



HAL
open science

Etude de l'impact de contaminants chimiques alimentaires sur le microbiote intestinal humain.

Clemence Defois

► **To cite this version:**

Clemence Defois. Etude de l'impact de contaminants chimiques alimentaires sur le microbiote intestinal humain.. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS007 . tel-01887087

HAL Id: tel-01887087

<https://theses.hal.science/tel-01887087>

Submitted on 3 Oct 2018

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.

Année : 2017

N° d'ordre :

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Ecologie microbienne, Environnement et Santé**

Soutenue le 08 Décembre 2017 par

Clémence DEFOIS

**Etude de l'impact de contaminants chimiques alimentaires
sur le microbiote intestinal humain**

- Rapporteurs** Muriel MERCIER-BONIN, Chargé de Recherche, Toxalim UMR INRA 1331, Toulouse
Robert DURAN, Professeur des Universités, UMR CNRS 5254 IPREM, Université de Pau et des pays de l'Adour, Pau
- Examineurs** Marion LECLERC, Chargé de Recherche, UMR 1319 MICALIS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas
Hubert VIDAL, Directeur de Recherche, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Charles Mérieux Medical School, Oullins
Pascale MOSONI, Chargé de Recherche, UMR 454 MEDIS, Université Clermont Auvergne, INRA, Saint-Genès-Champanelle
- Invité** Erwan ENGEL, Directeur de Recherche, UR 370 QuaPA, INRA, Saint-Genès-Champanelle
- Directeur** Pierre PEYRET, Professeur des Universités, UMR 454 MEDIS, Université Clermont Auvergne, INRA, Clermont-Ferrand

UMR 454 Microbiologie, Environnement **DI**gestif et Santé, UCA, INRA

28 Place Henri Dunant 63000 Clermont-Ferrand

Année : 2017

N° d'ordre :

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Ecologie microbienne, Environnement et Santé**

Soutenue le 08 Décembre 2017 par

Clémence DEFOIS

**Etude de l'impact de contaminants chimiques alimentaires
sur le microbiote intestinal humain**

- Rapporteurs** Muriel MERCIER-BONIN, Chargé de Recherche, Toxalim UMR INRA 1331, Toulouse
Robert DURAN, Professeur des Universités, UMR CNRS 5254 IPREM, Université de Pau et des pays de l'Adour, Pau
- Examineurs** Marion LECLERC, Chargé de Recherche, UMR 1319 MICALIS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas
Hubert VIDAL, Directeur de Recherche, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Charles Mérieux Medical School, Oullins
Pascale MOSONI, Chargé de Recherche, UMR 454 MEDIS, Université Clermont Auvergne, INRA, Saint-Genès-Champanelle
- Invité** Erwan ENGEL, Directeur de Recherche, UR 370 QuaPA, INRA, Saint-Genès-Champanelle
- Directeur** Pierre PEYRET, Professeur des Universités, UMR 454 MEDIS, Université Clermont Auvergne, INRA, Clermont-Ferrand

UMR 454 Microbiologie, Environnement **DI**gestif et Santé, UCA, INRA

28 Place Henri Dunant 63000 Clermont-Ferrand

REMERCIEMENTS

Ces 3 années ne peuvent se finir sans remercier les personnes qui ont participé à l'élaboration ainsi qu'au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie le Professeur Pierre Peyret sans qui ces quelques lignes n'auraient jamais vu le jour. Merci de m'avoir fait confiance pour soutenir ce projet, merci pour vos conseils et surtout pour votre immense disponibilité. Il sera difficile de faire de plus « grandes » découvertes culinaires que celles que vous nous proposiez à vos retours de voyages.

Je tiens à remercier Monique Alric, directrice du laboratoire durant la plus grande partie de ma thèse, pour les discussions que nous avons pu partager. Merci pour votre énergie, votre enthousiasme et pour l'oreille attentive que vous portez aux étudiants.

Je remercie tous les permanents du laboratoire pour avoir participé de près ou de loin à mon projet, répondu à mes questionnements. Merci pour votre bonne humeur ainsi que pour les mots échangés entre le RDC et le 5^{ème} étage au détour d'un café, d'un repas ou même d'une paillasse. Le rire est contagieux et permet bien souvent d'aider les autres à surmonter leurs moments difficiles.

Merci donc à Sandrine Chalancon, Sylvain Denis, Eric Peyretailade, Jean-François Brugère, Stéphanie Blanquet-Diot, Eric Bessac, Ghislain Garrait, Emmanuelle Lainé, Suenia Lacerda et Jean Michel Cardot. Merci également à Delphine Boucher, Jean-François Jarrige, Pascale Mosoni et tout dernièrement l'excellente Lucie Etienne-Mesmin, partis ou arrivés dans notre équipe au cours de ma thèse. Je te souhaite, Lucie, une très belle carrière au sein de MEDIS, j'espère que l'on sera amenées à se revoir. Merci encore pour tes relectures de manuscrit « chrono express ». Une efficacité digne des meilleurs ;) Malheureusement, le temps aura manqué (en dehors de jolis swing au golf) pour faire plus amples connaissances avec nos nouveaux collègues Champanellois.

Un merci particulier à Erwan Engel et Jérémy Ratel, de l'équipe MASS de l'INRA de Theix, pour cette coopération qui aura menée à de jolis travaux réalisés dans le domaine de la volatolomique.

Je remercie particulièrement les doctorants qui se sont succédés au laboratoire pour les moments que l'on a pu passer ensemble. Merci à Nicolas Parisot, Céline Ribière, Charlotte Cordonnier, Jonathan Thévenot, Mickael Fleury, Nadia Gaci, Cyrielle Gasc, Hassana Hsein, Kevin Gravouil, Charlène Roussel, Raphaële Gresse et Ali Begag. Kevin, Charlène, Raphaële et Ali, je vous souhaite le meilleur pour votre thèse, à Clermont ou sous d'autres contrées, en espérant qu'elle se finisse aussi bien, voire mieux, qu'elle n'ait commencée ! Merci également aux nombreux stagiaires et particulièrement à Nicolas Gallois et Camille Forest.

Un laboratoire ne serait rien sans toutes les personnes qui arrivent et s'en vont au grès des contrats de recherche. Toutes ces personnes ont également contribué de près ou de loin à mon travail au sein du laboratoire, ou à un moment partagé ensemble en dehors (généralement autour de bons petits plats...). Merci à Bérénice Batut, Cédric Bernarde, Sofiane Omari, Rocio Reina, Olivier Le Goff, Prem Prashant Chaudhary, Marie-Edith Arnal, Emilie Gersens, Caroline Soulard, Cécile Verdier, Pauline Herviou et tout particulièrement Réjane Beugnot. Merci Réjane pour tout ce que tu m'as apporté tant scientifiquement qu'humainement. Il doit bien rester encore quelques bonnes tables Clermontoises que nous n'avons pas eu l'occasion d'essayer ;)

Le tour du laboratoire se termine avec Manon Martinet. Merci Manon pour l'aide administrative mais pas que... Toujours là pour une pause-café si besoin. J'espère que tes projets d'avenir se concrétiseront (avec un Brivadois je n'en doute pas!). Nous aurons une date en commun maintenant :p 08.12.17

Un immense merci à mes plus proches amies, qui, malgré la distance qui nous sépare, sont toujours à mes côtés. Depuis l'IUT ou le Master nous avons partagé beaucoup de moments inoubliables. Merci Auriane (Ex Marseillaise revenue aux sources volcaniques), Cindy (Lyonnaise), Mathou (Toulousaine) et Boubou (Neversoise) pour tout ce que l'on a pu partager ensemble et que l'on partagera encore. Quid d'un prochain mariage ?? (Je n'ose pas aller plus loin dans les perspectives !)

Je voudrais tout naturellement remercier ma famille pour leur simple présence. Mes proches sont une bouffée d'air frais, un lien inébranlable, un retour à l'enfance.

Enfin je voudrais avoir mon dernier mot pour celui qui a toujours été là pour moi dans les moments joyeux comme les moments de doutes. Toujours un mot, un geste, une surprise pour me rendre le sourire. Merci mille fois de ton soutien depuis ces 7 années mais tout particulièrement pour ces 3 dernières années.

A vous tous qui égayez ma vie je vous remercie d'être là. Une vie ne vaut pas d'être vécue sans partage, sans être entouré des gens que l'on aime. Même si je ne le dis pas souvent sachez que je vous aime.

"N'oublie jamais de sourire, car le jour où tu ne souris pas, sera un jour perdu."

-Charles Chaplin-

RESUME

L'exposition aux polluants environnementaux a été associée à de nombreux désordres métaboliques, immunitaires et reproductifs ainsi qu'à divers cancers. De plus en plus de travaux, indiquent que le microbiote intestinal, qui joue un rôle majeur dans l'immunité et le métabolisme de l'hôte, interagit avec les xénobiotiques dont les polluants organiques persistants (POPs) et les contaminants néoformés dans les aliments. Cette interaction peut avoir des conséquences toxicologiques importantes *via* la modification des fonctions du microbiote intestinal mais également *via* la métabolisation des xénobiotiques, entraînant une potentielle altération de l'homéostasie de l'hôte. Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré, en modèle *in vitro*, qu'une exposition aiguë du microbiote intestinal humain au benzo[*a*]pyrène (hydrocarbure aromatique polycyclique) a entraîné une altération des fonctions du microbiote intestinal au niveau du volatolome et du métatranscriptome microbien. Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucun impact sur la structure microbienne n'a été observé. L'Homme étant continuellement exposé à un panel de composés chimiques environnementaux, nous avons par la suite étudié l'impact de divers POPs et produits néoformés dans les aliments sur le microbiote intestinal humain. Des familles de gènes ainsi que des composés volatiles microbiens ont été identifiés comme altérés après l'exposition, conduisant à une perturbation de l'activité microbienne. Nous avons finalement démontré que l'interaction microbiote-polluant pourrait conduire à l'établissement d'un état pro-inflammatoire modéré dans l'intestin avec une libération de cytokine IL-8 par les cellules épithéliales intestinales. Ces résultats appuient le concept émergent selon lequel les contaminants alimentaires pourraient altérer les activités du microbiote intestinal.

ABSTRACT

Exposure to environmental pollutants has been associated with various life-threatening disorders, including dysregulation of the immune and reproductive systems, metabolic diseases and various cancers. Growing evidences indicate that the gut microbiota, which plays major roles in host metabolic and immune functions, interacts with xenobiotics including persistent organic pollutants (POPs) and foodborne chemicals. The toxicological relevance of the gut microbiota-pollutant interplay is of great concern for the host since the chemicals may disrupt the gut microbiota functions leading to a potential impairment of the host homeostasis. During this PhD thesis, we demonstrated that *in vitro* acute exposure of the human gut microbiota with benzo[*a*]pyrene (polycyclic aromatic hydrocarbon) led to an impairment of the gut microbiota functions with a specific shift of the microbial volatolome and metatranscriptome. However, in our experimental conditions, no impact on the microbial structure was observed. Since humans are exposed to a wide range of environmental chemicals we investigated the impact of various POPs and foodborne chemicals on the human gut microbiota. We identified microbial volatiles and gene families that shifted after this exposure leading to an imbalance of the microbial activity. Furthermore, we demonstrated that the interaction between the pollutants and the gut microbiota lead to a significant release of pro-inflammatory IL-8 cytokine by the intestinal epithelial cells which may contribute to the establishment of a low-grade inflammatory state in the gut. All together, these data support the emerging concept that food pollutants could alter the gut microbiota activities.

ABREVIATIONS

Ne sont répertoriées que les abréviations fréquemment employées dans le manuscrit. Celles employées une seule fois sont explicitées dans le texte uniquement.

A

AGCC : acides gras à chaîne courte

AH : amine hétérocyclique

AhR : récepteur des hydrocarbures arylés

AIEC : *Escherichia coli* adhérentes et invasives

AJE : apport journalier estimé

AJMT : apport journalier maximum théorique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ATSDR : agence pour le registre des substances toxiques et maladies

C

CAR : constitutive androstane receptor

CAZymes : carbohydate active enzymes

CCR : cancer colorectal

CIRC : centre international de recherche sur le cancer

CONTAM : opinion scientifique des contaminants de la chaîne alimentaire

D

DDD : dichlorodiphényl-dichlorophényléthane

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DJT : dose journalière tolérable

DMTP : dose mensuelle tolérable provisoire

E

EAT : étude alimentaire totale

EFSA : l'autorité européenne de sécurité des aliments

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

F

FISH : fluorescence *in situ* hybridization

H

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

HBCD : hexabromocyclododécane

HGC : high gene count

HMP : human microbiome project

I

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

L

LMR : limite maximale de résidus

LT : lymphocyte T

LTreg : lymphocyte T régulateur

M

MAMP : microbe-associated molecular pattern

MC : maladie de Crohn

MetaHIT : metagenomics of the human intestinal tract

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

N

NGS : next generation sequencing

O

OMS : organisation mondiale pour la santé

P

PBB : polybromobiphényle

PBDE : polybromodiphényléther

PCB : polychlorobiphényle

PCB-DL : polychlorobiphényle de type « dioxine-like »

PCDD : polychlorée dibenzo-*p*-dioxine

PCDF : polychloré dibenzofurane

PhIP : 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo (4,5-b) pyridine

POP : polluant organique persistant

PRR : pattern recognition receptor

PXR : pregnane X receptor

Q

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

R

RCH : rectocolite hémorragique

RFB : retardateur de flammes bromé

S

SCF : comité scientifique de l'alimentation humaine

SHIME : simulator of the human intestinal microbial ecosystem

SI : système immunitaire

SII : syndrome de l'intestin irritable

SIP : stable isotope probing

SM : spectrométrie de masse

SNC : système nerveux central

T

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine

TEQ : toxic equivalency

TGI : tractus gastro-intestinal

TIM : TNO gastro intestinal tract model

TMA : triméthylamine

TMAO : triméthylamine-N-oxyde

U

UE : union européenne

US-EPA : agence de protection environnementale américaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentatif des fractions bioaccessibles et biodisponibles.

Figure 2 : Schéma représentatif du métabolisme intestinal et hépatique (voie entéro-hépatique) des xénobiotiques.

Figure 3 : Métabolisation du B[a]P en diol-époxyde par les enzymes de l'hôte.

Figure 4 : Domaine de liaison du ligand au récepteur AhR de l'Homme et des autres primates (substitution d'un acide aminé).

Figure 5 : Graphe représentant le nombre de publications issues de PubMed au 27.08.17 comprenant les termes: « intestinal microbiota ou gut microbiota ou intestinal flora ou gut flora ou intestinal microflora ou gut microflora ou gut microbiome ou intestinal microbiome » depuis 1914.

Figure 6 : Hétérogénéité spatiale du microbiote intestinal le long du tractus digestif.

Figure 7 : Structure du microbiote intestinal humain.

Figure 8 : Concept du « core » microbiome et du microbiome variable chez l'Homme.

Figure 9 : Différences phylogénétiques entre les trois entérotypes *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*.

Figure 10 : Colonisation du microbiote intestinal chez l'enfant.

Figure 11 : Facteurs majeurs influençant la composition du microbiote intestinal humain.

Figure 12 : Régions hypervariables du gène exprimant l'ARNr 16S.

Figure 13 : Plateformes NGS introduites depuis les années 2000.

Figure 14 : Implication du microbiote intestinal dans de nombreuses fonctions nutritionnelles, physiologiques, immunitaires et neurologiques chez l'Homme.

Figure 15 : Voies métaboliques impliquées dans la production des métabolites microbiens majeurs issus de la fermentation des glucides.

Figure 16 : Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie du TGI.

Figure 17 : Maturation du SI par le microbiote intestinal.

Figure 18 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du système digestif artificiel TIM-1 (estomac et intestin grêle artificiels).

Figure 19 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du fermenteur continue ECSIM.

Figure 20 : Formation d'un organoïde à partir de cellules souches intestinales.

Figure 21 : Graphe représentant le nombre de publications issues de PubMed au 31.12.2016 depuis les 10 dernières années, comprenant les termes « intestinal microbiota » associés à diverses pathologies humaines.

Figure 22 : Impact des polluants environnementaux sur le microbiote intestinal et conséquences sur l'hôte.

Figure 23 : A. Méthodes ciblant les processus cellulaires de cellules microbiennes « actives ».

Figure 24 : Principe général de la méthode de marquage isotopique (SIP).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux contaminants chimiques retrouvés dans l'alimentation.

Tableau 2 : Techniques haut débit utilisées pour caractériser le microbiote intestinal.

Tableau 3 : Comparaison des paramètres techniques de différents systèmes *in vitro* du TGI.

Tableau 4 : Pathologies humaines et dysbioses du microbiote intestinal.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Contaminants Chimiques dans les Aliments	6
1.1. Principales familles et caractéristiques générales	7
1.1.1. Les dioxines	7
1.1.2. Les polychlorobiphényles (PCBs)	8
1.1.3. Les retardateurs de flammes bromés (RFBs)	10
1.1.4. Les pesticides.....	11
1.1.5. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	13
1.1.6. Les amines hétérocycliques (AHs).....	15
1.2. Toxicité et métabolisation des xénobiotiques chez l'Homme	16
1.2.1. Notions de bioaccessibilité et biodisponibilité	16
1.2.2. Le cycle entéro-hépatique.....	17
1.2.3. Récepteur des hydrocarbures arylés (AhR) et toxicité	18
1.3. Implication des communautés microbiennes dans la biodégradation des POPs....	19
1.3.1. Microorganismes de l'environnement	19
1.3.2. Microorganismes commensaux de l'Homme	21
2. Le Microbiote Intestinal Humain	22
2.1. Le microbiote intestinal humain au cours de la vie	22
2.1.1. Exploration du microbiote intestinal humain	22
2.1.2. Acquisition et stabilisation des communautés microbiennes	25
2.1.3. Facteurs influençant la structure du microbiote	27
2.2. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal	28
2.2.1. Analyses de la structure du microbiote.....	28
2.2.2. Analyses des fonctions du microbiote	33

2.3.	Fonctions du microbiote intestinal.....	36
2.3.1.	Fonctions métaboliques liées à la nutrition	37
2.3.2.	Maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale	39
2.3.3.	Développement et maturation du système immunitaire	41
2.3.4.	Protection contre les microorganismes pathogènes.....	43
2.4.	Modèles d'étude du microbiote intestinal et de l'interaction microbiote-hôte	44
2.4.1.	Modèles <i>in vivo</i> , <i>ex-vivo</i>	44
2.4.2.	Modèles <i>in vitro</i>	46
3.	Microbiote Intestinal et Pathologies Humaines.....	48
3.1.	Pathologies digestives.....	49
3.2.	Pathologies extra-digestives.....	52
3.2.1.	Dysfonctionnements immunitaires	52
3.2.2.	Les maladies métaboliques.....	53
3.2.3.	Les pathologies cardio-vasculaires.....	54
3.2.4.	Les troubles neurologiques et/ou comportementaux	54
3.3.	Interaction polluant-microbiote et pathologies humaines.....	56
CHAPITRE 2 : TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....		59
1.	Impact du B[a]P sur la structure et les fonctions du microbiote intestinal humain.....	61
1.1.	Introduction à la publication n°1.....	61
1.2.	Principaux résultats obtenus	62
1.3.	Article n°1 : “ Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human Gut Microbiota. ”	63
1.4.	Conclusion et perspectives.....	82
2.	Impact de polluants chimiques alimentaires sur l'activité du microbiote intestinal humain et potentielles perturbations de l'homéostasie intestinale	84
2.1.	Introduction à la publication n°2.....	84
2.2.	Principaux résultats obtenus	85

2.3. Article n°2 : “ Persistent Organic Pollutants and Foodborne Chemicals Induce Changes of the Human Gut Microbiota Activity with Potential Impact on the Gut Homeostasis ”	86
2.4. Conclusion et perspectives	131
CONCLUSION GENERALE	132
DISCUSSION & PERSPECTIVES	135
1. Modèles d’étude de l’interaction polluant-microbiote intestinal.....	136
1.1. Les modèles <i>in vitro</i>	136
1.2. Les modèles <i>in vivo</i>	137
1.3. Quels microbiotes intestinaux ?	138
2. Outils pour l’étude de l’interaction polluant-microbiote intestinal.....	140
2.1. Etude de la structure des communautés microbiennes.....	140
2.2. Etude des fonctions des communautés microbiennes	142
3. Approches thérapeutiques	144
REFERENCES	145
ANNEXES.....	164

INTRODUCTION GENERALE

L'industrialisation des sociétés a conduit à une production de plus en plus importante d'une grande diversité de molécules chimiques potentiellement toxiques, déversées accidentellement ou non dans l'environnement. Depuis les années 30, un lien entre la pollution atmosphérique et des désordres des voies respiratoires a été établi menant rapidement au développement de méthodes de mesure de la pollution de l'air (AGN, 1930; Chauhan and Johnston, 2003; Meller, 1930). Ce n'est qu'au début des années 50, que les premiers rapports scientifiques sur la contamination chimique des aliments sont apparus. L'exposition humaine aux contaminants alimentaires est ainsi devenue un problème majeur de santé publique avec un essor important des recherches effectuées dans ce domaine depuis les années 2000. Malgré l'interdiction de la production de certains composés avérés toxiques pour l'Homme, leur persistance dans les environnements (eau, sol, air) conduit à une accumulation de ces composés dans les organismes. Les scandales sanitaires récurrents, liés à la contamination de denrées alimentaires, mettent en évidence les relations étroites entre l'Homme et son environnement. Encore très récemment, au mois d'Août 2017, des œufs ont été contaminés au fipronil (insecticide) à des concentrations supérieures aux limites maximales de résidus. Les autorités sanitaires européennes estiment que les œufs contaminés ont été distribués dans au moins 45 pays dont 25 pays de l'Union Européenne. Ces contaminants chimiques (incluant les composés néoformés par la transformation des aliments) ont été mis en cause dans de nombreuses pathologies métaboliques, reproductives, immunitaires et neurologiques ainsi que dans des troubles du comportement. Initié en 2015, le projet TENDR (Targeting Environmental Neuro-Developmental Risks) est issu d'un partenariat de chercheurs et de professionnels de santé dont la collaboration a pour origine des observations inquiétantes de liens potentiels portant sur les substances chimiques toxiques présentes dans l'environnement associées à des troubles neuro-développementaux comme les troubles du spectre autistique, les déficits d'attention, l'hyperactivité, la déficience intellectuelle et les troubles de l'apprentissage (TENDR Project, 2016). De nombreux autres liens ont également été établis entre l'exposition à des polluants environnementaux et la formation de cancers.

