arrive aujourd'hui au constat alarmant de la présence de ces *E. coli* producteurs de BLSE dans l'ensemble de la population mondiale, mais également, chez nos animaux domestiques, dans les rivières et dans les océans [37]. Si le réservoir de ces *E. coli* semble infini, il existe des différences régionales de quantités d'*E. coli* portés, et de dynamiques de contamination. Des études menées dans le Pacifique ouest, en Méditerranée orientale et en Asie du Sud-Est rapportent les taux de portage les plus élevés du monde. D'après l'OMS, plus d'un milliard d'individus seraient porteurs dans leur tube digestif d'entérobactéries productrices de BLSE en Asie du Sud-Est, contre 35 millions en Europe. Ces données suggèrent que la difficulté d'accéder à de l'eau potable, le faible niveau d'hygiène, la pauvreté et les densités fortes de populations sont des facteurs extrêmement efficaces pour la dissémination des *E. coli* producteurs de BLSE, comme c'est le cas pour tout autre micro-organisme ayant un mode de transmission féco-orale. Le rôle de l'eau contaminée par des *E. coli* producteurs de BLSE a été démontré dans de nombreux pays comme la Chine, la République Tchèque, l'Inde, le Brésil et le Congo [37]. Les voyages dans des pays à taux de portage élevé constitueraient un facteur de risque d'être colonisé par une souche d'*E. coli* producteur de BLSE. Une étude menée en 2012 en France a montré que 50 % des individus revenant de pays tropicaux avaient acquis durant leur séjour à l'étranger des *E. coli* producteurs de BLSE, ce taux d'acquisition variant de 31 % chez les individus revenant d'Amérique Latine à 72 % chez ceux de retour d'Asie [38]. La probabilité d'être colonisé dépendrait du taux de portage dans le pays visité, de la prise d'antibiotiques durant le séjour, de la durée du séjour, du degré d'hygiène, de la nourriture et de la qualité de l'eau de boisson. Ce portage serait alors de quelques semaines pour un individu en bonne santé, et augmenterait en cas de diarrhée ou de prise d'antibiotiques pendant le séjour [37, 38].

La réussite épidémiologique de ces *E. coli* producteurs de BLSE est à rapprocher de celle des enzymes de la famille CTX-M, qui a largement supplanté les autres familles de BLSE en vingt ans. Les allèles CTX-M représentent 90 % des allèles présents dans les *E. coli* producteurs de

BLSE en situation commensale. Il semblerait que l'allèle CTX-M-15 prédomine dans le monde entier, excepté dans le Pacifique Ouest où CTX-M-14 continue à être l'allèle dominant [37]. L'allèle CTX-M-15 s'est établi dans des souches du groupe clonal ST 131, qui appartient au sous-groupe I du groupe phylogénétique B2 et est très adapté au tube digestif de l'Homme. Cette acquisition s'est faite par le biais du plasmide IncF, inféodé à l'espèce *E. coli*. La captation de ce gène codant pour une BLSE a permis au ST 131 responsable de nombreuses infections extra-intestinales de résister aux traitements à base de céphalosporines de dernières générations [39, 40]. Ce clone à la fois pathogène et résistant à des antibiotiques, critique pour la santé humaine, a été isolé en situation commensale chez des individus en bonne santé dans de nombreux pays est aujourd'hui à l'origine d'une pandémie face à laquelle nous sommes de plus en plus démunis.

7. Conclusion

De par la répartition ubiquitaire, la diversité génotypique immense et le caractère de pathogène versatile, il est difficile de décrire de manière exhaustive en quelques pages l'ensemble des bactéries qui se regroupent sous l'étiquette d'*E. coli*. Bien qu'elle soit le modèle bactérien le plus étudié aujourd'hui, nous sommes loin de tout connaître sur cette bactérie qui fait régulièrement l'actualité de par les toxico-infections alimentaires qu'elle provoque ou l'émergence de clones résistants à l'échelle mondiale. L'émergence et la persistance de la résistance dans un milieu aussi complexe que le microbiote intestinal dépend de nombreux facteurs encore peu étudiés dont les traits propres aux bactéries concernées, comme la valeur sélective, le système immunitaire de l'hôte, et des facteurs écologiques locaux. Avec l'avènement des nouvelles méthodes de séquençage haut débit, l'étude du rôle du microbiote intestinal dans l'émergence de la résistance va passer à une vitesse supérieure. A l'heure où, quel que soit le domaine, la médecine ne peut plus se passer des antibiotiques, il est important d'observer les populations commensales d'*E. coli*, et plus largement le microbiote, avec lequel elles interagissent, pour détecter de manière précoce l'émergence de nouvelles résistances. Cela nous aidera à anticiper et prévenir d'autres pandémies de germes à la fois pathogènes et antibiorésistants. L'étude de cette bactérie est donc plus que jamais d'actualité.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec le contenu de cet article.