Le corps humain est habité par un très grand nombre de microorganismes et le tractus digestif, en particulier l'intestin, est le compartiment le plus densément peuplé. Cette communauté microbienne intestinale, communément appelée microbiote intestinal, est composée majoritairement par des bactéries et a co-évolué avec son hôte pour établir une relation symbiotique généralement mutuellement bénéfique. Au cours de ces dix dernières

années, la caractérisation du microbiote intestinal, au travers de la mise en évidence d'une importante diversité associée à des abondances très variables des populations qui le composent et de leurs fonctions associées, a été rendue possible par l'avènement des outils moléculaires à haut-débit. De nombreuses études ont montré que des perturbations dans la composition et les fonctions de la communauté microbienne ont notamment été associées à des pathologies digestives et extra-digestives souvent caractérisées par des processus inflammatoires chroniques. Ces perturbations du microbiote intestinal, appelées dysbioses, peuvent être mises en relation avec des déterminismes génétiques de l'hôte, des différences individuelles de structure des microbiotes ayant des origines diverses comme nous le présenterons par la suite ou des paramètres environnementaux tels que les contaminants chimiques alimentaires. En retour, le microbiote intestinal a démontré sa capacité à métaboliser certaines familles de composés chimiques menant à une modulation de la toxicité de ces composés pour l'hôte. Ainsi, il existe un ensemble d'éléments suggérant que le microbiote intestinal est un acteur majeur, mais encore sous-estimé, qui doit être considéré pour évaluer pleinement la toxicité des contaminants environnementaux chez l'Homme.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de cette thèse, dont l'objectif est d'étudier les potentielles perturbations du microbiote intestinal humain, induites par l'exposition à différentes classes de polluants environnementaux ou néoformés par la transformation des aliments.

La première partie de manuscrit aura pour objectif de replacer le contexte scientifique de ces travaux de thèse au travers d'une synthèse bibliographique. Cette première partie se découpera en trois chapitres consacrés aux contaminants chimiques dans les aliments, à la description du microbiote intestinal et aux pathologies humaines associées à des perturbations de ce dernier. La seconde partie de ce manuscrit exposera et commentera les travaux effectués au cours de cette thèse. Le premier objectif de ce travail visait à étudier l'impact du benzo[*a*]pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique, sur le microbiote intestinal humain en système *in vitro*. Le second objectif de ce travail portera sur l'impact de six grandes classes de contaminants chimiques alimentaires sur le microbiote intestinal humain en système *in vitro* et les effets de cette interaction (en particulier l'étude des produits du métabolisme microbien suite à l'exposition aux polluants) sur l'hôte. Les contaminants inclus dans ce travail sont représentatifs des principales familles couramment retrouvées dans les aliments : les dioxines, les retardateurs de flammes bromés, les pesticides, les hydrocarbures

aromatiques polycycliques et les amines hétérocycliques. Enfin, une conclusion générale et des perspectives à l'ensemble de ces travaux seront proposées.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Contaminants Chimiques dans les Aliments

Les aliments nous procurent les apports énergétiques et nutritionnels (protéines, glucides, lipides, minéraux et vitamines) nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, ils sont également les vecteurs de composés potentiellement toxiques qui seront ainsi transportés au niveau du tractus digestif de l'hôte. L'Homme est ainsi exposé *via* son alimentation à de nombreux contaminants chimiques indésirables (non ajoutés intentionnellement) tels que les composés inorganiques, les toxines, les polluants environnementaux (dont les polluants organiques persistants (POPs)) et les composés néoformés par la transformation des aliments (EFSA, 2012a; Silano and Silano, 2015).

Afin d'évaluer le risque de contamination pour la population, des études alimentaires totales (EAT) sont réalisées afin de rechercher différentes substances susceptibles d'être présentes dans les aliments « tels que consommés ». Ces études permettent ainsi d'éclairer les prises de décision en matière de gestion des risques (contrôle et réglementation), aux niveaux national, européen et international. En 2015, d'après une enquête portée par Santé Canada en coopération avec l'organisation mondiale de la santé (OMS), 53 pays avaient déjà conduit une EAT, les premières études ayant été réalisées dès 1961 aux Etats-Unis (Lee et al., 2015; WHO and WPRO, 2015). En France, une première EAT (EAT1) a été réalisée entre 2000 et 2004 suivie d'une deuxième (EAT2) entre 2006 et 2010. Dans cette dernière étude, plus de 20000 produits alimentaires ont été analysés représentant 212 types d'aliments pour lesquels 445 substances chimiques ont été recherchées (ANSES, 2011a, 2011b). Certains travaux se sont également intéressés à la contribution des étapes de production, de stockage et d'emballage des produits alimentaires industriels dans l'exposition aux contaminants chimiques (Ng and von Goetz, 2017).

Les POPs et les composés néoformés par la transformation des aliments sont fréquemment recherchés et retrouvés dans les études alimentaires. De manière générale, ces études convergent vers le fait que la viande, le poisson, les mollusques et crustacés ainsi que les produits dérivés d'animaux sont des contributeurs majeurs de l'exposition (ANSES, 2011a, 2011b; Domingo, 2017; Fleury et al., 2017). Les dioxines, les polychlorobiphényles (PCBs), les retardateurs de flammes bromés (RFBs), les pesticides et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des composés principalement issus de l'activité humaine. Ils s'accumulent dans les tissus vivants au cours de la production végétale et animale, et se retrouvent, à terme, transférés dans les produits alimentaires. Certains de ces

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux contaminants chimiques retrouvés dans l'alimentation.

Famille	Nom	Structure	Formule	Groupe IARC
Dioxines	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>para</i> -dioxine (TCDD)		$C_{12}H_4Cl_4O_2$	1
PCBs-DL*	2,3,3',4,4'-pentachlorobiphényle (PCB105) 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphényle (PCB156)		$C_{12}H_{10-(n+m)}Cl_{(n+m)}$ $1 < n+m < 10$	2A
PCBs-NDL*	2,2',6-tétrachlorobiphényle (PCB19) 3,3',5-tétrachlorobiphényle (PCB36)			
RFBs	hexabromocyclododécane (HBCD)		$C_{12}H_{18}Br_6$	-
Pesticides pyréthrinoides	deltaméthrine		$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$	3
HAPs	benzo[a]pyrène (B[a]P)		$C_{20}H_{12}$	1
AHs	2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo (4,5-b) pyridine (PhIP)		$C_{13}H_{12}N_4$	2B

La classification IARC classe les composés en quatre groupes : carcinogène pour l'Homme (groupe 1), probablement carcinogène pour l'Homme (groupe 2A), potentiellement carcinogène pour l'Homme (groupe 2B), non classifiable concernant son potentiel carcinogène pour l'Homme (groupe 3), probablement non carcinogène pour l'Homme (groupe 4). * Les quatre PCBs présentés sont des exemples représentatifs des PCBs-DL et PCBs-NDL.

composés peuvent également, dans une moindre mesure, être générés par des processus naturels lors de la dégradation incomplète de la matière organique, tels que les feux de forêts ou le volcanisme. Enfin, les amines hétérocycliques (AHs) et les HAPs peuvent se former au cours des procédés de transformation des aliments, tels que la cuisson ou le fumage.

1.1. Principales familles et caractéristiques générales

1.1.1. Les dioxines

Les dioxines sont des composés organiques chlorés sous-produits indésirables dans un grand nombre de processus thermiques impliquant du chlore, du carbone et de l'oxygène (Tuomisto et al., 2011). Dans les années 60, leur émission était principalement liée aux activités industrielles impliquant la synthèse de dérivés chlorés (pesticides, PCBs et chlorures de polyvinyle (PVCs)) (EFSA, 2015). Depuis la fin des années 80, la production de dioxines résultant de ces activités industrielles a fortement été réduite par l'interdiction de certains produits ainsi que par la modification de certains procédés technologiques. Parmi les émissions accidentelles de dioxines, les usines de production de dérivés chlorés occupaient une place non négligeable. L'exemple de l'incident survenu dans l'usine ICMESA à Seveso en 1976 est le plus connu (WHO, 1998). De nos jours, les principales sources d'émission de dioxines résultent des activités d'incinération des déchets ménagers et hospitaliers, de la métallurgie et des procédés de fabrication de la pâte à papier (Buekens et al., 2001; EFSA, 2012b; Tuomisto et al., 2011)

Les dioxines regroupent 75 polychlorées dibenzo-p-dioxines (PCDDs) et 135 congénères polychlorés dibenzofuranes (PCDFs) apparentés sur le plan structurel et chimique. Cependant, 17 d'entre eux sont considérés comme ayant de potentiels effets néfastes pour l'Homme et les animaux, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-dioxine (TCDD) étant la plus toxique (**Tableau 1**). De ce fait, la toxicité des dioxines est exprimée en facteur d'équivalent toxique par rapport à la toxicité de la TCDD. Ces 17 dioxines comportent au minimum quatre atomes de chlore aux positions 2, 3, 7 et 8 sur le cycle benzène. Le terme dioxine recouvre aussi certains PCBs de type « dioxine-like » (PCBs-DL), dotés de propriétés toxiques similaires (EFSA, 2015).

Plus de 90% de l'exposition de l'Homme aux dioxines provient de l'alimentation. Les aliments les plus contaminés étant la viande, les produits laitiers, le poisson et les crustacés

(Schwarz et al., 2014; US-EPA and IRIS, 2012; WHO, 1998). En 2001, le comité mixte organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (ONUAA)/ OMS a établi une dose mensuelle tolérable provisoire (DMTP) de 70 pg toxic equivalency (TEQ)/kg.poids corporel (pc)/mois soit une dose journalière tolérable (DJT) de 2,3 pg TEQ/kg.pc/jour (FAO and WHO, 2002). La DJT est la dose qu'un individu peut ingérer quotidiennement tout au long de sa vie sans que cela n'engendre d'effet néfaste sur sa santé. L'évaluation de l'exposition alimentaire moyenne aux dioxines de la population française est estimée à 1,8 pg TEQ/kg.pc/j chez les adultes et à 2,8 pg TEQ/kg.pc/j chez les enfants. La DJT de 2,3 pg TEQ/kg.pc/j, en moyenne sur la vie entière, serait dépassée pour 20 à 28% de la population (AFSSA, 2005).

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées chez l'Homme après un relargage accidentel à partir d'unités de production industrielles. Les principaux effets liés à l'exposition à la TCDD ont été des manifestations dermatologiques (chloracnée) et hépatiques (augmentation du volume du foie, élévation transitoire des taux sériques d'enzymes hépatiques) (INERIS, 2006). Cependant, de nombreux désordres de type endocriniens, neurologiques et hépatiques ont été associés à l'exposition à l'Agent Orange (dont la TCDD) lors de la guerre du Vietnam (Yi et al., 2014). En modèle animal, l'exposition à la TCDD engendre des lésions cutanées, hépatiques, des troubles neurologiques ainsi que des perturbations des systèmes reproductifs et immunitaires (Chmill et al., 2010; González-Barbosa et al., 2017; Han et al., 2017; INERIS, 2006; Jacob et al., 2017). La TCDD a été caractérisée comme cancérigène pour l'Homme (groupe 1) par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) (IARC, 2012b). Des études de cancérogenèse chez l'animal montrent que le foie est la principale cible de cancer, mais d'autres sites (thyroïde, poumons, cavité orale) peuvent être également concernés. Cette toxicité est médiée par la liaison de la TCDD au récepteur des hydrocarbures arylés (AhR) (Dragan and Schrenk, 2000; INERIS, 2006). L'implication de ce récepteur dans la toxicité est décrit dans la partie 1.2 « *Récepteur des hydrocarbures arylés (AhR) et toxicité* ».

1.1.2. Les polychlorobiphényles (PCBs)

Les PCBs sont des composés organiques chlorés utilisés par l'industrie sous forme de mélange (l'un des plus connus étant celui vendu aux Etats-Unis sous le nom d'Aroclor), pour

leurs propriétés isolantes (transformateurs électriques) ainsi que leur stabilité chimique et physique (encres, peintures) (EFSA, 2012b; WHO, 2003). Leur production et leur utilisation ont progressivement été réduites au cours des années 70 puis finalement interdites en 1987. Malgré l'arrêt de leur production, les PCBs sont encore distribués dans l'environnement entre autre par le mauvais entretien des décharges, le déversement illégal ou inapproprié de déchets contenant des PCBs et les fuites ou rejets de transformateurs électriques. Les PCBs incluent 209 congénères dont le nombre d'atomes de chlore et leur localisation déterminent les propriétés physico-chimiques du composé. Suivant leurs propriétés structurales et toxicologiques, les PCBs sont répartis en deux groupes: les PCBs-DL comprenant 12 congénères (mécanisme d'action similaire aux dioxines) et les PCBs « non dioxin-like » (PCBs-NDL) (**Tableau 1**) (EFSA, 2012b). L'alimentation constitue la principale voie de contamination de la population générale et les aliments les plus incriminés sont le poisson et la viande ainsi que leurs produits dérivés (Arnich et al., 2009; EFSA, 2010). En 2003, l'OMS a proposé une DJT de 10 ng/kg.pc/j pour l'ensemble des PCBs-NDL. L'évaluation de l'exposition alimentaire moyenne aux PCBs-NDL de la population française est estimée à 8,8 ng/kg.pc/j chez les adultes et à 14,9 ng/kg.pc/j chez les enfants. Un dépassement de la DJT concernerait 58% des enfants et 20% des adultes (AFSSA, 2007). Plus récemment, la DJT des PCBs-NDL a été définie entre 2,71 et 25,7 ng/kg.pc/j (EFSA, 2012b; Sirot et al., 2012).

Les principales études épidémiologiques chez l'Homme ont été réalisées dans le cadre d'une exposition chronique à divers Aroclors. L'agence pour le registre des substances toxiques et maladies (ATSDR) a recensé chez l'Homme, majoritairement des effets hépatotoxiques, des lésions cutanées (chloracnée) ainsi que des problèmes respiratoires (ATSDR, 2014). Certaines perturbations du système reproductif ont également été mises en évidence (Jiang et al., 2017b). En modèle animal, les principaux organes cibles de la toxicité sont le foie, la thyroïde ainsi que le système immunitaire (SI) et la perte de poids est un des marqueurs de l'exposition. Les Aroclors sont mutagènes et cancérigènes avec l'induction notamment de tumeurs hépatiques et d'adénomes thyroïdiens (ATSDR, 2014; Faroon and Ruiz, 2015). Les 12 PCBs-DL présentent le même mécanisme d'action que les dioxines, alors que celui des PCBs-NDL semble lui, indépendant de la liaison au récepteur AhR. Certains mécanismes de narcose (rupture des membranes phospholipidiques) ou de liaison aux récepteurs CAR (constitutive androstane receptor) et PXR (pregnane X receptor) ont été cependant mis en évidence (Gähns et al., 2013; US-EPA, 2003; Viluksela et al., 2012).

1.1.3. Les retardateurs de flammes bromés (RFBs)

Les RFBs sont des composés organiques bromés, qui, de par leurs propriétés ignifuges, sont incorporés dans toute une série de produits pour les rendre moins inflammables. Ils sont couramment utilisés dans les plastiques d'appareils électroniques (ordinateurs, télévisions), dans des mousses et des matériaux de capitonnage (domestiques et industriels), dans des pièces automobiles et d'aviation ainsi que dans certains textiles (ANSES, 2012; EFSA, 2011). Les émissions proviennent des usines de traitement des RFBs mais également des procédés d'usage et de destruction des matériaux ignifugés. Cette famille est divisée en quatre catégories: les polybromodiphényléthers (PBDEs), l'hexabromocyclododécane (HBCD), le tétrabromobisphénol A (TBBPA) et les polybromobiphényles (PBBs). En 2006, sous la directive 2002/95/EC, les PBBs et PBDEs ont été interdits en Europe dans tout équipement électrique et électronique (UE, 2003a). En Mars 2016, l'Union Européenne (UE) publie le règlement n° 2016/293 modifiant le règlement n° 850/2004 concernant les engagements pris par l'UE dans le cadre de la convention de Stockholm sur les POPs afin de mettre en œuvre, l'interdiction de la production, de l'utilisation, de l'importation et de l'exportation de l'HBCD. Cependant, ce règlement est soumis à des dérogations spécifiques notamment pour la production de polystyrène expansé et le polystyrène extrudé dans les bâtiments (UE, 2016).

Du fait de concentrations extrêmes dans certaines matrices alimentaires, l'HBCD est le composé le plus suivi et controversé des RFBs (**Tableau 1**). Chez la volaille, le ratio entre valeurs maximales et valeurs médianes en HBCD dépasse 20000 pour l'œuf et avoisine les 10000 pour le muscle, contrairement aux PBDEs pour lesquels ce ratio est respectivement de 19 et 7 (ANSES, 2012). Là encore, l'alimentation constitue le vecteur majoritaire de contamination pour la population générale (ANSES, 2012; Johnson-Restrepo and Kannan, 2009). Les aliments les plus contaminés par l'HBCD sont le poisson, la charcuterie, les crustacés et mollusques et la viande (ANSES, 2011a; EFSA, 2011). Contrairement à d'autres polluants, les RFBs n'ont pas de DJT établie. Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), les apports journaliers estimés (AJE) en HBCD sont de 0,16-0,21 ng/kg.pc/j en France et de 0,09-0,99 ng/kg.pc/j en Europe (EFSA, 2011). L'HBCD est composé de trois isomères α , β et γ dont l'abondance relative est respectivement de 9-13%, <0.5-12% et 72-90%. L'isomère α étant l'isomère le plus retrouvé dans les matrices alimentaires (Barghi et al., 2016; EFSA, 2011; Schechter et al., 2012).

De nombreuses études en modèle murin montrent que les principales cibles de la toxicité de l'HBCD sont le foie (Bernhard et al., 2016; Huang et al., 2016; Maranghi et al., 2013), la thyroïde (Ema et al., 2008; van der Ven et al., 2006), ainsi que le système nerveux et reproductif (Ema et al., 2008; Mariussen and Fonnum, 2003; Rasinger et al., 2014). La majorité de ces effets sont observables uniquement à de fortes doses et semblent indépendants de la liaison au récepteur AhR, bien que les mécanismes de la toxicité ne soient pas encore bien identifiés (Du et al., 2015; EFSA, 2011; Germer et al., 2006). L'HBCD n'est pas génotoxique et n'a pas montré d'effet cancérogène avéré en modèle murin (EFSA, 2011). Une étude récente a toutefois suggéré l'implication de l'HBCD dans le développement du cancer de la prostate (Kim et al., 2016b). De plus, des études épidémiologiques chez l'Homme, et plus particulièrement chez l'enfant, ont étudié l'impact de l'exposition environnementale à l'HBCD avec la survenue de dysfonctionnements endocriniens, neuropsychiatriques ou du développement sans établir de corrélation entre le polluant et les pathologies ciblées (US-EPA, 2014).

1.1.4. Les pesticides

Les pesticides sont des substances chimiques actives dotées de propriétés répulsives ou toxicologiques utilisées dans le but de lutter contre des organismes jugés nuisibles pour la production animale et végétale. Afin de protéger les consommateurs, l'UE a établi, par la réglementation (EC) No 396/2005, des limites maximales de résidus (LMR) représentant des limites réglementaires en résidus de pesticides susceptibles d'être retrouvés dans un produit alimentaire. Par défaut, une limite de 0,01 mg/kg est applicable pour les pesticides non explicitement cités dans la législation (EFSA, 2017; UE, 2005).

L'UE a mis en place un programme qui contrôle chaque année une liste de produits afin d'en vérifier le respect vis-à-vis des LMR établies. En 2015, l'étude a porté sur la recherche et la quantification de 774 pesticides dans 84341 échantillons alimentaires à travers l'Europe, l'Islande et la Norvège (EFSA, 2017). En moyenne, 220 pesticides ont été analysés par échantillon. La majorité des échantillons (69,3%) provenait de l'UE, 25,8% des échantillons étaient importés de pays hors UE et 4,9% n'avaient pas d'origine connue. 97,2% des échantillons présentaient des taux de pesticides dans les limites établies par l'UE (pas de dépassement de la LMR) dont 53,3% ne présentaient pas de résidus quantifiable (en dessous

du seuil de quantification). Les concentrations en résidus de 2,8% des échantillons dépassaient la LMR et pour 1,6% des échantillons les concentrations en résidus dépassaient très largement les limites légales. Les aliments dont les LMR ont été les plus dépassées sont les brocolis (3,4% des échantillons), suivi par le raisin de table (1,7%). Les aliments présentant la plus haute contamination multi-résiduelle (au moins deux résidus de pesticides) sont les bananes (58,4%), le raisin de table (58,3%) et les poivrons (24,4%). La présence d'une contamination multi-résiduelle était faible pour le beurre (3,7%) et les œufs (2,1%) (EFSA, 2017).

Les principaux pesticides utilisés actuellement appartiennent à quelques grandes familles chimiques dont les organochlorés, les organophosphorés, les pyréthriinoïdes et les carbamates. Par soucis de synthèse et de clarté, seule la deltaméthrine (pyréthriinoïde) sera développée ci-dessous (**Tableau 1**).

De par ses propriétés neurotoxiques, la deltaméthrine est un insecticide et acaricide à large spectre d'action utilisé en agriculture ainsi que pour des usages vétérinaires et domestiques depuis 1978 (ANSES, 2011b; EFSA, 2009). Elle est encore largement utilisée dans le cadre de plans de lutte anti-vectorielle contre divers nuisibles. Un plan de lutte contre la dengue et le chikungunya a été mis en œuvre en Gironde en 2015, comportant plusieurs plans d'actions dont l'utilisation de la deltaméthrine en tant que substance active en milieux urbains et péri-urbains (ANSES, 2011c, 2016; Prefet-Gironde, 2015). En France, les cultures traitées à la deltaméthrine sont principalement les céréales, la vigne, l'arboriculture, les cultures légumières et la pomme de terre (INRS, 2007). Les légumes sont les principaux aliments contributeurs à l'exposition (ANSES, 2011b). Inscrite à l'annexe 1 de la directive 91/414/CEE en 2003, la deltaméthrine a été considérée comme prioritaire compte tenu d'un apport journalier maximum théorique (AJMT) chez les enfants supérieur à 130% de la DJT (0,01 mg/kg.pc/j) (Menard et al., 2008; UE, 2003b).

En modèle murin, l'exposition à la deltaméthrine a été associée à une toxicité au niveau du foie, des reins, du cerveau et du système reproductif *via* des mécanismes oxydatifs et apoptotiques. Ces mécanismes de la toxicité sont indépendants de l'induction du récepteur AhR (Gasmi et al., 2017; Khalatbary et al., 2015; Maalej et al., 2017; Marettova et al., 2017; Saoudi et al., 2017). La deltaméthrine n'est pas mutagène et les études disponibles n'ont pas mis en évidence d'effet cancérigène. Chez l'Homme, peu de données sont disponibles, cependant, des cas d'intoxication aiguë (ingestions accidentelles ou volontaires) sont

associées à des céphalées, des troubles digestifs, des nausées, des vomissements, des signes d'irritation des voies aériennes supérieures ainsi que des troubles neurologiques (vertiges, ataxie, myoclonies, convulsions) (INRS, 2007).

1.1.5. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAPs regroupent plus d'une centaine de composés chimiques uniquement formés de carbone et d'hydrogène. Ce sont des molécules organiques composées d'au moins deux cycles aromatiques condensés, possédant des caractéristiques physico-chimiques et toxiques variables en fonction de leur structure (Douben, 2003). Trois catégories d'HAPs sont distinguées en fonction de leur origine: (i) les HAPs diagéniques, issus de la décomposition de la matière organique par des organismes vivants, (ii) les HAPs pétrogéniques, issus du pétrole et de ses dérivés (le fioul, l'huile et le charbon), (iii) les HAPs pyrolytiques, issus de la combustion incomplète de la matière organique (Thorsen et al., 2004). Ce sont les HAPs pétrogéniques et pyrolytiques qui sont majoritaires dans l'environnement. Leur production est soit d'origine naturelle (feux de forêts, activité volcanique) soit d'origine anthropogénique (chauffage, transports, activités industrielles).

En 1976, l'agence de protection environnementale américaine (US-EPA) a proposé le suivi de seize HAPs les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement, dont le B[a]P, défini comme marqueur de l'occurrence et de la toxicité des HAPs (**Tableau 1**) (Keith, 2015). Cependant, en 2008, l'opinion scientifique des contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM) a conclu que le B[a]P seul n'est plus un indicateur précis de la présence des HAPs totaux dans les aliments. Le mélange B[a]P, chrysène, benzo[b]fluoranthène et benz[a]anthracène (HAP4) et le mélange (HAP4), benzo[k]fluoranthène, benzo[ghi]perylène, dibenz[a,h]anthracène et indeno[1,2,3-c,d]pyrène (HAP8) sont des indicateurs plus pertinents (EFSA, 2008).

La contamination des aliments peut se faire naturellement par le dépôt de particules aériennes sur les végétaux, accumulation dans les espèces animales (par la consommation d'aliments déjà contaminés), ou pendant la transformation de l'aliment suivant le mode de cuisson (fumage, rôtissage, grillades au charbon de bois). Les aliments où les plus fortes concentrations en B[a]P sont retrouvées (si l'on ne prend pas en compte le mode de cuisson), sont les céréales et les produits à base de céréales, ainsi que les mollusques et crustacés. De

même, l'utilisation d'huiles et de graisses végétales augmente les probabilités d'exposition (EFSA, 2008; Veyrand et al., 2013). Cependant, le mode de cuisson peut changer de manière très significative les quantités en HAPs dans un aliment (Lee et al., 2016). D'après le comité scientifique de l'alimentation humaine (SCF), des concentrations en HAPs proches de 200 µg/kg ont été détectées dans de la viande et du poisson fumé (les concentrations augmentant avec la teneur en graisse des produits). Enfin, des concentrations en HAPs allant jusqu'à 130 µg/kg ont été détectées dans de la viande grillée au barbecue. En moyenne, les valeurs de base retrouvées dans les aliments non transformés sont de l'ordre de 0,01-1 µg/kg (SCF, 2002).

Pour les fumeurs, l'inhalation est la voie principale de contamination avec des concentrations en B[a]P variant de 5 à 50 ng/cigarette. La consommation d'une cigarette équivaut ainsi à l'inhalation d'un mètre cube (m³) d'air cinq fois plus pollué qu'en zone urbaine. Pour un non-fumeur, l'alimentation reste la principale voie d'exposition aux HAPs. En Europe, les AJE moyens d'HAPs et de B[a]P sont respectivement de 23,6-35,6 et 3,1-4,3 ng/kg.pc chez l'adulte (EFSA, 2008). Une DJT n'a pas été calculée pour les HAPs, cependant, des teneurs maximales ont été établies dans certaines denrées alimentaires (UE, 2011, 2014).

En modèle animal, la toxicité du B[a]P a été principalement observée au niveau hépatique, neurologique, immunitaire ainsi que sur la reproduction et le développement (US-EPA, 2017). Le B[a]P est mutagène et a été caractérisé comme cancérigène avéré pour l'Homme (groupe 1) par le CIRC (IARC, 2012a). La formation d'adénomes et de cancer est dépendante de la voie d'exposition (Rengarajan et al., 2015) et la toxicité du B[a]P est dépendante de sa liaison au récepteur AhR (US-EPA, 2017; Van Herwaarden et al., 2009). Les cibles de la toxicité sont les poumons (préférentiellement lors d'une exposition par inhalation) (Denissenko et al., 1996; Ueng et al., 2010) ainsi que le tractus digestif (Hudson et al., 2013; Labib et al., 2013; Wei et al., 2016), le foie (Ba et al., 2015; Kroese et al., 2001; Tian et al., 2016) et le sein (Guo et al., 2015; Shen et al., 2017; White et al., 2016) (principalement lors d'une exposition par voie orale). Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont pu faire le lien entre exposition au B[a]P et cancérogenèse notamment par la détection et la quantification de biomarqueurs du métabolisme du B[a]P tels que les adduits à l'ADN ou les composés hydroxylés éliminés dans les urines (Boogaard, 2008; Su et al., 2014).

1.1.6. Les amines hétérocycliques (AHs)

Les AHs sont des composés chimiques aromatiques issus de la cuisson à haute température de la viande et du poisson. La majorité des AHs est formée *via* la réaction de Maillard à partir de créatinine, d'acides aminés et d'hexoses (Murkovic, 2004; Skog et al., 1998). Les AHs regroupent à l'heure actuelle plus d'une vingtaine de composés (Alaejos and Afonso, 2011) et peuvent être classées en deux groupes suivant le processus de formation: les AHs thermiques (100-300°C) et pyrolytiques (>300°C) (Gibis, 2016). Le CIRC les a classées comme cancérigènes possibles (groupe 2B) et probables (groupe 2A) pour l'Homme dès les années 1990 (WHO and IARC, 1993).

Les trois AHs les plus couramment retrouvées dans les viandes cuisinées sont la 2-amino-3,8-diméthylimidazo (4,5-f) quinoxaline (MeIQx), la 2-amino-3,4,8-triméthylimidazo (4,5-f) quinoxaline (DiMeIQx) ainsi que la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo (4,5-b) pyridine (PhIP) (Pais et al., 1999). Bien que l'exposition se produise principalement par la consommation de viande cuite à haute température, les AHs ont également été détectées dans certains produits alimentaires transformés comme la bière, le vin (Manabe et al., 1993) ainsi que le fromage fumé (Naccari et al., 2009).

La quantité d'AHs formée est favorisée par des cuissons prolongées et dépend du mode de cuisson. Une viande frite et grillée contient plus d'AHs qu'une même viande cuite à la vapeur, à l'étuvée ou pochée (Layton et al., 1995). Les concentrations d'AHs mesurées dans la viande ou le poisson sont très diverses. La PhIP (**Tableau 1**) est l'AH la plus abondamment retrouvée dans la viande de bœuf, de porc, de poulet, d'agneau ainsi que dans le poisson (WHO and IARC, 1993). Bien que les concentrations moyennes de PhIP soient généralement d'une dizaine de ng/g de viande (Alaejos and Afonso, 2011; Ni et al., 2008; Sahar et al., 2016), une concentration avoisinant les 500 ng/g a été retrouvée dans du poulet fortement grillé au barbecue (Sinha et al., 1995). Du fait de concentrations en AHs très variables suivant les échantillons analysés, plusieurs AJE ont été proposés. Le plus couramment cité est celui de Skog avec un AJE moyen évalué entre 0 et 15 µg/j/personne (Skog, 2002). Plus récemment, Rohrmann et collaborateurs ont reporté un AJE moyen (uniquement par l'apport de viande) d'AHs et de PhIP respectivement de 69 et 48 ng/j/personne (Rohrmann et al., 2007). Actuellement, il n'existe pas de DJT définie pour l'exposition aux AHs.

L'évaluation de la toxicité des AHs et plus particulièrement de la PhIP a été réalisée principalement sur leurs potentiels mutagènes et cancérigènes en modèle animal. Ainsi,

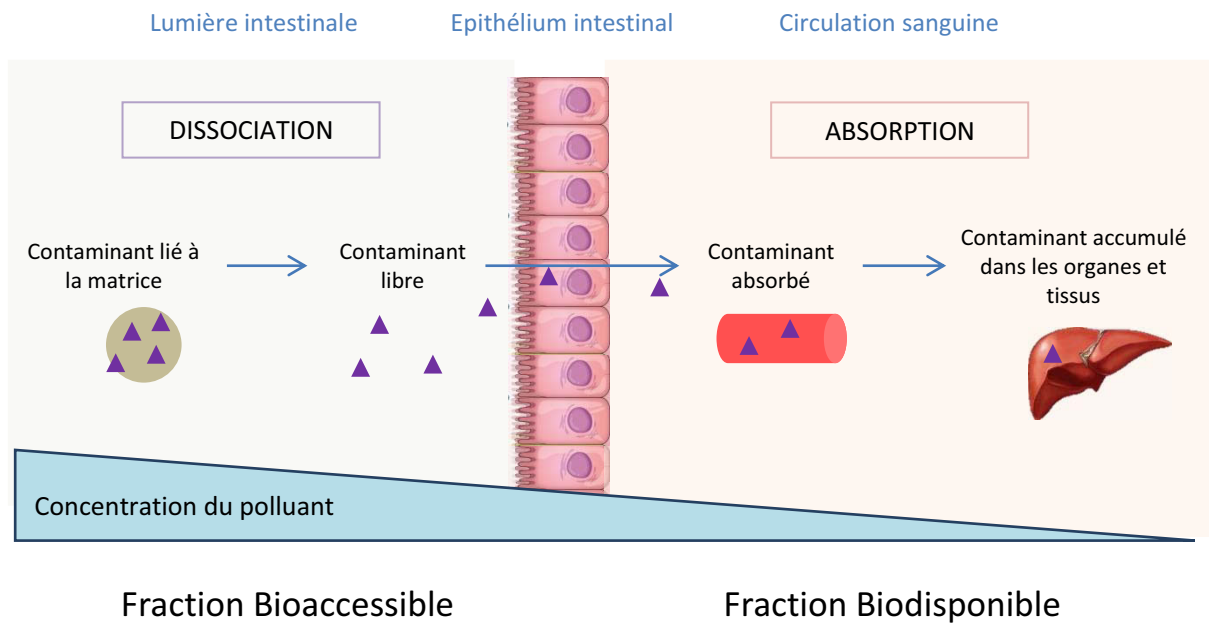


Figure 1 : Schéma représentatif des fractions bioaccessibles et biodisponibles.

l'exposition orale à la PhIP est associée en modèle murin, à la formation de cancers du côlon (Chiavarini et al., 2017), du sein (Choudhary et al., 2012; Qiu et al., 2005; Shan et al., 2004) et de la prostate (Li et al., 2012; Xiao et al., 2016). Une étude a également attribué des effets neurotoxiques à la PhIP *via* l'induction d'un stress oxydant (Griggs et al., 2014). Du fait du manque d'études épidémiologiques, la PhIP a été classée comme cancérigène possible pour l'Homme (groupe 2B) par le CIRC (WHO and IARC, 1993). Les mécanismes de la toxicité de la PhIP sont médiés par sa liaison au récepteur AhR (National Toxicology Program, 2016).

1.2. Toxicité et métabolisation des xénobiotiques chez l'Homme

1.2.1. Notions de bioaccessibilité et biodisponibilité

La toxicité des xénobiotiques est, dans la majorité des cas, évaluée à partir de la quantité totale de composé ingéré, alors que seule une fraction (plus ou moins importante) sera réellement assimilée par l'organisme. Cette fraction varie suivant différents paramètres tel que la capacité d'extraction de la matrice alimentaire et éventuellement leur transformation au cours du processus digestif (Collins et al., 2015; Engel et al., 2014). La fraction bioaccessible désigne la fraction d'un xénobiotique qui est libérée de la matrice alimentaire dans le tractus digestif et qui est ainsi disponible pour l'absorption par l'épithélium intestinal (Versantvoort et al., 2005; Yu et al., 2011). La fraction biodisponible désigne la fraction d'un xénobiotique retrouvée dans la circulation systémique, qui peut ainsi, atteindre les organes cibles au niveau desquels il exercera potentiellement ses effets toxiques (El-Kattan and Varma, 2012; Spanogiannopoulos et al., 2016; Thomas et al., 2006). En d'autres termes, la fraction bioaccessible du contaminant est potentiellement biodisponible, alors que la fraction biodisponible du contaminant est toujours bioaccessible (**Figure 1**).

La mesure de la bioaccessibilité d'un contaminant est le plus souvent réalisée par des approches *in vitro* reproduisant les conditions physiologiques de la digestion (Guerra et al., 2012). Ainsi, bien que la fraction bioaccessible varie suivant la nature physico-chimique du composé, il est également difficile de s'accorder sur des valeurs consensus pour une même famille de composés. Les différences notables entre les protocoles de digestion *in vitro* peuvent expliquer la dispersion des valeurs retrouvées dans la littérature. Les paramètres physico-chimiques de la digestion (acides biliaires, temps de résidence, broyage de la matrice, pH) (Kulp et al., 2003; Oomen et al., 2002, 2003; Yu et al., 2009), la composition de la

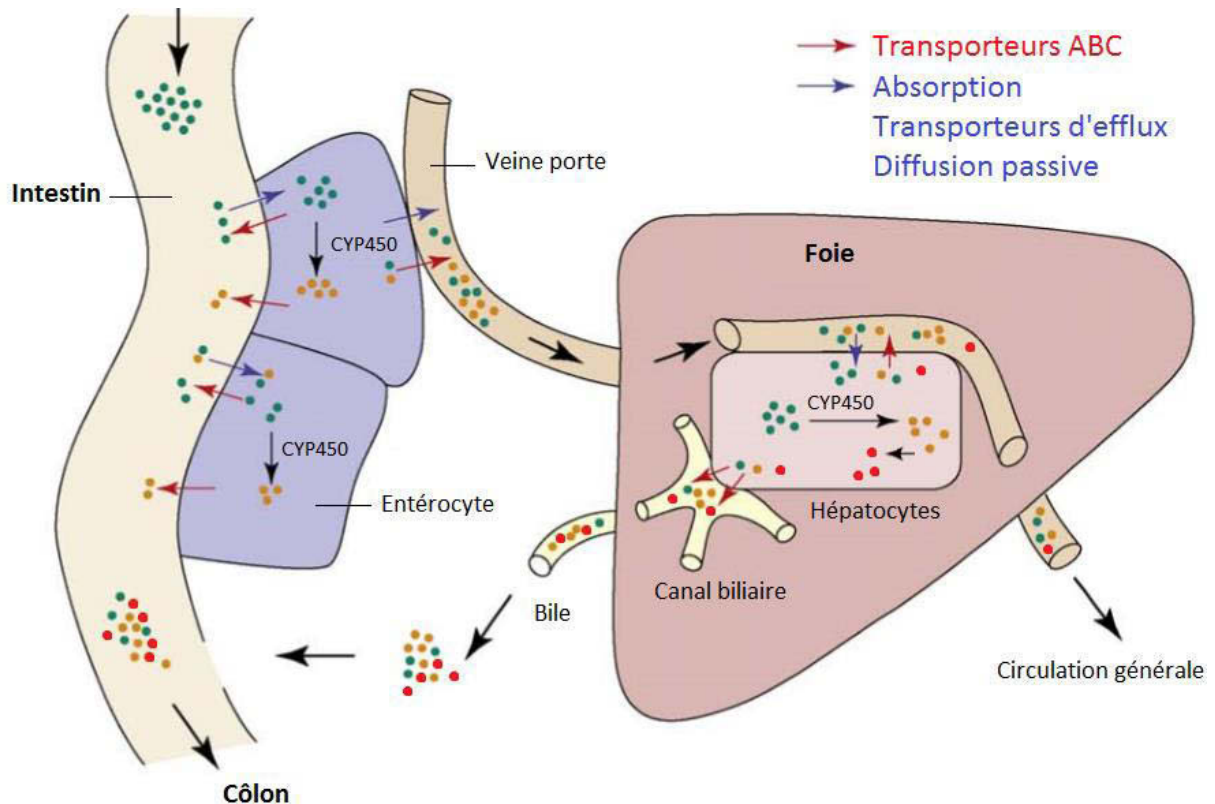


Figure 2 : Schéma représentatif du métabolisme intestinal et hépatique (voie entéro-hépatique) des xénobiotiques. Les cytochromes P450 (CYP450) réalisent des réactions d'oxydation au niveau des entérocytes et des hépatocytes. Les xénobiotiques et les métabolites oxydés pourront alors, *via* les transporteurs d'efflux, soit être relargués dans la veine porte pour atteindre le foie, soit retourner dans la lumière intestinale. Au niveau des hépatocytes, les métabolites oxydés pourront être conjugués. La sécrétion biliaire permet le retour dans le tractus digestif des xénobiotiques métabolisés ou non. Les contaminants ingérés sont représentés sous forme de points verts. Leurs produits d'oxydation sont sous forme de points oranges. Les produits de conjugaison sont figurés sous forme de points rouges. Adaptée de Van Herwaarden *et al.*, 2009.

matrice (nature et quantité en protéines, fibres, lipides) (Saura-Calixto et al., 2007; Xing et al., 2008; Yu et al., 2010, 2011) et la transformation de la matrice en aval de la digestion (cuisson, découpe) (Marques et al., 2011; Maulvault et al., 2011) auront un impact sur la bioaccessibilité des contaminants. Enfin, les protocoles de digestion *in vitro* sont généralement définis sur la partie haute du tractus digestif et ne prennent pas en compte l'activité des microorganismes largement représentés au niveau du côlon (microbiote intestinal). Ce dernier peut notamment interagir dans le processus de détoxification des polluants par les cellules de l'hôte et ainsi permettre à nouveau la circulation de contaminants bioaccessibles.