Références

- [1] Penders J, Thijs C, Vink C, et al., Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006;118(2): 511-21.
- [2] Tenailon O, Skurnik D, Picard B, et al., The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol* 2010;8(3):207-17.
- [3] Gordon DM, Cowling A, The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol. Read. Engl* 2003;149(12):3575-86.

- [4] Abraham S, Gordon DM, Chin J, et al., Molecular characterization of commensal *Escherichia coli* adapted to different compartments of the porcine gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol* 2012;78(19):6799-8003.
- [5] Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, et al., Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(19):7427-32.
- [6] Rang CU, Licht TR, Midtvedt T, et al., Estimation of Growth Rates of *Escherichia coli* BJ4 in Streptomycin-Treated and Previously Germfree Mice by In Situ rRNA Hybridization. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 1999;6(3):434-36.

- [7] Macpherson AJ, Uhr T, Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303(5664): 1662–65.
- [8] Breton J, Tonnou N, Lucas N, et al., Gut Commensal *E. coli* Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-induced Bacterial Growth. *Cell Metab* 2016; 23, (2):324–34.
- [9] Llévin V, Peiffer I, Hudault S, et al., Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000;47(5):646–52.
- [10] Van Donsel DJ, Geldreich EE, Relationships of salmonellae to fecal coliforms in bottom sediments. *Water Res* 1971;5(11):1079–87.
- [11] Savageau MA, *Escherichia coli* Habitats, Cell Types, and Molecular Mechanisms of Gene Control. *Am. Nat* 1983;122(6):732–44.
- [12] Berthe T, Ratajczak M, Clermont O, et al., Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Appl. Environ. Microbiol* 2013;79(15):4684–93.
- [13] Touchon M, Hoede C, Tenailon O, et al., Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 2009;5(1):e1000344.
- [14] Ochman H, Selander RK, Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol* 1984;157(2):690–93.
- [15] Selander RK, Levin BR, Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 1980;210(4469):545–47.
- [16] Chaudhuri RR, Henderson IR, The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect. Genet. Evol* 2012;12(2):214–26.
- [17] Jauregui F, Landraud L, Passet V, et al., Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 2008;9:560.
- [18] Clermont O, Christenson JK, Denamur E, et al., The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep* 2013;5(1):58–65.
- [19] Ochman H, Wilson AC, Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol* 1987;26(1–2): 74–86.
- [20] Lecointre G, Rachdi L, Daru P, et al., *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol. Biol. Evol* 1998;15(12):1685–95.
- [21] Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, et al., A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol* 2004;21(6):1085–94.
- [22] Johnson JR, Murray AC, Kuskowski MA, et al., Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg. Infect. Dis* 2005;11(1):141–45.
- [23] Clermont O, Gordon DM, Brisse S, et al., Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ. Microbiol* 2011;13(9):2468–77.
- [24] Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH, Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am* 2007;45(8): 1025–29.
- [25] Bleaszewska M, Melmann A, Zhang W, et al., Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis* 2011;11(9):671–76.
- [26] Sears HJ, Janes H, Saloum R, et al., Persistence of individual strains of *Escherichia coli* in man and dog under varying conditions. *J. Bacteriol* 1956;71(3):370–72.
- [27] Schlager TA, Hendley JO, Bell AL, et al., Clonal diversity of *Escherichia coli* colonizing stools and urinary tracts of young girls. *Infect. Immun* 2002;70(3):1225–29.
- [28] Smati M, Clermont O, Bleibtreu A, et al., Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen* 2015;4(4):604–15.
- [29] Arumugam M, Raes J, Peletier E, et al., Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473(7346):174–80.
- [30] Dlard M, Garry L, Selva M, et al., Pathogenicity-associated islands in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* are fitness elements involved in intestinal colonization. *J. Bacteriol* 2010;192(19):4885–93.
- [31] Smati M, Clermont O, Le Gal F, et al., Real-time PCR for quantitative analysis of human commensal *Escherichia coli* populations reveals a high frequency of subdominant phylogroups. *Appl. Environ. Microbiol* 2013;79(16):5005–12.
- [32] Skurnik D, Bonnet D, Bernède-Bauduin C, et al., Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environment. *Environ. Microbiol* 2008;10(8):2132–37.
- [33] Bettelheim KA, Cooke EM, O'Farrell S, et al., The effect of diet on intestinal *Escherichia coli*. *J. Hyg. (Lond.)* 1977;79(1):43–45.
- [34] Massot M, Daublé AS, Clermont O, et al., Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiol. Read. Engl* 2016;162(4):642–50.
- [35] Carlet J, The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2012;1(1):39.
- [36] Sommer MOA, Church GM, Dantas G, The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence* 2010;1(4):299–303.
- [37] Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, et al., Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev* 2013;26(4): 744–58.
- [38] Ruppé E, Armand-Lefèvre L, Estellat C, et al., High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clin. Infect. Dis.* 2015;61(4):593–600.
- [39] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guilbault V, et al., Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother* 2008;61(2):273–81.
- [40] Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, et al., The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. *PLoS One* 2012;7(9): e46547.