1.2.2. Le cycle entéro-hépatique

Le métabolisme des xénobiotiques ingérés par voie orale suit une voie entéro-hépatique. Cette voie est ainsi non seulement importante pour la digestion (solubilisation des lipides) mais également pour la métabolisation des xénobiotiques à des fins de détoxification (Van Herwaarden et al., 2009). Dans ce dernier cas de figure, le cycle entéro-hépatique a pour but de transformer des xénobiotiques lipophiles en composés plus hydrosolubles qui seront ainsi plus rapidement excrétés par l'organisme (fèces, urine).

Les xénobiotiques sont tout d'abord oxydés par des monooxygénases présentes au niveau des entérocytes (cellules tapissant la lumière intestinale) mais également au niveau des hépatocytes (cellules majoritaires et métaboliquement les plus actives dans le foie) conduisant à la phase I de la détoxification (**Figure 2**) (Van Herwaarden et al., 2009). Les xénobiotiques et leurs dérivés oxydés peuvent cependant retourner dans la lumière intestinale au travers de différents systèmes d'efflux des entérocytes. Pour les molécules ayant traversé la barrière intestinale, elles sont alors dirigées vers le foie par la circulation sanguine. Le métabolisme hépatique se poursuit pour les molécules transitant par les hépatocytes par une phase II de détoxification permettant une transformation des molécules activées par conjugaison, conduisant à leur élimination *via* la bile. Les enzymes impliquées dans la phase II sont principalement des transférases (UDP-glucuronyl-transférases, sulfotransférases, N-acétyltransférases, glutathion S-transférases et méthyltransférases) (Jancova et al., 2010). Là encore, des systèmes d'efflux des cellules hépatiques permettent un retour des xénobiotiques et de leurs dérivés dans la circulation sanguine générale pouvant ainsi atteindre d'autres

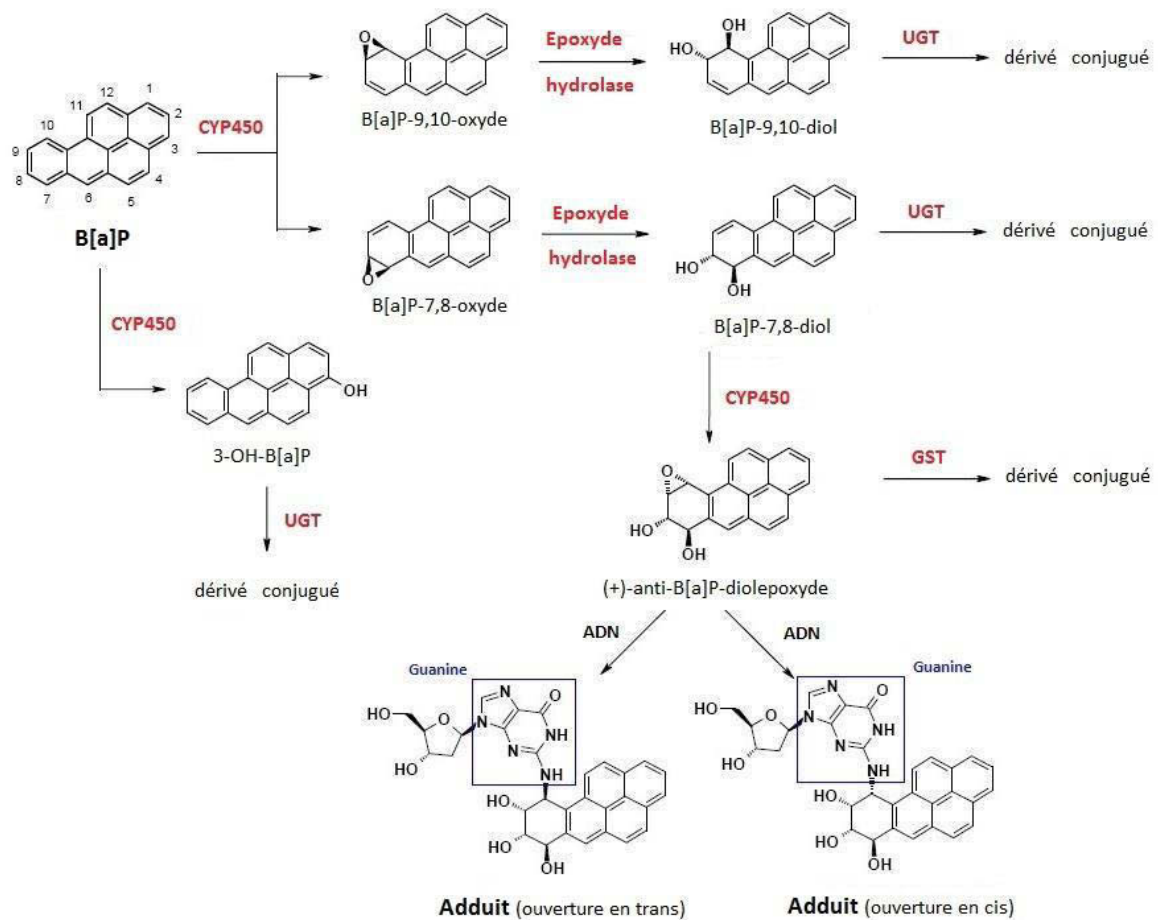


Figure 3 : Métabolisation du B[a]P en diol-époxyde par les enzymes de l'hôte. Le B[a]P pourra être métabolisé par des cytochromes P450 (CYP450) et des époxydes hydrolases en composés hydroxylés qui seront à leur tour métabolisés en composés diols-époxydes. Ces métabolites se lient à l'ADN et forment ainsi des adduits. Le B[a]P pourra être également oxydé en cations radicaux (par des CYP450 et des peroxydases) qui se lieront de façon covalente à l'ADN (non schématisé). Enfin, des réactions de conjugaison permettront *via* des glutathion-S-transférases (GST) et UDP-glucuronyl-transférases (UGT) de solubiliser les molécules hydroxylées pour faciliter leur élimination. Adaptée de Trushin *et al.*, 2012.

organes ou retourner vers le tractus digestif. Les activités bactériennes de type Beta-glucuronidases peuvent cliver les composés conjugués issus du foie libérant ainsi de nouveau les xénobiotiques dans la lumière du côlon. La voie entéro-hépatique permet donc aux xénobiotiques absorbés dans la partie haute du tractus digestif d'être également en contact avec le microbiote colique (Roberts et al., 2002).

1.2.3. Récepteur des hydrocarbures arylés (AhR) et toxicité

Au niveau des entérocytes et des hépatocytes, les xénobiotiques pourront être oxydés par des monooxygénases (enzymes à activité cytochrome P450 (CYP450)) et peroxydases et hydrolysés par des époxydes hydrolases en métabolites pouvant être plus toxiques (diols-époxydes et cations radicaux) (Baird et al., 2005). Ce sont ces métabolites, s'ils ne sont pas éliminés par conjugaison, qui auront des effets cancérigènes par la formation d'adduits à l'ADN (portion d'ADN liée covalamment à un composé chimique) (**Figure 3**) (Ewa and Danuta, 2016; Paules et al., 1988; Pratt et al., 2011). Une partie de ces adduits, s'ils ne sont pas réparés, s'accompagnent de mutations génétiques dans les tissus.

Les CYP450 sont inductibles *via* une liaison des xénobiotiques au récepteur intracellulaire des hydrocarbures arylés (AhR). Ce récepteur, principalement présent au niveau de la peau et de l'épithélium intestinal, est un facteur de transcription dont l'activation est médiée par des xénobiotiques et des composés endogènes tels que les métabolites du tryptophane, des composants alimentaires, et des facteurs microbiens (Denison and Nagy, 2003; Hubbard et al., 2015; McMillan and Bradfield, 2007; Moura-Alves et al., 2014; Zelante et al., 2013). La liaison xénobiotique-AhR va donc induire la translocation nucléaire de la protéine AhR, qui, une fois dans le noyau, va se dimériser avec une protéine Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). L'hétérodimère AhR-Arnt va alors se fixer sur une région cible du promoteur des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et activer ainsi leur transcription. Les xénobiotiques potentialisent donc leur propre toxicité (Mackowiak and Wang, 2016). Il a notamment été montré que le B[a]P et la TCDD n'induisaient pas de toxicité chez des souris dépourvues en récepteur AhR (souris AhR^{-/-}) contrairement aux souris sauvages (formation de tumeurs et effets tératogènes respectivement) (Mimura et al., 1997; Shimizu et al., 2000).

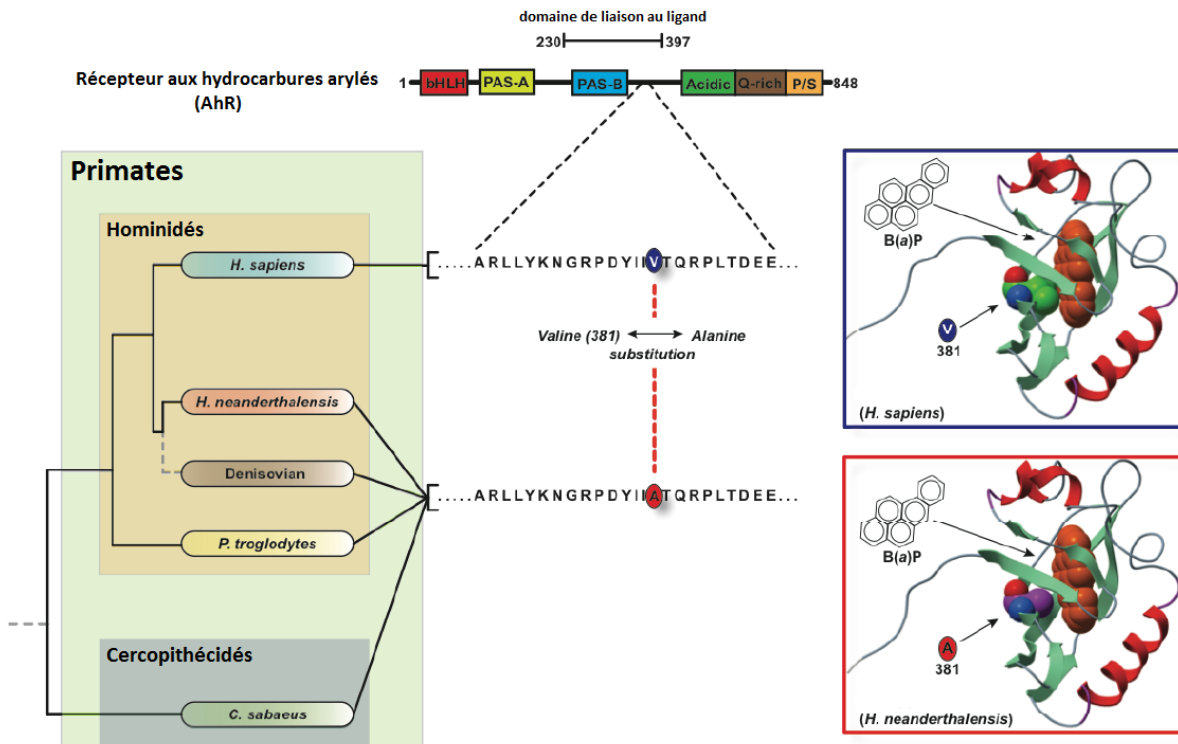


Figure 4 : Domaine de liaison du ligand au récepteur AhR de l'Homme et des autres primates (substitution d'un acide aminé). Tirée de Hubbard *et al.*, 2016.

Bien que souvent considéré comme impliqué dans la détoxification des xénobiotiques, il est maintenant établi que le récepteur AhR présente une activité influençant de nombreuses autres fonctions dont le métabolisme énergétique, le cycle cellulaire, le métabolisme lipidique et la fonction immunitaire (Esser and Rannug, 2015; Tian et al., 2015). Des variations interspèces dans l'affinité des ligands au récepteur AhR ont également été mises en évidence. Notamment, le récepteur AhR de la souris (modèle animal largement utilisé dans les tests de toxicité) est connu pour lier la TCDD et les HAPs avec une affinité 10 fois supérieure au récepteur homologue humain (Harper et al., 1988; Ramadoss and Perdew, 2004). Cette variation est due au changement d'un acide aminé dans la région de liaison au ligand. En position 381, le récepteur AhR humain présente une valine (V381) à la place d'un résidu alanine (A381) comme observé chez le modèle murin (Ramadoss and Perdew, 2004). Cependant, l'homologue humain montre une affinité plus forte pour certains ligands endogènes dérivés du tryptophane comme l'indirubine, l'indoxyl sulfate, l'indole et l'acide kynurénique (DiNatale et al., 2010; Flaveny and Perdew, 2009; Hubbard et al., 2015; Schroeder et al., 2010). Des analyses des séquences nucléotidiques du récepteur AhR de différentes espèces de primates et de l'homme de Néandertal (variant ancestral) ont montré que le changement du résidu alanine par une valine en position 381 était seulement retrouvé chez l'homme moderne (variant dérivé) (Hubbard et al., 2016) (**Figure 4**). Comparé au variant dérivé, le variant ancestral a montré une sensibilité 150 à 1000 fois supérieure à l'induction de l'expression des CYP450-1 par le B[a]P (Hubbard et al., 2016). Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que cette mutation V381 pourrait avoir été un avantage évolutif pour l'homme moderne par l'acquisition d'une tolérance aux ligands environnementaux du récepteur AhR.

1.3. Implication des communautés microbiennes dans la biodégradation des POPs

1.3.1. *Microorganismes de l'environnement*

Les POPs sont relargués dans l'environnement par les activités humaines (industries, transports, agriculture, rejets des déchets) et les émissions naturelles (feux de forêts, volcanisme) et sont ainsi retrouvés dans les environnements aériens, terrestres, fluviaux et marins. De par leurs propriétés chimiques (composés aromatiques, polymères de cycles), les POPs font partie des molécules les plus stables et peuvent ainsi persister dans les environnements (Ufarté et al., 2015). Cependant, certains polluants, comme les aromatiques

bromés, sont plus ou moins photosensibles et pourront ainsi être rapidement photo-dégradés notamment à la surface des sols (Ahn et al., 2006; Söderström et al., 2004).

Les microorganismes environnementaux possèdent un large réservoir d'enzymes dégradant des composés de nature très variée. De plus, certaines enzymes possèdent une faible spécificité d'action, ciblant ainsi plusieurs molécules de structure proches (Ufarté et al., 2015). Les microorganismes endogènes aux environnements pollués sont ainsi capables de dégrader un large panel de polluants dont des composés polyaromatiques potentiellement halogénés. Ces capacités de dégradation sont le plus souvent observées au sein de consortia champignons-bactéries dans des environnements complexes tels que les sols, les sédiments, les boues et les eaux polluées (Bunge et al., 2001; Weiland-Brauer et al., 2017; Yan et al., 2016; Zafra et al., 2016, 2017). Cependant, des organismes isolés ont également démontré la capacité à utiliser certains polluants comme seule source de carbone (Chen et al., 2011; Godoy et al., 2016; Kuppusamy et al., 2016). Les composés de faible poids moléculaire sont généralement plus rapidement dégradés que les composés de haut poids moléculaire. Ces derniers sont plus persistants à cause de leur faible bioaccessibilité et leur forte adsorption sur les particules organiques (Morelli et al., 2013).

La dégradation des composés aromatiques est dépendante de la présence ou de l'absence d'oxygène et implique des processus d'oxydo-réduction (Abramowicz, 1995). Lorsque le composé est oxydé en condition aérobie, l'accepteur final d'électrons est le dioxygène. En condition anaérobie, les accepteurs finaux d'électrons peuvent être les nitrates, les sulfates ou les ions ferriques (Li et al., 2015). Lorsque le composé est réduit (mécanisme majoritaire des composés halogénés), le composé est lui-même l'accepteur final d'électrons. Les processus d'oxydation seront catalysés par des oxydoréductases et des hydrolases, tandis que les processus de réduction impliqueront des halogénases. Dans la littérature, ce sont les oxydoréductases qui sont le plus souvent impliquées dans les mécanismes d'attaque de la dégradation des polluants (ouverture des cycles aromatiques) avec notamment l'implication de peroxydases, de (mono-di)oxygénases et de laccases (Ali et al., 2017; Karigar and Rao, 2011). Les composés halogénés subiront en amont, des réactions de déhalogénéation. La déhalogénéation réductrice (en anaérobie) sera favorisée pour les composés présentant un nombre élevé de substituants halogénés. Notamment, certains composés fortement chlorés comme les PCBs sont résistants à la dégradation aérobie et seront uniquement dégradés *via* une déhalogénéation réductrice (Bhatt et al., 2007; Borja et al., 2005). Les composés les moins

halogénés seront eux les plus susceptibles d'être dégradés en condition aérobie (Mohn and Tiedje, 1992; Smidt and de Vos, 2004).

1.3.2. *Microorganismes commensaux de l'Homme*

L'Homme est exposé aux POPs par voie orale, aérienne et cutanée. Ainsi les microorganismes présents au niveau des tractus digestif, respiratoire et de la peau se retrouvent également exposés à ces composés, potentielle source de carbone et d'énergie.

L'évaluation de la toxicité des contaminants alimentaires chez l'Homme a longtemps négligé l'impact du métabolisme de ces composés par les microbiotes, prenant seulement en compte le métabolisme par les cellules de l'hôte. Cependant, il a été démontré que le microbiote cutané et intestinal a les capacités à dégrader de tels composés, pouvant conduire à la formation de métabolites secondaires potentiellement plus toxiques que les polluants eux-mêmes.

Sowada et collaborateurs ont notamment isolé 21 microorganismes de la peau capables de dégrader le B[a]P comme seule source de carbone et d'énergie. *Micrococcus luteus*, Actinobactérie commensale saprophyte de la peau, a été caractérisée comme étant un contributeur majeur de cette dégradation. Deux gènes codant pour une DszA/NtaA-like monooxygénase ainsi qu'une NifH-like réductase ont pu être identifiés comme potentiellement impliqués dans la dégradation du B[a]P par le microbiote de la peau (Sowada et al., 2014). Plus récemment, la même équipe a démontré que les composés issus de la dégradation du B[a]P par trois des 21 microorganismes précédemment isolés, étaient cytotoxiques et génotoxiques en modèle cellulaire de la peau (kératinocytes) et du foie (hépatocytes). Dix composés ont pu être identifiés, parmi lesquels six d'entre eux ont été, au préalable, observés dans le métabolisme eucaryote du B[a]P (Sowada et al., 2017).

Le microbiote intestinal a également montré la capacité à biodégrader des polluants et cette partie sera traitée plus en détail dans le paragraphe 3.3.

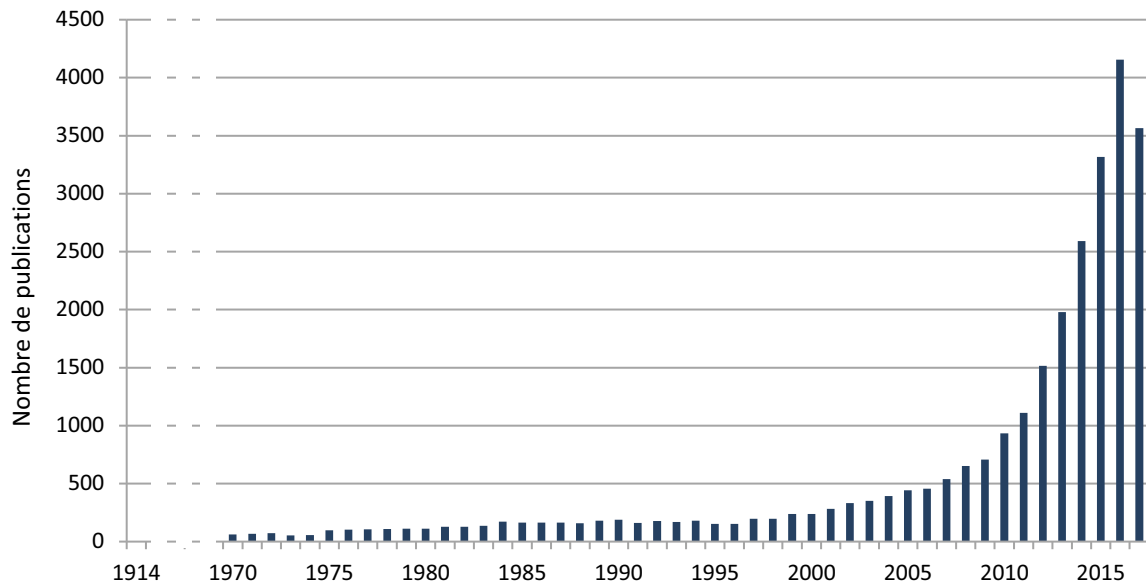


Figure 5 : Graphe représentant le nombre de publications issues de PubMed au 27.08.17 comprenant les termes: « intestinal microbiota ou gut microbiota ou intestinal flora ou gut flora ou intestinal microflora ou gut microflora ou gut microbiome ou intestinal microbiome » depuis 1914.

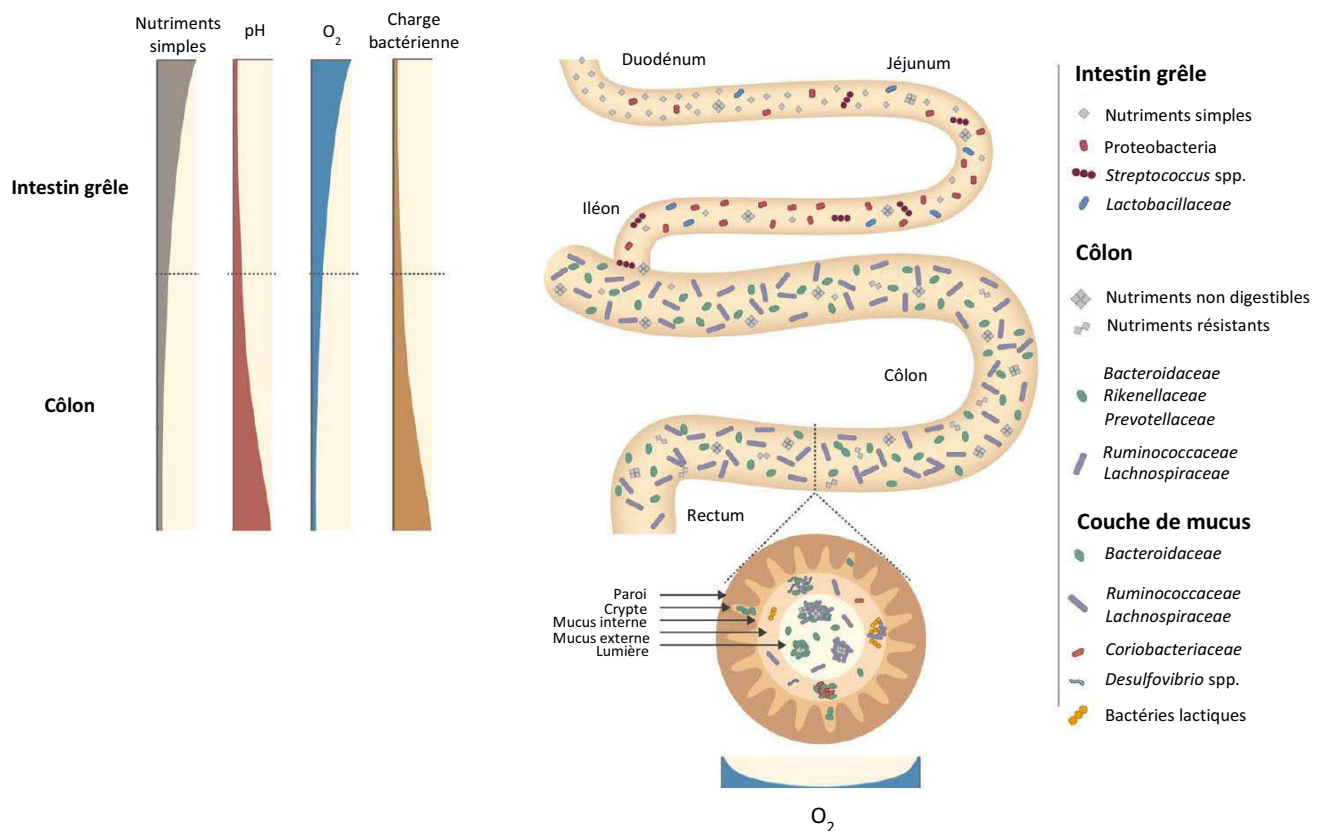


Figure 6 : Hétérogénéité spatiale du microbiote intestinal le long du tractus digestif. Adaptée de Pereira and Berry, 2017.

2. Le Microbiote Intestinal Humain

Le tractus gastro-intestinal (TGI) de l'Homme est l'habitat d'une myriade de microorganismes, communément appelé microbiote intestinal. Ce microbiote, composé de bactéries, d'archées, d'eucaryotes et de virus a co-évolué avec son hôte pour former une relation complexe et mutuellement bénéfique (Bäckhed et al., 2005). Le microbiote intestinal est apparu dans les publications scientifiques pour la première fois en 1914 dans le journal *Science* sous le terme de flore intestinale (Leidy, 1914). Depuis, un essor fulgurant du nombre de travaux publiés a été observé ces 15 dernières années (**Figure 5**).

2.1. Le microbiote intestinal humain au cours de la vie

2.1.1. Exploration du microbiote intestinal humain

Biogéographie du microbiote

La densité et la composition du microbiote intestinal dans le tractus digestif sont dépendantes des propriétés physiologiques d'un segment donné et sont ainsi stratifiées à la fois sur un axe longitudinal (de la bouche au rectum) et transversal (de la lumière à l'épithélium intestinal) (**Figure 6**) (Donaldson et al., 2015; Pereira and Berry, 2017; Tropini et al., 2017). Le TGI se segmente en plusieurs compartiments comprenant la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin (côlon ascendant, transverse et descendant) et le rectum. Le long du TGI, deux paramètres abiotiques majeurs influencent particulièrement la composition microbienne: la pression partielle en dioxygène et le pH. D'autres paramètres tels que la biodisponibilité en nutriment, le temps de transit ou encore la concentration en peptides antimicrobiens participent également à l'établissement de niches écologiques (Sommer and Bäckhed, 2016). Ainsi, le microbiote stomacal ne comprend que 10^1 à 10^2 bactéries/g de contenu luminal, du fait d'un pH très acide et d'un temps de transit rapide du bol alimentaire qui tendent à limiter la croissance des microorganismes. La densité bactérienne augmente progressivement de 10^2 - 10^3 bactéries/g de contenu luminal dans le duodénum à 10^7 - 10^8 bactéries/g de contenu luminal dans l'iléon et atteint un maximum de 10^{12} bactéries/g de contenu luminal au niveau colique (Ohland and Jobin, 2015; Sommer and Bäckhed, 2016). Le côlon représente ainsi le compartiment intestinal le plus densément peuplé mais également le plus diversifié. On y détecte principalement des bactéries anaérobies strictes provenant des familles des *Bacteroidaceae*,

Clostridiaceae, *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* et *Bifidobacteriaceae* (Sommer and Bäckhed, 2016). La composition du microbiote associé au mucus diffère également du microbiote luminal (De Weirdt and Van de Wiele, 2015). Notamment le gradient de dioxygène ainsi que la biodisponibilité en nutriments (mucus) crée un environnement propice au développement de bactéries aérotolérantes et/ou dégradant le mucus telles que les *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* et *Verrucomicrobiaceae* (De Weirdt and Van de Wiele, 2015; Donaldson et al., 2015).

Diversité, cœur phylogénétique et catégorisation du microbiote

Depuis longtemps, le nombre de microorganismes présent dans le TGI a été estimé à 10^{14} , soit dix fois le nombre de cellules humaines (Ley et al., 2006; Qin et al., 2010). Cette estimation a récemment été révisée suggérant un ratio plus proche de 1:1 (Sender et al., 2016). Les travaux menés aux États-Unis (the Human Microbiome Project, HMP) et en Europe (the European union project on Metagenomics of the Human Intestinal Tract, MetaHIT) ont révolutionné la vision de la structure et des fonctions de cet écosystème (HMP, 2012; Qin et al., 2010). Le consortium américain a décrit de manière exhaustive les microbiomes humains intestinaux, oraux, respiratoires, cutanés et vaginaux de 242 donneurs sains, au travers de l'échantillonnage de 15 (pour les hommes) et 18 (pour les femmes) sites anatomiques (HMP, 2012). De son côté, le consortium européen a exploré le microbiote intestinal et en particulier son association avec l'état de santé des individus. Ces travaux ont été conduits sur une cohorte de 370 personnes (saines, obèses ou atteintes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)). Le consortium a rapporté un catalogue de 3,3 millions de gènes et ainsi estima une diversité de 1000 à 1150 espèces bactériennes, faisant du microbiote intestinal l'écosystème microbien humain le plus complexe (Qin et al., 2010). A l'heure actuelle, le catalogue de gènes du microbiote intestinal le plus complet a été reporté à près de 10 millions de gènes (Li et al., 2014). Récemment, de nombreux travaux, basés sur des cohortes de plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'individus, ont été menés dans le but de toujours approfondir les connaissances en lien avec les interactions hôte-microbiote intestinal (Falony et al., 2016; Goodrich et al., 2014; Le Chatelier et al., 2013; Martínez et al., 2015; Obregon-Tito et al., 2015; Tigchelaar et al., 2016; Zhernakova et al., 2016).

Les bactéries sont les organismes dominant le microbiote intestinal. Parmi plus des 30 phyla qui les caractérisent, 7 englobent la majorité des espèces connues: les Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia et Cyanobacteria (Sankar et al., 2015). Les Firmicutes et Bacteroidetes sont les phyla

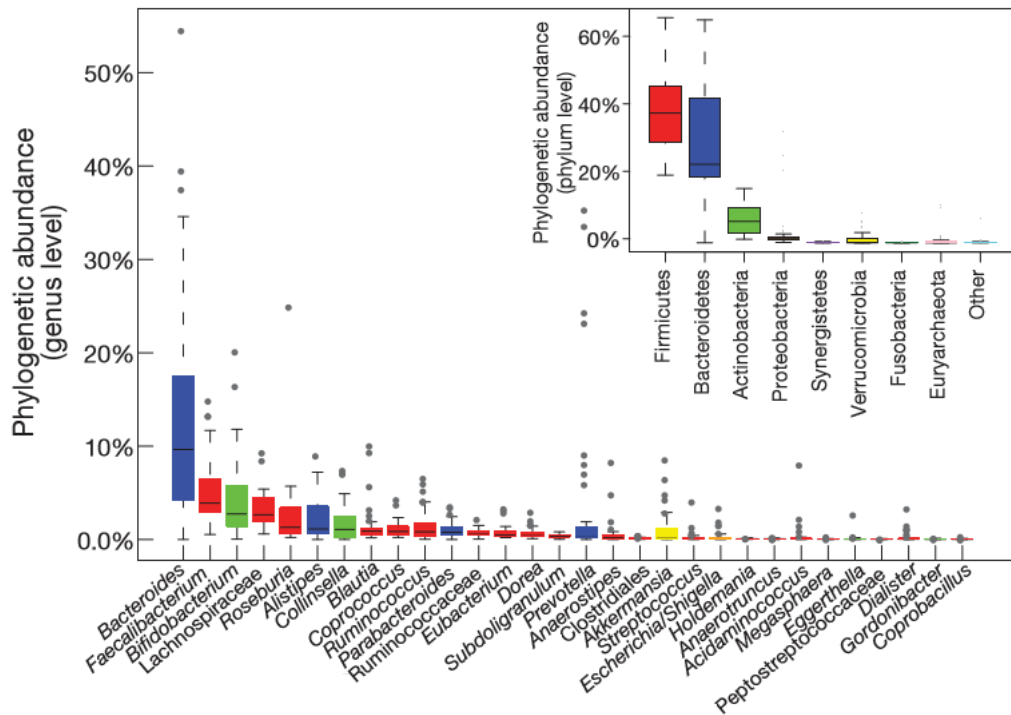


Figure 7 : Structure du microbiote intestinal humain. Variation de l'abondance relative des 8 phyla et des 30 genres les plus abondants. Le code couleur des genres est associé à leur phylum respectif. Tirée de Arumugam *et al.*, 2011.

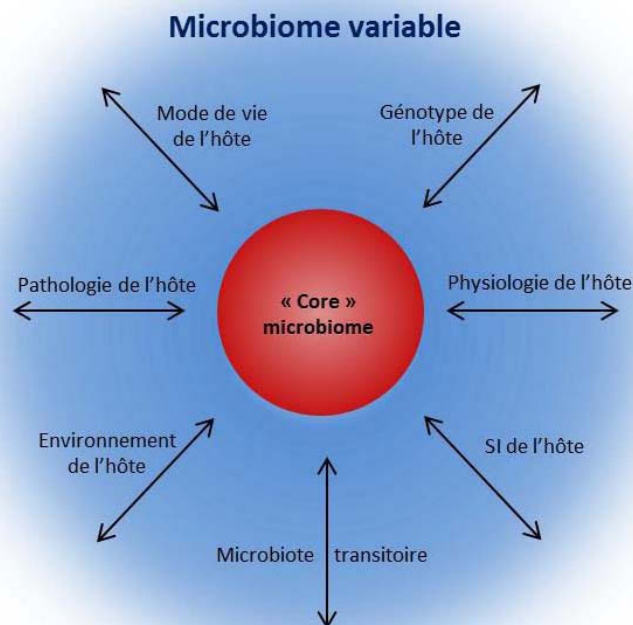


Figure 8 : Concept du « core » microbiome et du microbiome variable chez l'Homme. SI : système immunitaire. Adaptée de Turnbaugh *et al.*, 2007.

majoritaires représentant plus de 90% du microbiote colique (**Figure 7**) (Eckburg et al., 2005; Falony et al., 2016; Li et al., 2014; Marchesi, 2011; Turnbaugh et al., 2009a).

De cette communauté microbienne complexe, certaines espèces seront présentes chez tous les individus d'une population donnée constituant le cœur phylogénétique (« core » microbiote) et pourraient être responsables des fonctions majeures de l'écosystème colique (Falony et al., 2016; Tap et al., 2009; Zhang et al., 2015a), d'autres seront propres à chacun d'entre nous, représentant ainsi notre identité métagénomique (**Figure 8**). Pour exemple, une étude s'est intéressée au cœur phylogénétique d'une population de 314 individus jeunes et sains originaires de 9 provinces à travers la Chine. L'étude a mis en évidence 9 genres prédominants (représentant près de 50% des séquences) retrouvés chez tous les individus (100%) de la cohorte. Une autre étude a poussé l'hétérogénéité de la cohorte encore plus loin, avec l'analyse de 4000 individus originaires des Pays-Bas, de Belgique, de Grande Bretagne, des Etats-Unis, de Papouasie-Nouvelle Guinée, du Pérou et de Tanzanie. Cette étude a ainsi mis en évidence un cœur phylogénétique de 14 genres partagé par 95% des individus de la cohorte (Falony et al., 2016). Le concept de cœur phylogénétique s'étend à de nombreux systèmes microbiens dont l'Homme (Cheng et al., 2016; Falony et al., 2016; Tap et al., 2009; Zhang et al., 2015a), les plantes (Lemanceau et al., 2017; Yeoh et al., 2017), les invertébrés marins (Ainsworth et al., 2015; Astudillo-Garcia et al., 2017), le porc (Holman et al., 2017), les espèces murines (Li et al., 2017; Xiao et al., 2015) et bien d'autres. Cependant, une définition commune du cœur phylogénétique n'étant pas unique dans la communauté scientifique, il est nécessaire d'apprécier les résultats observés dans chaque étude en prenant en compte les méthodes et les critères définis par les auteurs (Lemanceau et al., 2017).

Bien qu'une grande variabilité du microbiote intestinal soit observée entre les individus, il a été proposé que les microbiotes humains pouvaient être classés en trois groupes appelés « entérotypes », chacun étant caractérisé par la dominance d'un genre bactérien: *Bacteroides*, (entérotype 1), *Prevotella* (entérotype 2) ou *Ruminococcus* (entérotype 3) (Arumugam et al., 2011) (**Figure 9**). De façon intéressante, cette classification ne semble cependant pas être dépendante de la localisation géographique, du genre ou de l'âge des individus. D'autres travaux ont montré une classification en seulement deux entérotypes corrélée avec le type d'alimentation. Ainsi l'entérotype dominé par le genre *Bacteroides* est associé à un régime riche en lipides et protéines animales, tandis que celui dominé par le genre *Prevotella* est lié à une alimentation riche en fibres (Wu et al., 2011). Ce concept de catégorisation en entérotypes est aujourd'hui remis en cause car même si la ré-analyse

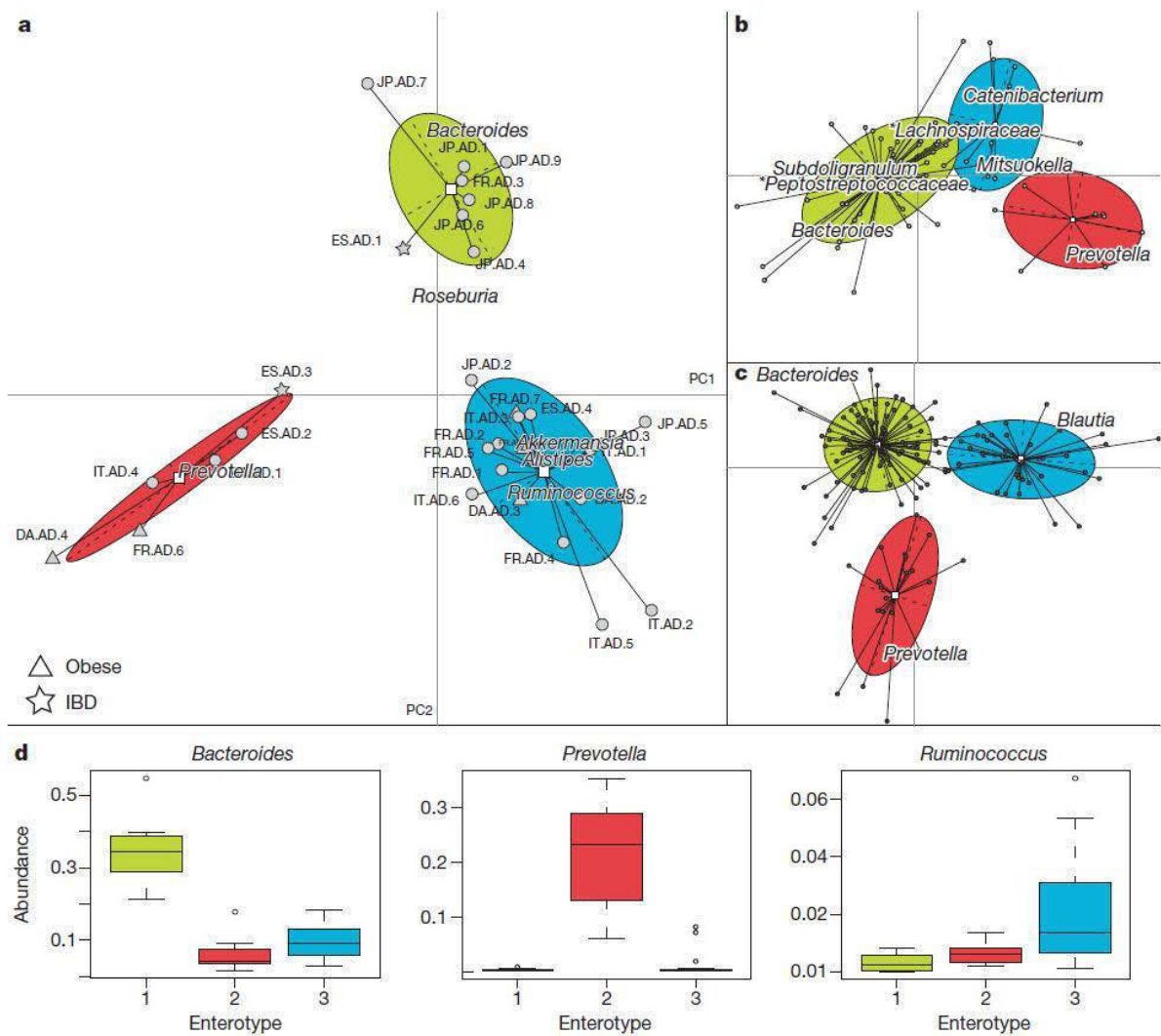


Figure 9 : Différences phylogénétiques entre les trois entérotypes *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*. a-c, Analyse PCA et clustering de la composition en genre de (a) 33 métagénomés séquencés par la technique de Sanger, (b) 85 métagénomés séquencés par la technique Illumina, (c) séquences 16S obtenues par pyroséquençage 454. d, Abondances des contributeurs principaux de chaque entérotipe déterminées à partir des données Sanger. Tirée de Arumugam *et al.*, 2011.

d'études préexistantes a permis de retrouver cette classification, d'autres travaux n'ont pas permis de la mettre en évidence (Gorvitovskaia et al., 2016; Jeffery et al., 2012a; Lozupone et al., 2012).