Titre : Étude de la dynamique temporelle du microbiote digestif des bovins domestiques pour la compréhension du portage de clones d'*Escherichia coli* pathogènes et résistants aux antibiotiques

Résumé : Les usages antibiotiques chez les bovins domestiques combinés à l'immense diversité et plasticité génomique de l'espèce *Escherichia coli* multiplient les contextes favorables à l'émergence au sein du microbiote digestif bovin de souches productrices de toxines de Shiga (STEC) et de souches résistantes aux antibiotiques. Cependant, la grande variété des systèmes d'élevage complique notre compréhension du risque sanitaire global que ces populations bactériennes représentent. Dans ce travail, nous avons eu recours à deux modèles bovins pour comprendre le contexte écologique et génomique de la dynamique de portage fécal des STEC et des souches d'*E. coli* résistantes aux antibiotiques au sein de leur réservoir.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux populations commensales d'*E. coli* de vaches adultes en l'absence d'exposition antibiotique, dans une zone rurale au Zimbabwe, où l'impact des activités humaines sur le microbiote intestinal des bovins était aussi faible que possible. Nous avons mis en évidence des populations commensales d'*E. coli* multiclones et spécifiques de leur hôte, avec un taux de rotation des clones dominants similaire entre les vaches et une taille de population stable sur une courte période de temps. Des STEC et des clones résistants aux antibiotiques ont été détectés de manière transitoire. Dans un second temps, nous avons étudié le microbiote fécal de veaux de boucherie en élevage intensif dans des fermes d'engraissement en Bretagne. Dès leur plus jeune âge, ces veaux reçoivent par voie orale, et sur de longues périodes, des traitements antibiotiques polychimiques. Dans une première étude, nous avons mis en évidence une transformation de leur microbiote fécal, avec une augmentation de la diversité intra-veau au cours de l'engraissement et un phénomène de convergence accélérée lors du premier mois. Un effet des antibiotiques a été observé sur la diversité intra-veau mais était limité dans le temps, ce qui suggère une résilience forte du microbiote fécal aux antibiotiques. Chez ces veaux, la taille de la population d'*E. coli* était impactée par la dose de lactose et atteignait un maximum lors du deuxième mois de l'engraissement, avec une influence des antibiotiques sur sa dynamique temporelle. Dans une seconde étude, nous avons montré que les veaux étaient colonisés par divers clones d'*E. coli* producteurs de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et multi-résistants, dont la persistance du portage semblait liée à l'antibiothérapie au début de l'engraissement et à leur capacité de diffusion au sein d'une ferme.

Les résultats de ces travaux montrent l'existence de plusieurs dynamiques des populations commensales bactériennes à différents niveaux de granularité. L'exposition prolongée aux antibiotiques des veaux de boucherie en début d'engraissement suivie d'une expansion de la niche écologique des *E. coli* commensaux a induit une colonisation massive et persistante de celle-ci par des clones producteurs de BLSE. Des clones STEC multi-résistants et producteurs de BLSE ont été retrouvés chez les veaux de boucherie. L'un de ces clones est un pathovar hybride émergent, responsable de syndromes hémolytiques et urémiques associés à des septicémies chez l'homme.

Mots clefs : bovin, microbiote fécal, *Escherichia coli* commensaux, résistance aux antibiotiques, *E. coli* producteurs de toxines de Shiga