2.1.2. Acquisition et stabilisation des communautés microbiennes

Le fœtus a longtemps été considéré comme stérile et il était admis que la colonisation microbienne du tractus digestif ne débutait qu'à la naissance. Pourtant, l'ADN de différents taxa microbiens a été retrouvé dans le placenta, le cordon ombilical, le liquide amniotique et le méconium (premières selles du nouveau-né) (Aagaard et al., 2014; Collado et al., 2016; DiGiulio, 2012; Funkhouser and Bordenstein, 2013; Jimenez et al., 2008). La colonisation semblerait donc prendre place avant la naissance, par une translocation microbienne à travers la barrière placentaire (Arrieta et al., 2014). Récemment, certains travaux remettent en cause cette théorie, en s'appuyant notamment sur le fait que chez le rongeur, les nouvelles générations d'animaux axéniques sont issus d'hystérectomies aseptisées de rongeurs conventionnels (Lauder et al., 2016; Perez-Muñoz et al., 2017).

Le microbiote du tractus digestif du fœtus reste assez faible en termes d'abondance (10^4 à 10^5 bactéries/g de méconium), voire inexistantes dans 1/3 des cas et est dominé par le phylum des Firmicutes (70 à 95%) (Collado et al., 2016; Hansen et al., 2015). On retrouve également des Proteobacteria et Actinobacteria dont l'abondance relative varie de 20 à 30%. La présence de Bacteroidetes reste assez faible dans la plupart des cas (Moles et al., 2013). Une récente étude a également montré la présence d'archées et de microeucaryotes dans le méconium d'enfants nés par voie basse ou par césarienne (Wampach et al., 2017). L'acquisition des communautés bactériennes a, par conséquent, principalement lieu au cours de la naissance et durant l'enfance, en particulier durant les trois à cinq premières années de la vie (Cheng et al., 2015; Koenig et al., 2011; Rodríguez et al., 2015). Cette colonisation est influencée par plusieurs facteurs tels que le mode de délivrance, l'allaitement, l'alimentation ou encore l'administration d'antibiotiques (**Figure 10**).

L'intestin du nouveau-né est un environnement aérobie au sein duquel seuls des microorganismes aéro-anaérobies facultatifs peuvent se développer, comme certains membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Quelques jours après la naissance, la lumière intestinale

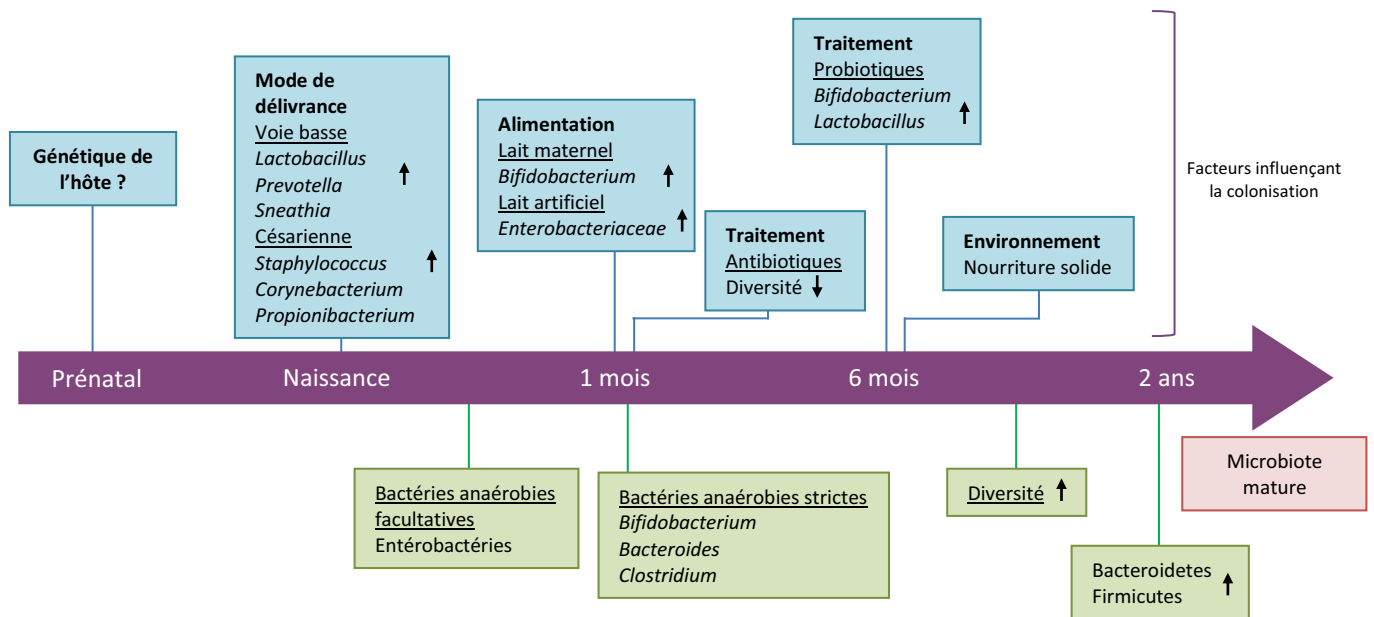


Figure 10 : Colonisation du microbiote intestinal chez l'enfant. Tirée de Verdu *et al.*, 2015.

s'appauvrit en oxygène laissant alors place à un environnement anaérobie et permettant la colonisation par des microorganismes anaérobies stricts tels que les *Bifidobacterium*, les *Clostridium* et les *Bacteroides* (Arrieta et al., 2014). Les anaérobies strictes, appartenant au phylum des Firmicutes, représentent à cette période moins de 50% de la biomasse bactérienne (Collado et al., 2016).

Le premier facteur influençant la composition du microbiote intestinal chez le nourrisson est le type d'accouchement pratiqué. Lorsque la naissance a lieu par voie basse, le microbiote intestinal du nouveau-né ressemble au microbiote vaginal de sa mère et est dominé par les genres bactériens *Lactobacillus* et *Prevotella*. Lors d'un accouchement par césarienne, le microbiote va s'apparenter au microbiote cutané de sa mère et être dominé par les genres *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* (Bäckhed et al., 2015; Dominguez-Bello et al., 2010) avec une diminution de l'abondance relative des espèces de *Bifidobacterium* et de *Bacteroides* (Adlerberth et al., 2006; Wampach et al., 2017). Cette différence semble perdurer dans le temps, puisqu'à deux ans la diversité du microbiote intestinal est toujours plus faible chez les enfants nés par césarienne par rapport aux enfants nés par voie naturelle (Jakobsson et al., 2013). Ce retard dans la colonisation et la succession des communautés microbiennes a été observé pour les trois domaines du vivant (Wampach et al., 2017).

Le type d'alimentation est un autre facteur qui influence fortement la colonisation, l'abondance et la composition du microbiote intestinal chez l'enfant. Le microbiote intestinal va être différent selon le type d'allaitement notamment car les oligosaccharides présents dans le lait maternel vont favoriser la croissance de certains taxa bactériens tels que les *Lactobacillus* ou les *Bifidobacterium* (Conlon and Bird, 2015; Zivkovic et al., 2011). De plus, le lait maternel est une source de microorganismes et il est estimé qu'un nourrisson qui consomme environ 800 mL de lait maternel par jour ingère entre 10^5 et 10^7 bactéries commensales (Heikkilä and Saris, 2003; Martín et al., 2003). Ainsi, la diversification des bactéries, archées et microeucaryotes est retardée pour les enfants nourris au lait artificiel (Wampach et al., 2017). Enfin, l'introduction d'aliments solides et variés dans le régime alimentaire de l'enfant initierait la maturation (stabilisation et diversification) du microbiote intestinal vers celui de l'adulte avec une similarité de 40 à 60% à l'âge de 3 ans (Arrieta et al., 2014; Yatsunencko et al., 2012). Enfin, en dehors de tous facteurs environnementaux, le microbiote intestinal reste relativement stable à l'âge adulte excepté au cours du vieillissement, où une diminution de la diversité bactérienne est observée chez certaines

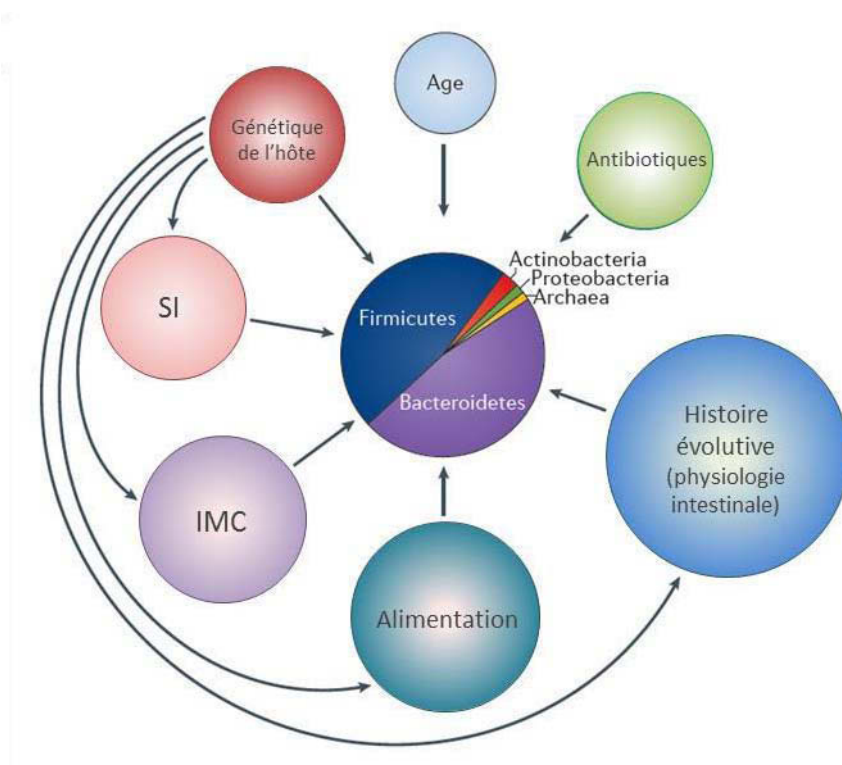


Figure 11 : Facteurs majeurs influençant la composition du microbiote intestinal humain. IMC : indice de masse corporelle ; SI : système immunitaire. Adaptée de Hall *et al.*, 2017.

personnes âgées et est à corrélérer avec un état de fragilité (Claesson et al., 2012; O'Toole and Jeffery, 2015).

2.1.3. Facteurs influençant la structure du microbiote

Comme dans tout écosystème microbien, la structure du microbiote intestinal sain peut être amenée à évoluer en raison de facteurs environnementaux qui, par la mise en place d'une pression de sélection vont favoriser l'établissement, le développement, ou le déclin de certains taxa (**Figure 11**). Parmi ces facteurs, l'alimentation ainsi que l'exposition aux xénobiotiques comme les antibiotiques sont les plus documentées (Jandhyala et al., 2015; Jin et al., 2017; Rojo et al., 2016; Sonnenburg and Bäckhed, 2016).

L'alimentation semble être le paramètre influençant le plus le microbiote intestinal. En général, une alimentation riche en fruits, légumes et fibres est associée à une plus grande richesse et diversité du microbiote intestinal avec une prévalence plus importante des Bacteroidetes tel que les genres *Prevotella* et *Bifidobacteria*. A l'inverse, les phyla Firmicutes et Proteobacteria prédominent dans un régime riche en graisses et pauvre en fibres (Heinritz et al., 2016; Ridaura et al., 2013; Trompette et al., 2014; Turnbaugh et al., 2009b; Wu et al., 2011). Cependant, une alimentation riche en fibres favorise l'abondance d'organismes métabolisant les glucides dont ceux appartenant au phylum des Firmicutes tels que les genres *Ruminococcus*, *Roseburia* et *Eubacterium* (Chung et al., 2016; David et al., 2014; Walker et al., 2011; Woting and Blaut, 2016). Ces changements de structure peuvent être très rapides et les taxa affectés par ces changements sont individus dépendants.

Parmi les xénobiotiques, de nombreux travaux ont mis en exergue l'impact des antibiotiques sur le microbiote intestinal. Les antibiotiques sont employés afin d'éliminer les bactéries pathogènes responsables de maladies infectieuses. Cependant, ils provoquent également un fort dérèglement du microbiote intestinal en créant une pression de sélection qui favorise le développement de certains microorganismes au détriment de la croissance d'autres espèces (Costello et al., 2012). Ces effets peuvent être observés à plus ou moins long terme. Jernberg et collaborateurs ont notamment montré que l'effet d'une antibiothérapie à large spectre sur la diversité des *Bacteroides* peut perdurer jusqu'à deux ans après la prise d'antibiotiques. (Jernberg et al., 2007). Les effets perturbateurs d'une antibiothérapie sont amplifiés lors du processus de colonisation du tractus digestif chez l'enfant. Une surutilisation

de molécules à large spectre (généralement ampicilline et gentamicine) peut modifier le microbiote immature de l'enfant, le prédisposant précocement à certaines pathologies métaboliques comme l'obésité (Korpela et al., 2016; Korpela and de Vos, 2016; Langdon et al., 2016). Enfin, la préoccupation majeure relative aux antibiotiques à large spectre, en dehors de l'altération de la diversité microbienne intestinale, est le phénomène de propagation de la résistance par transfert de gènes (Frost et al., 2005; Ochman et al., 2000). Smillie et collaborateurs ont notamment observé 25 fois plus de transfert de gènes horizontal entre les bactéries commensales de l'Homme que parmi diverses communautés microbiennes environnementales, favorisant ainsi l'apparition rapide de nouvelles souches multi résistantes aux antibiotiques (Smillie et al., 2011). Une ségrégation géographique des populations peut notamment être observée par un enrichissement spécifique des gènes de résistance aux antibiotiques (Hu et al., 2013; Li et al., 2014). Li et collaborateurs ont notamment mis en évidence une prévalence plus importante des gènes de résistance à la pénicilline dans la population Danoise contre une plus forte prévalence des gènes de multi-résistance aux antibiotiques dans la population Chinoise (Li et al., 2014).

2.2. Méthodes d'analyse du microbiote intestinal

2.2.1. *Analyses de la structure du microbiote*

Les premières descriptions du microbiote intestinal ont été réalisées par des approches culturales à partir d'échantillons de selles dès le début du XX^{ème} siècle. Même si ces techniques culturales ont été largement améliorées depuis les années 1970 (*e.g.* cultures anaérobies, milieux sélectifs) (Moore and Holdeman, 1974), elles restent fastidieuses et ne permettent qu'une vision limitée de la composition du microbiote intestinal. Il est estimé à ce jour, qu'environ 50% des espèces détectées par des approches moléculaires sont cultivées (Lagkouvardos et al., 2017), bien que cette fraction fût longtemps établie proche des 30% (Eckburg et al., 2005; Fraher et al., 2012; Turnbaugh et al., 2009a).

Dans les années 1990, l'avènement des outils moléculaires a révolutionné notre compréhension du microbiote intestinal. Ces techniques moléculaires se sont tout d'abord basées sur l'analyse du gène exprimant l'ARN ribosomique (ARNr) 16S afin de cibler les populations de bactéries et d'archées. Ce gène est largement utilisé comme marqueur phylogénétique de par (i) son ubiquité, (ii) la présence de domaines conservés facilitant

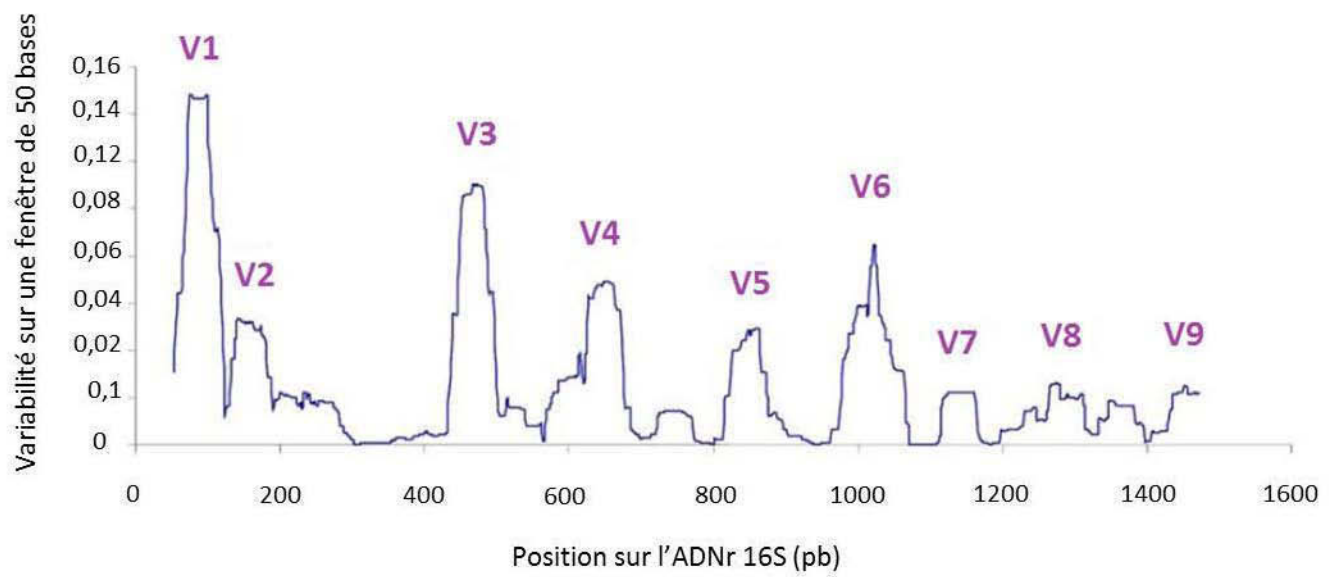


Figure 12 : Régions hypervariables du gène exprimant l'ARNr 16S. Tirée de Bodilis *et al.*, 2012.

l'isolement de séquences cibles *via* des amorces dites « universelles » et permettant également de discriminer les organismes à un haut niveau taxinomique, (ii) la présence de domaines variables permettant de discriminer des taxons spécifiques (**Figure 12**). De plus, l'ADNr 16S étant le marqueur phylogénétique le plus utilisé, il est fortement représenté dans les bases de données facilitant ainsi l'affiliation des séquences. A l'heure actuelle, l'affiliation des séquences ribosomiques est principalement réalisée à partir des ressources SILVA, RDP, Greengenes ou encore NCBI (Balvočiūtė and Huson, 2017).

Les techniques d'empreintes génétiques

Les premières approches moléculaires pour l'étude de la diversité du microbiote intestinal ont reposé sur les techniques dites d'empreintes génétiques, qui permettent de séparer sur gel les amplicons du gène exprimant l'ARNr 16S. Ces approches incluent l'électrophorèse en gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), en gradient de température (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE), ou encore l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments terminaux (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisme, T-RFLP). Les profils électrophorétiques obtenus permettent alors de comparer rapidement les différences de structures du microbiote intestinal (Marsh, 1999; Noor et al., 2010; Zoetendal et al., 1998). Cependant, ces approches d'empreinte génétique ne permettent pas une identification taxinomique directe des communautés bactériennes et ne révèlent qu'une faible proportion de la diversité. Ces approches, étant devenues obsolètes dans l'étude des communautés microbiennes, ne seront pas plus amplement détaillées dans ce manuscrit.

Les approches ciblées

D'autres outils moléculaires ont été développés utilisant l'hybridation entre une sonde spécifique et une région de la molécule cible pour étudier la composition du microbiote intestinal. On retrouve dans ces outils, la technique FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) ainsi que l'approche biopuce, reposant sur la détection d'un signal fluorescent. L'approche FISH restreint l'exploration de la structure du microbiote par un nombre limité de sondes utilisables en même temps et ne permet pas la mise en évidence de taxa inconnus limitant ainsi son utilisation au suivi de groupes microbiens spécifiques et non à une description de la diversité et de la composition du microbiote.

Différentes biopuces phylogénétiques ont été mises au point pour étudier le microbiote intestinal comme la HITChip (Human Intestinal Tract Chip) (Rajilić-Stojanović et al., 2009),

Tableau 2 : Techniques haut débit utilisées pour caractériser le microbiote intestinal. Adapté de Fraher *et al.*, 2012 ; Lepage *et al.*, 2013 ; Moya and Ferrer, 2016 et Rojo *et al.*, 2016.

Technique	Description	Avantages	Inconvénients
Biopuces (phylogénétiques et fonctionnelles)	Sondes oligonucléotidiques s'hybridant avec des séquences nucléotidiques complémentaires cibles (ADNg, ADNc, produits PCR) marquées par un fluorochrome.	- Identification phylogénétique des taxa présents (ADNg) ou des taxa actifs (ADNc) dans la communauté. - Identification des fonctions potentielles (ADNg) ou exprimées (ADNc) dans la communauté. Quantitatif, rapide, réduction de la complexité.	Hybridations croisées, les espèces présentes en faible abondance peuvent être difficiles à détecter, difficulté à identifier les nouveaux gènes.
Métabarcoding 16S	Séquençage massif d'amplicons partiels: - du gène exprimant l'ARNr16S (ADNg) - de l'ARNr16S (ADNc).	Identification phylogénétique des taxa présents (ADNg) ou des taxa actifs (ADNc) dans la communauté, quantitatif, rapide, identification de nouvelles espèces possible.	Biais PCR, non détection des taxa rares, affiliation difficile en dessous du genre voire de la famille.
Métagénomique (structurale et fonctionnelle)	Séquençage massif de l'ensemble des gènes du microbiote.	Identification de la diversité, de la composition et du potentiel fonctionnel du microbiote, quantitatif, pas de biais PCR, identification de nouvelles espèces et de nouveaux gènes possibles.	Coûteux, grande profondeur de séquençage nécessaire pour accéder aux microorganismes non dominants, difficultés d'analyse des données générées et nécessité de stockage et puissance de calcul importantes.
Culturomique	Mise en culture de microbiotes fécaux sous diverses combinaisons de paramètres de culture, identification des colonies isolées.	Accès aux espèces minoritaires du microbiote, identification précise des colonies isolées par séquençage ou par MALDI-TOF-MS, reconstruction de génomes facilitée.	Technique fastidieuse, diversité limitée aux microorganismes cultivés.
Méatranscriptomique (structurale et fonctionnelle)	Séquençage massif des transcrits (ARNr, ARNm) dans une condition physiologique donnée. Profil d'expression des gènes.	Identification phylogénétique des communautés actives ainsi que des fonctions exprimées dans la communauté microbienne, quantitatif, pas de biais PCR, identification de nouvelles espèces et de nouveaux gènes possibles.	Instabilité des ARN, nombreuses étapes de purification, faible proportion des ARNm nécessitant une déplétion des ARNr pour l'étude des fonctions du microbiote, choix des outils de traitement des données limité à l'heure actuelle.
Métabotomique	Mise en présence et identification des protéines dans une condition physiologique donnée.	Niveau fonctionnel haut (gènes>transcrits>protéines), peu de matériel biologique nécessaire.	Couverture limitée du protéome, nombreuses protéines non encore identifiées dans les bases de données, stabilité hétérogène des protéines, traitement des données fastidieux sur des environnements complexes/riches comme le microbiote intestinal. Absence d'identification des microorganismes.
Métabolomique	Mise en présence et identification des métabolites dans une condition physiologique donnée.	Niveau fonctionnel haut (gènes>transcrits>protéines>métabolites), peu de matériel biologique nécessaire.	Nombreux métabolites non encore identifiées dans les bases de données, bases de données de références manquantes, identification précise des composés difficile, traitement des données laborieux. Absence d'identification des microorganismes.

au laboratoire nous avons développé la HuGChip (Human Gut Chip) (Tottey et al., 2013) et plus récemment le groupe de Zhou aux USA a conçu la HuMiChip2 (Human Microbiome Chip2) (Tu et al., 2017). Ces approches sont quantitatives et permettent une identification taxinomique des populations composant le microbiote intestinal (**Tableau 2**). Le plus souvent seuls les taxa déjà décrits dans les bases de données seront recherchés, bien que certaines biopuces peuvent présenter des sondes exploratoires permettant l'identification de nouveaux taxa (Dugat-Bony et al., 2012). Ces techniques sont principalement utilisées pour réaliser des analyses comparatives de la structure du microbiote (Bezirtzoglou et al., 2011; de Goffau et al., 2014; Tu et al., 2017).

Une quantification précise des populations microbiennes est possible grâce à l'approche de PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR). Cette technique utilise des amorces spécifiques pouvant cibler des populations bactériennes à différents niveaux taxinomiques. Tous les systèmes de qPCR reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Deux technologies sont majoritairement utilisées pour l'émission du signal fluorescent: les agents se liant à l'ADN double brin (*e.g.* SYBR Green) et l'hydrolyse de sondes fluorescentes de type Taqman (Mariat et al., 2009; Poitras and Houde, 2002; Sokol et al., 2008). Cependant, cet outil ne permet pas de détecter de nouveaux taxa microbiens, puisque la détermination des amorces de qPCR nécessite de connaître la séquence du gène exprimant l'ARNr 16S des taxa ciblés. Enfin, l'approche qPCR reste employée pour l'étude de quelques taxa ciblés mais ne peut être utilisée pour l'étude de la diversité et de la composition du microbiote.

Les approches non-ciblées

L'étude d'un écosystème aussi complexe que le microbiote intestinal humain nécessite une description plus précise des populations microbiennes qui le composent. Le séquençage du gène exprimant l'ARNr 16S permet d'identifier les microorganismes déjà décrits mais également de mettre en évidence de nouveaux taxa. Jusque dans les années 1990, il était nécessaire de cloner les amplicons du gène exprimant l'ARNr 16S pour pouvoir individualiser chaque molécule et assurer son séquençage par la méthode Sanger. Cette approche dite de clonage-séquençage (séquençage de première génération) étant coûteuse et laborieuse, il a fallu attendre le développement des techniques de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing, NGS) pour que l'exploration du microbiote intestinal se généralise.

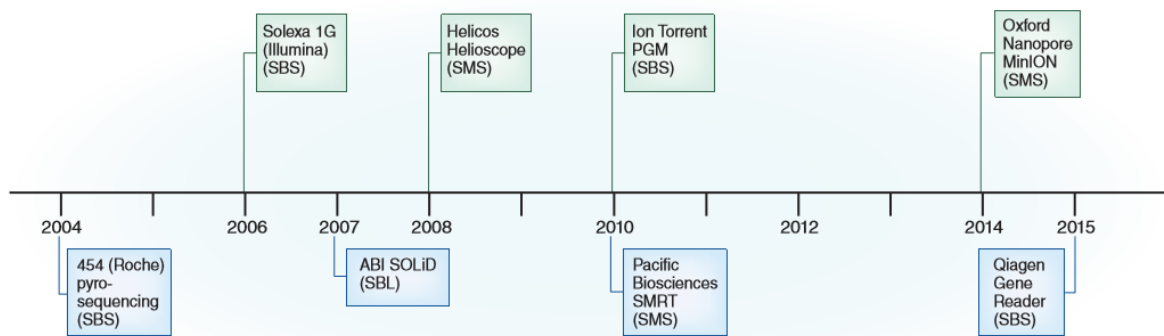


Figure 13 : Plateformes NGS introduites depuis les années 2000. SBS : séquençage par synthèse ; SMS : séquençage de molécule unique ; SBL : séquençage par ligation. Tirée de Mardis *et al.*, 2017.

Les NGS ont été développées et commercialisées dans les années 2000 et regroupent des plateformes dites de seconde et de troisième génération (**Figure 13**). Ces différentes plateformes présentent des performances en termes de longueur de lecture, rendement, taux d'erreur qui peuvent différer fortement (Goodwin et al., 2016). La plupart des études sur le microbiote intestinal ont été réalisées avec les technologies Roche 454, SOLiD et Illumina. Le pyroséquençage 454 génère des séquences dont la longueur permet de couvrir, de manière individuelle, la plupart des régions variables de l'ADNr 16S (Claesson et al., 2009). Il a donc été largement utilisé pour décrire ou comparer la composition et l'abondance des populations des communautés bactériennes intestinales (Brim et al., 2013; Durbán et al., 2012; Jeffery et al., 2012b). Cependant, les progrès constants et le développement de nouvelles techniques de séquençage haut-débit ont permis d'augmenter la profondeur de séquençage à des coûts de plus en plus réduits. C'est notamment le cas de la technologie Illumina qui, grâce au séquençage « paired-end », génère des séquences de longueur comparable au pyroséquençage mais avec un taux d'erreur plus faible (Rodrigue et al., 2010). Les différentes avancées technologiques réalisées par Illumina ainsi que son coût réduit font que cette technologie domine à l'heure actuelle le marché du séquençage haut débit (Reuter et al., 2015). Enfin, bien que la technologie de séquençage SOLiD présente un taux d'erreur très bas, cette technologie est moins répandue du fait de longueur de séquences trop courtes, limitant ainsi une assignation précise des séquences (Hodkinson and Grice, 2015; Mitra et al., 2013). Le séquençage a considérablement étendu la description des microbiotes au regard d'autres approches. Cependant, l'identification des populations microbiennes est établie le plus généralement sur l'étude d'une portion du gène exprimant l'ARNr 16S (metabarcoding), limitant souvent l'affiliation des séquences au niveau du genre voire de la famille, sans compter les biais liés à la technique PCR (**Tableau 2**) (Brooks et al., 2015; Kanagawa, 2003). Récemment, une approche développée au sein du laboratoire, basée sur une méthode de capture de gènes en solution, permet l'enrichissement sélectif d'une région génomique spécifique (biomarqueur phylogénétique ou fonctionnel). Appliquée aux gènes exprimant les ARNr 16 et 18S, cette technique a montré un taux d'enrichissement supérieur à 90% (Gasc et al., 2016). De par cet enrichissement, cette approche permet ainsi l'identification des populations rares de l'environnement étudié, mais permet également une affiliation des séquences précises par la reconstruction complète du biomarqueur d'intérêt voire également de ses régions flanquantes (Denonfoux et al., 2013; Gasc et al., 2016). Cette approche est en cours d'application sur le microbiote intestinal.

Le développement de la métagénomique, approche dans laquelle l'ensemble des gènes des microorganismes présents dans un échantillon est séquencé, permet d'obtenir une vision globale et sans *a priori* du microbiote intestinal (**Tableau 2**). Il est possible de reconstruire les génomes des organismes dominants et d'établir des bases de données de gènes qui restent cependant le plus souvent incomplètes (Feldbauer et al., 2015). Il est cependant difficile d'identifier tous les microorganismes de ce type d'écosystèmes complexes. Des approches bioinformatiques tentent de reconstruire les ADNr 16S complets afin d'obtenir une description des structures des procaryotes plus fine que le metabarcoding (Poretzky et al., 2014). Cependant, du fait de la faible proportion du gène exprimant l'ARNr 16S dans les métagénomes et d'une très grande diversité du microbiote intestinal, cette reconstruction demeure limitée. Ainsi, pour obtenir une description exhaustive (détection des taxons rares), il faudrait conduire des approches de métagénomique avec une grande profondeur de séquençage qui restent très coûteuses et donc encore inaccessibles (Gasc et al., 2015). Plus récemment, l'utilisation du séquençage de troisième génération (génération de séquences uniques de plusieurs milliers de kb) appliquée au metabarcoding 16S a été développée pour tenter d'améliorer la description des structures des communautés microbiennes (Shin et al., 2016; Singer et al., 2016). Cependant, les biais de PCR persistent conduisant en une description erronée de la diversité sans parler de la mauvaise qualité des séquences. L'approche de capture de gènes appliquée à ce type de biomarqueur permet de dépasser ces limites assurant une meilleure description de la diversité microbienne (Gasc et al., 2016).

Bien que la métatranscriptomique (étude des transcrits), soit une approche de plus en plus généralisée dans l'étude des fonctions du microbiote, son utilisation pour la description de la composition des communautés actives reste mineure (**Tableau 2**) (Gosalbes et al., 2011; Jiang et al., 2016; Maurice et al., 2013). Pourtant, cette approche, couplée à la métagénomique, a notamment permis de mettre en évidence des taxa transcriptionnellement actifs bien que très peu abondants dans le milieu (Turnbaugh et al., 2010). Certains logiciels d'analyse métatranscriptomique permettent à la fois une affiliation taxinomique et fonctionnelle du microbiote intestinal, l'affiliation taxinomique pouvant être réalisée à partir des ARNr (Martinez et al., 2016) ou des ARN messagers (ARNm) (Huson and Weber, 2013).

L'ensemble des outils moléculaires appliqués au microbiote intestinal a permis d'améliorer notre connaissance de cet écosystème complexe. La métagénomique permet une exploration taxinomique et fonctionnelle du microbiote intestinal, mais la profondeur de séquençage qu'elle nécessite engendre des coûts encore très élevés sans compter les

difficultés à traiter les masses de données de séquences. De nombreuses études menées sur le microbiote intestinal se limitent donc encore en une description phylogénétique basée sur l'amplification d'une portion du gène exprimant l'ARNr 16S (metabarcoding 16S, qPCR).

Ces 5 dernières années, une nouvelle approche dite de « culturomique » a été proposée pour l'étude du microbiote intestinal (**Tableau 2**) (Lagier et al., 2012). Cette stratégie, basée sur l'utilisation d'une combinaison de paramètres de culture (*e.g.* atmosphère, température et temps d'incubation, composition du milieu de culture) a pour objectif de mimer au plus près les conditions physico-chimiques de l'intestin. Dans l'étude de Lagier et collaborateurs, 212 conditions de culture ont été testées sur les selles de trois individus. L'identification de 32500 colonies bactériennes isolées a été réalisée par MALDI-TOF-MS et par amplification et séquençage du gène exprimant l'ARNr 16S. En parallèle, les trois mêmes échantillons ont également été analysés par metabarcoding 16S (pyroséquençage). La culturomique a permis l'identification de 340 espèces bactériennes appartenant à 7 phyla dont 174 espèces non décrites précédemment dans le tractus intestinal humain. L'analyse metabarcoding 16S a, quant à elle, permis d'identifier 698 espèces dont seulement 51 d'entre elles ont également été détectées par l'approche de culture (Lagier et al., 2012). Les auteurs proposent ainsi la culturomique comme technique complémentaire au séquençage massif afin de mettre en évidence des espèces minoritaires du microbiote intestinal et ainsi pallier au biais de profondeur de séquençage. Notons également que les approches de la cellule isolée (single cell) permettent d'accéder à de nouvelles connaissances mais restent difficiles à mettre en place et présentent là encore un certain nombre de limites (Gasc et al., 2015).

2.2.2. Analyses des fonctions du microbiote

Bien que les capacités fonctionnelles du microbiote puissent être évaluées par des approches ciblées (mise en présence et/ou quantification d'un marqueur fonctionnel d'intérêt), la très grande majorité des travaux est établie sur des approches à haut débit afin de comprendre les interactions métaboliques microbiote-microbiote et microbiote-hôte (**Tableau 2**).

La métagénomique est, à l'heure actuelle, l'approche majoritairement employée pour mettre en évidence les capacités métaboliques du microbiote intestinal (abondance relative des espèces et de leurs gènes) (Igai et al., 2016; Lloyd-Price et al., 2016; Montella et al., 2017;

Zhernakova et al., 2016). Dans ce sens, de nombreux outils ont été développés pour le traitement des données de métagénomique tel que MG-RAST (Meyer et al., 2008), MEGAN (Huson et al., 2016), IMG/M (Markowitz et al., 2008), HUMAnN (Abubucker et al., 2012), the R package ShotgunFunctionalizeR (Kristiansson et al., 2009) et plus récemment ShortBRED (Kaminski et al., 2015). La richesse du microbiote intestinal est caractérisée par la diversité des espèces présentes mais également par les gènes fonctionnels microbiens identifiés (Qin et al., 2010). Par cette approche, le microbiote de 123 et 169 individus Danois, respectivement sains et obèses, a été catégorisé soit comme comportant un nombre élevé de gènes microbiens (High Gene Count, HGC) soit comportant un faible nombre de gènes (Low Gene Count, LGC). Les individus HGC sont généralement considérés comme ayant (i) un plus grand répertoire de fonctions métaboliques microbiennes, (ii) un microbiote fonctionnellement plus robuste, (iii) ainsi qu'une meilleure santé générale incluant une faible prévalence à l'obésité et aux désordres métaboliques (Le Chatelier et al., 2013). La métagénomique a été largement utilisée pour l'étude des CAZymes (Carbohydrate Active enZymes), du fait du rôle majeur du microbiote dans la dégradation des fibres alimentaires. Par cette approche, une grande diversité d'enzymes a pu être mise en évidence (Montella et al., 2017; Tasse et al., 2010). Bien que la métagénomique soit un outil puissant pour la découverte de nouvelles fonctions microbiennes, la simple présence des gènes n'informe pas sur leurs profils d'expression (Wang et al., 2015).

Les études des transcrits (métatranscriptomique), des protéines (métaprotéomique) ou des métabolites (métabolomique) deviennent de plus en plus populaires dans les interactions microbiote-microbiote et microbiote-hôte (Franzosa et al., 2014; Heinken and Thiele, 2015; Morgan and Huttenhower, 2014; Schaubeck et al., 2016; Yen et al., 2015). Ces dernières approches, d'un niveau hiérarchique plus élevé que les gènes présents dans les génomes, donnent une image hautement résolutive des interactions microbiote-hôte nécessaire à la compréhension du rôle du microbiote dans le métabolisme de l'hôte et des pathologies (Franzosa et al., 2015).

La métatranscriptomique est basée sur le séquençage de l'ensemble des ARN d'un échantillon (RNA-Seq). Les ARN d'une cellule sont représentés en très grande partie (près de 90%) par les ARNr, le reste étant des ARNm ou encore des ARN de transfert (ARNt) et de petits ARN non codants (Blazewicz et al., 2013). Si l'ensemble des ARN est séquençé, la grande majorité des lectures correspondra aux ARNr. Ainsi, l'approche RNA-Seq nécessite une étape de déplétion des ARNr pour enrichir la fraction des ARNm et ainsi accéder

préférentiellement aux fonctions réalisées. Ces derniers seront ensuite reverse transcrits en ADN complémentaire (ADNc) puis séquencés *via* les plateformes NGS (Bao et al., 2015; Giannoukos et al., 2012; He et al., 2010). Gosalbes et collaborateurs ont réalisé une analyse métatranscriptomique du microbiote fécal de 10 individus sains. Les résultats obtenus sont similaires de ceux obtenus par Turnbaugh *et al.* en 2009, où le métabolisme et le transport des glucides, la production et la conversion d'énergie ainsi que la synthèse des composés cellulaires sont les voies métaboliques retrouvées comme les plus abondantes dans les différents métatranscriptomes (Gosalbes et al., 2011; Turnbaugh et al., 2009a). Récemment, la métatranscriptomique a permis également l'identification de nouveaux ARN non codants, tel que les petits ARN (sRNA), dont le rôle de régulation dans certains processus biologiques (quorum sensing, réponse au stress) devient de plus en plus évident (Abram, 2015). L'étude des transcrits n'est pas sans difficulté. La faible demi-vie des ARNm demande une prise en charge rapide des échantillons et entraîne une difficulté de la détection des réponses à court terme aux changements environnementaux. Ainsi l'extrapolation des résultats obtenus à partir de l'analyse transcriptionnelle des échantillons fécaux aux potentielles fonctions coliques présente des limites.

La métaprotéomique peut apporter des informations supplémentaires concernant les modifications post-traductionnelles ainsi que la localisation des protéines effectrices (Xiong et al., 2015). Cependant, cette technologie est en développement dans l'étude du microbiote intestinal et les protocoles utilisés diffèrent d'une étude à l'autre limitant les possibilités de comparaison (Kolmeder and de Vos, 2014). De plus, à ce jour, les études réalisées comportent un faible nombre d'individus (n=1-3) limitant encore une fois l'interprétation et les conclusions tirées de ces données.

La métabolomique a émergé comme un système puissant pour la détection de composés de faibles poids moléculaires. Des milliers de composés dérivent de produits endogènes et exogènes métabolisés par le microbiote intestinal. Ainsi les métabolites produits sont le reflet le plus direct de l'activité microbienne. Techniquement, la métabolomique peut être appliquée à divers échantillons biologiques tels que les biofluides (féces, urine, sang, salive) mais également les tissus comme les intestins, le foie, ou le cerveau. Deux plateformes sont majoritairement utilisées pour l'identification des composés, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM) (Emwas, 2015; Lenz and Wilson, 2007). La métabolomique a notamment été appliquée à l'étude du microbiote intestinal murin de

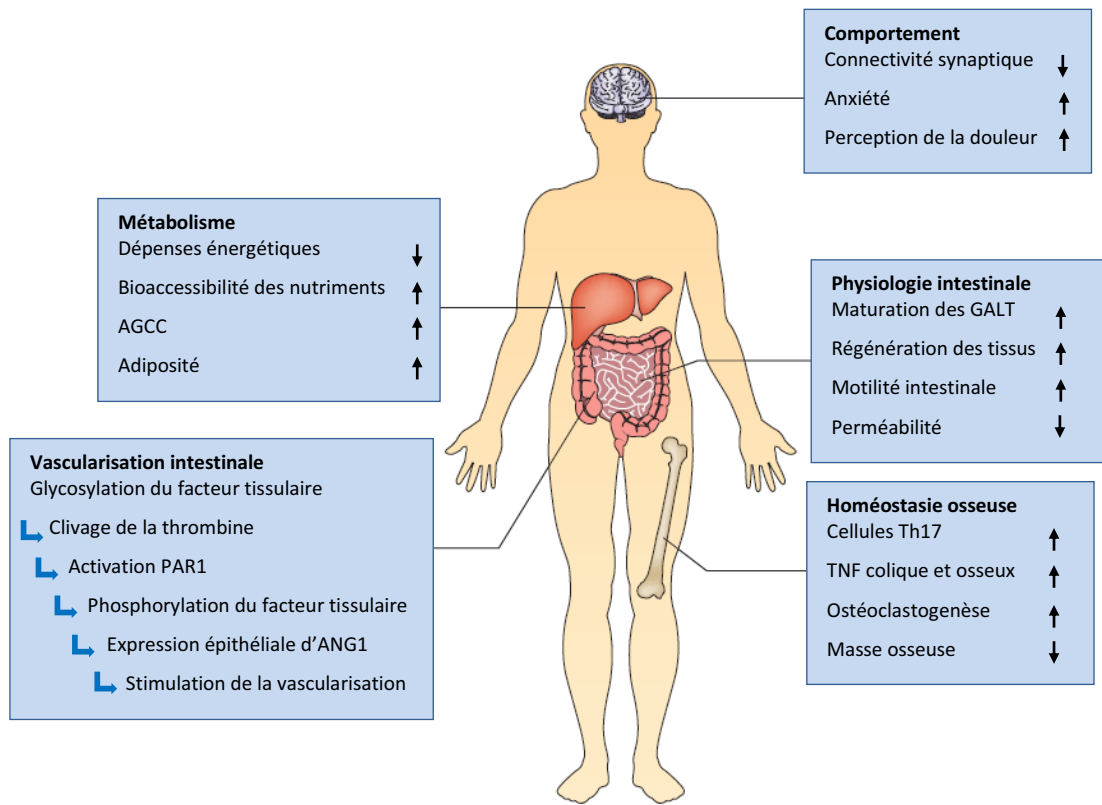


Figure 14 : Implication du microbiote intestinal dans de nombreuses fonctions nutritionnelles, physiologiques, immunitaires et neurologiques chez l'Homme. AGCC : acides gras à chaîne courte ; GALT : tissu lymphoïde associé au tube digestif ; PAR1 : proteinase-activated receptor 1 ; ANG1 : angiopoietin 1 ; TNF : facteur de nécrose tumorale. Tirée de Sommer and Bäckhed, 2013.

modèles gnotobiotiques ou traités aux antibiotiques mais également au microbiote de l'Homme (Kok et al., 2013; Marcobal et al., 2015; Watanabe et al., 2006; Wikoff et al., 2009).

La principale limite liée aux analyses métaprotéomiques et métabolomiques est la complexité/richeesse des signaux protéiques/métaboliques qui émanent d'un environnement aussi diversifié que le microbiote intestinal et qui rend ainsi le traitement des données long et fastidieux. De plus, ces approches sont encore peu développées dans l'étude du microbiote intestinal. Le manque d'information et d'annotation dans les bases de données ne permet souvent pas l'analyse la plus exhaustive possible des protéines ou métabolites extraits. Enfin, toutes les approches haut débit citées précédemment nécessitent des compétences humaines spécifiques ainsi que des ressources matérielles importantes pour le traitement et le stockage des données (Gevers et al., 2012).

2.3. Fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal fait partie intégrante du tractus digestif de l'hôte et joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie. Il a notamment été considéré comme un « espace métabolique intégré » (Blaser et al., 2013), comportant 150 fois plus de gènes microbiens que le génome humain, avec près de 3,3 millions de gènes microbiens non-redondants listés en 2010 par le consortium MetaHIT (Qin et al., 2010). A ce jour, le plus grand catalogue de gènes du microbiote intestinal (établi à partir de 1267 mégagénomés issus d'Amérique, d'Europe et de Chine) recense près de 9,8 millions de gènes dont un peu moins de 300000 seraient partagés par plus de 50% des individus (Li et al., 2014). Le microbiote intestinal possède ainsi un répertoire métabolique extensif, spécifique mais complémentaire des activités enzymatiques de l'hôte. Près de 40% des petites molécules retrouvées dans le sang sont issues du métabolisme microbien (Saad et al., 2012). Ces molécules sont donc assimilables par l'hôte et peuvent ainsi être utilisées pour son propre métabolisme. L'implication du microbiote dans de nombreuses fonctions nutritionnelles, physiologiques et immunitaires fait de lui un acteur clé de la santé humaine (**Figure 14**).

L'influence exercée par le microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte a été principalement mise en évidence par l'analyse d'études comparatives entre des animaux conventionnels et des animaux dépourvus de microbiote intestinal dits axéniques. Ces animaux sans microorganismes présentent un certain nombre d'anomalies physiologiques qui

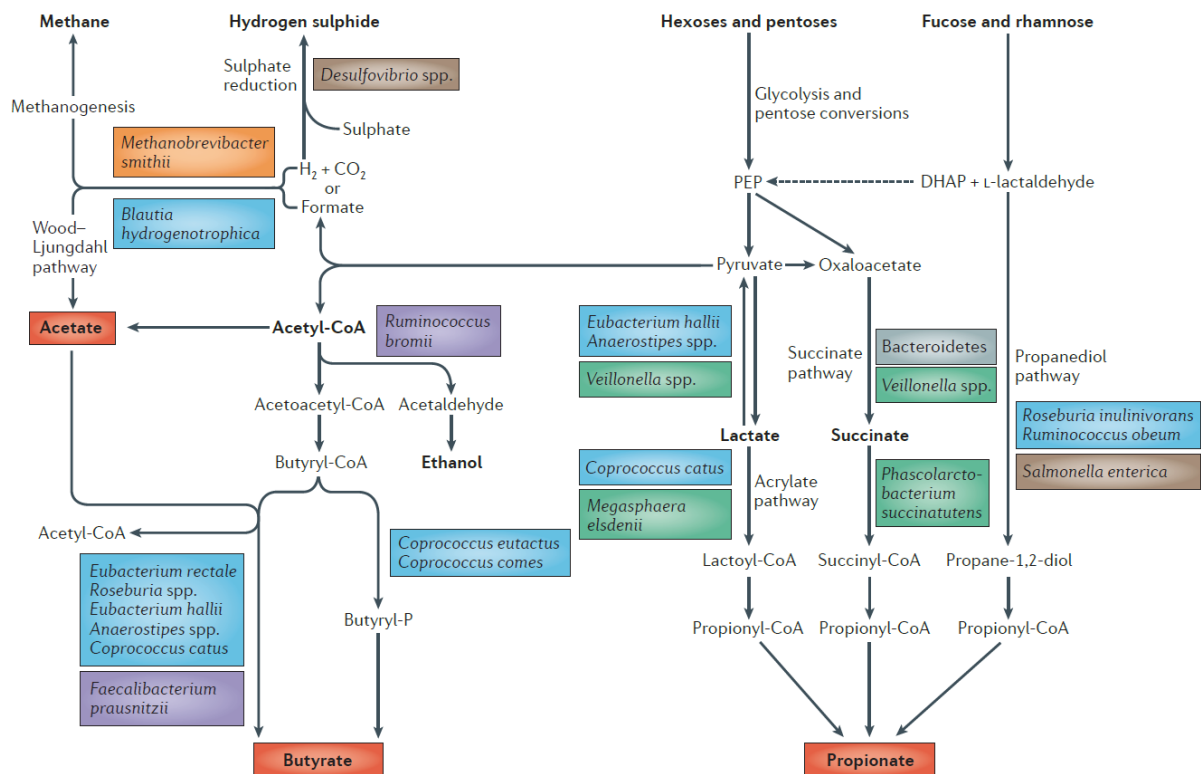


Figure 15 : Voies métaboliques impliquées dans la production des métabolites microbiens majeurs issus de la fermentation des glucides. Les voies sont détaillées à partir des sucres simples « oses ». Les principaux taxa réalisant ces conversions sont les archées en orange, les Bacteroidetes en gris, les *Lachnospiraceae* (Firmicutes) en bleu, les *Ruminococcaceae* (Firmicutes) en violet, les *Negativicutes* (Firmicutes) en vert et les Proteobacteria en marron. Tirée de Louis *et al.*, 2014.

peuvent être corrigées en quelques semaines par l'inoculation d'un microbiote complexe, et parfois, d'une seule espèce bactérienne (Mazmanian et al., 2005; Stappenbeck et al., 2002).

2.3.1. Fonctions métaboliques liées à la nutrition

Une des fonctions majeures du microbiote dans le maintien de la physiologie de l'hôte est le métabolisme des substrats non digérés dans la partie haute du tractus digestif. Ces substrats peuvent être d'origine endogène (*e.g.* sécrétions biliaires, mucus, cellules épithéliales desquamées) ou exogène (*e.g.* substrats alimentaires, xénobiotiques) au TGI. La fermentation des glucides et protéines permet notamment d'extraire davantage d'énergie pour l'hôte à partir des aliments consommés (Bernalier-Donadille, 2010; Flint et al., 2012). Une fraction des glucides échappe à la digestion dans le tractus digestif supérieur car les unités monosaccharidiques composant ces molécules sont reliées entre elles par des liaisons chimiques qui ne peuvent pas être dégradées par les enzymes digestives humaines (Rajilić-Stojanović, 2013). Ces glucides complexes sont majoritairement composés d'amidon résistant et de polysaccharides provenant de céréales, de fruits et de légumes. Ce sont principalement les genres *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* et *Roseburia* qui sont impliqués dans la fibrolyse de ces composés. Les enzymes intervenant dans le clivage de ces molécules complexes, les CAZymes, sont des glycosyltransférases, glycoside hydrolases, polysaccharide lyases et carbohydrates estérases. Les capacités de dégradation des glucides par le microbiote sont immenses. A titre d'exemple, le génome de l'espèce *Bacteroides thetaiotaomicron* (retrouvée chez près de 50% des adultes (HMP, 2012) code pour 290 glycoside hydrolases contre 98 codées par le génome humain (<http://www.cazy.org/b5136.html>).

Les principaux produits de la fermentation microbienne des glucides sont des gaz (hydrogène, dioxyde de carbone, et pour certains individus du méthane) et des acides gras à chaîne courte (AGCC) (**Figure 15**). Les trois AGCC les plus abondants sont l'acétate, le propionate, et le butyrate, présents dans des rapports molaires allant de 3:1:1 à 10:2:1 en fonction du régime alimentaire et donc des substrats disponibles au niveau colique (Louis et al., 2014; Rowland et al., 2017). Les AGCC sont rapidement absorbés par la muqueuse colique où ils jouent un rôle primordial dans le métabolisme de l'hôte. Ils servent de source d'énergie pour les cellules intestinales mais aussi pour les cellules rénales, cardiaques ou encore musculaires (Rajilić-Stojanović, 2013). Ils ont également des effets sur le pH, le temps

de transit, la physiologie épithéliale et le système immunitaire (SI) du côlon. De plus, ils jouent un rôle protecteur contre l'invasion par des pathogènes (Fukuda et al., 2011; Furusawa et al., 2013; Samuel et al., 2008; Verbeke et al., 2015). Parmi les AGCC majoritaires, le butyrate représente la source d'énergie principale pour les colonocytes (plus de 70%) tandis que l'acétate et le propionate servent de substrats pour la lipogenèse et la néoglucogenèse au niveau hépatique (Tremaroli and Bäckhed, 2012). Les bactéries lactiques peuvent aussi métaboliser les glucides au niveau intestinal, en particulier les espèces appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et *Enterococcus* (Bernalier-Donadille, 2010). Ces bactéries produisent du lactate qui sera très largement utilisé par les bactéries intestinales pour produire du propionate ou du butyrate.

Les bactéries intestinales peuvent également métaboliser des substrats protéiques, qui représentent la principale source d'azote au niveau du côlon. De nombreuses espèces bactériennes, appartenant notamment aux genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, possèdent une activité protéolytique (Bernalier-Donadille, 2010). En plus des protéines dérivées de l'alimentation, les sécrétions pancréatiques, biliaires, le mucus ainsi que les cellules épithéliales issues de la desquamation de l'épithélium contiennent une quantité non négligeable de protéines dérivées de l'hôte disponibles pour la fermentation microbienne. La fermentation des protéines intervient surtout dans la partie distale du côlon et aboutit à la sécrétion d'acides aminés (Rajilić-Stojanović, 2013). Ces derniers peuvent être utilisés comme source d'énergie par les bactéries ne pouvant pas métaboliser les glucides, comme certaines espèces des genres *Veillonella*, *Clostridium* ou encore *Eubacterium*. Ces acides aminés peuvent aussi être utilisés par les bactéries pour produire des AGCC (Bernalier-Donadille, 2010). Cependant, la métabolisation des protéines par les bactéries intestinales, notamment les *Clostridium*, peut également aboutir à la formation de composés toxiques tels que l'ammoniaque, des amines ou encore des phénols (Rajilić-Stojanović, 2013; Rowland et al., 2017). Les composés ammoniaqués et phénoliques ont notamment été associés à des pathologies humaines comme le cancer colorectal (Bernalier-Donadille, 2010).

Le microbiote intestinal participe aussi au métabolisme des lipides principalement *via* le cycle entéro-hépatique des acides biliaires. Ces derniers sont produits à partir du cholestérol au niveau du foie, où ils sont conjugués avec des molécules de taurine ou de glycine, puis sécrétés dans la bile et transportés vers l'intestin. Au niveau intestinal, ces acides biliaires dits primaires facilitent le métabolisme des lipides alimentaires et l'absorption intestinale des

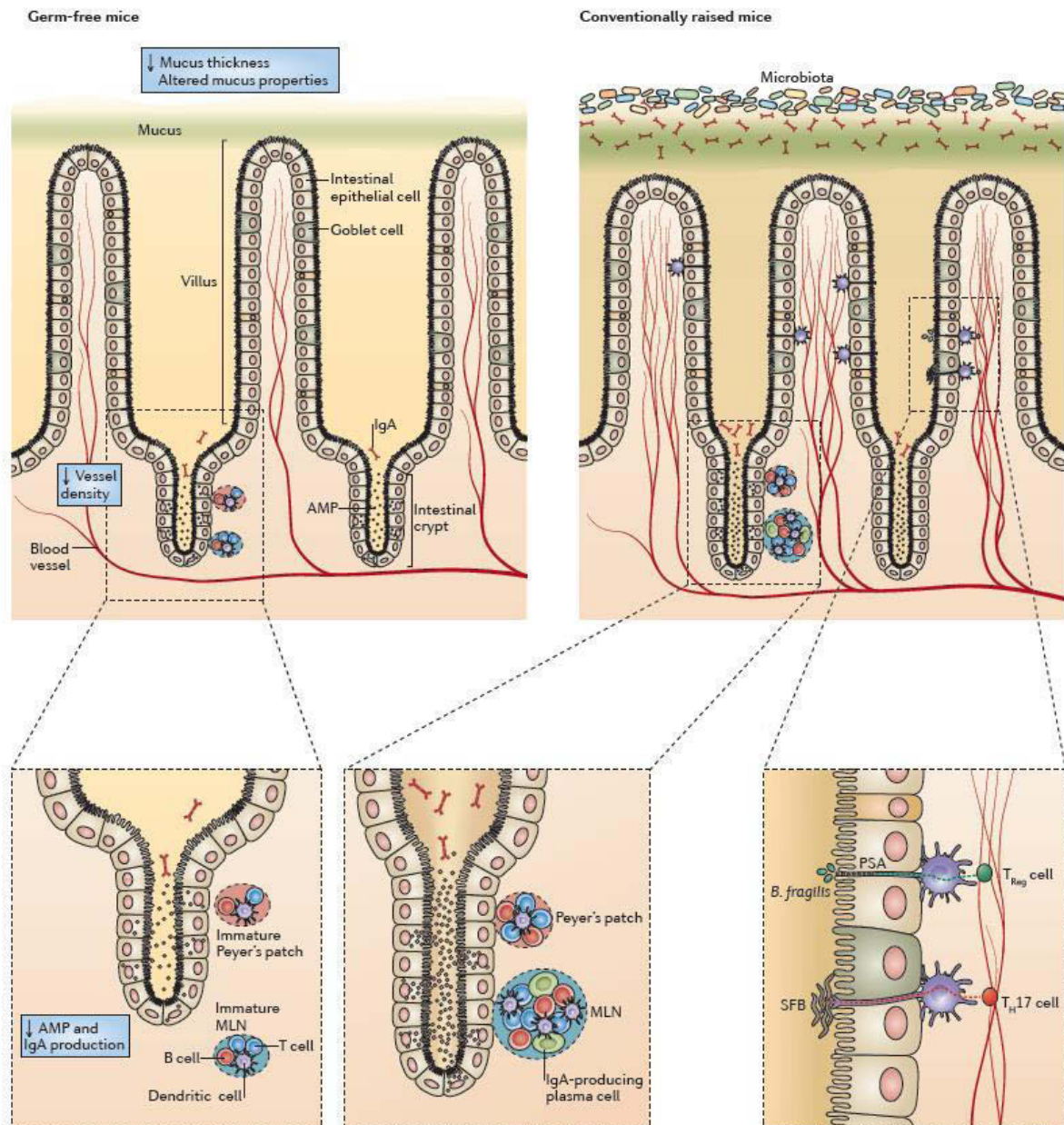


Figure 16 : Rôle du microbiote intestinal dans la physiologie du TGI. Le microbiote participe à la maturation du tractus digestif au niveau de l'architecture des villosités, la profondeur des cryptes, la prolifération des cellules souches, la vascularisation, la couche de mucus ainsi que la maturation des tissus lymphoïdes associés à la muqueuse. AMP : peptides anti microbiens ; IgA : Immunoglobuline A ; MLN : nœud lymphatique mésentérique ; SFB : bactéries filamenteuses segmentées. Tirée de Sommer and Bäckhed, 2013.

vitamines liposolubles. La très grande majorité de ces acides biliaires primaires (90 à 95%) sont ensuite réabsorbés au niveau de la partie distale de l'iléon puis renvoyés vers le foie. Environ 5 à 10% des acides biliaires primaires sont déconjugués par les bactéries intestinales, notamment par des espèces anaérobies appartenant aux genres *Bacteroides*, *Eubacterium* et *Clostridium* (Nicholson et al., 2012). La déconjugaison microbienne (élimination du conjugué glycine ou taurine) a pour but d'atténuer les propriétés antimicrobiennes des acides biliaires et empêche leur réabsorption active au niveau intestinal. Ces acides biliaires libres peuvent alors être métabolisés par le microbiote intestinal en acides biliaires dits secondaires, tels que l'acide désoxycholique ou lithocholique (Nicholson et al., 2012; Wahlström et al., 2016). L'accumulation du niveau d'acides biliaires secondaires dans les selles, la circulation sanguine et la bile a notamment été reportée chez des patients atteints de lithiase biliaire et de cancer du côlon (Ridlon et al., 2014).

Enfin, le microbiote joue un rôle important dans la synthèse des vitamines essentielles (Belzer et al., 2017; LeBlanc et al., 2013). Les bactéries lactiques seront notamment impliquées dans la synthèse de la vitamine B12 dont le rôle a été mis en évidence dans la synthèse des acides nucléiques et des protéines ainsi que dans la formation des globules rouges (Mahmood, 2014). L'Homme, les animaux, les plantes ou encore les champignons sont incapables de produire cette vitamine qui sera exclusivement synthétisée par des microorganismes majoritairement anaérobies (Fang et al., 2017). Les *Bifidobacteria* sont les producteurs principaux de folate, une vitamine impliquée dans des processus métaboliques importants pour les cellules de l'hôte comme les mécanismes de synthèse et de réparation de l'ADN (Sugahara et al., 2015). D'autres vitamines synthétisées par le microbiote intestinal incluent la vitamine K, la riboflavine, la biotine, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique, la pyridoxine ou encore la thiamine.

2.3.2. *Maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale*

Actuellement, il existe un ensemble de travaux qui soutiennent le rôle du microbiote intestinal dans le maintien de la structure et de la fonction du TGI. Plus particulièrement, le microbiote participe au développement et à la maturation de l'épithélium intestinal *via* des effets sur le renouvellement et la perméabilité cellulaire, sur le réseau vasculaire et sur la production de mucus (**Figure 16**).

Des études conduites en modèle murin axénique, ont montré (i) une diminution de la surface globale de l'intestin (Sommer and Bäckhed, 2013), (ii) un moindre développement des villosités, (iii) ainsi qu'une réduction des cryptes intestinales avec un nombre de cellules par cryptes diminué de 20% (Natividad and Verdu, 2013). Il a également été montré que le taux de renouvellement cellulaire chez les souris axéniques est inférieur à celui observé chez des animaux conventionnels. Cependant, cet effet est réversible. Lorsque les souris axéniques sont colonisées par des bactéries commensales, le taux de renouvellement cellulaire augmente rapidement et atteint en quelques jours le même niveau que celui des souris conventionnelles (Natividad and Verdu, 2013). Pour expliquer ce mécanisme, il a été proposé que le microbiote commensal induit la production d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) par les cellules épithéliales ce qui activerait la migration et le renouvellement cellulaire (Swanson et al., 2011). Or, un équilibre entre prolifération cellulaire et apoptose est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'épithélium intestinal. En effet, le renouvellement cellulaire joue un rôle primordial dans l'homéostasie du tractus digestif, sa réduction pouvant avoir des conséquences délétères pour l'épithélium notamment pour son rétablissement lorsqu'il est lésé. Le microbiote régule également la perméabilité cellulaire *via* le maintien des desmosomes et des jonctions serrées des cellules épithéliales, respectivement par la production de protéines riches en proline (sprr2A) ou par l'activation de la voie de signalisation TLR2 par les peptidoglycanes microbiens (Jandhyala et al., 2015).

Le microbiote intestinal joue également un rôle dans le développement des capillaires sanguins au niveau intestinal avec un réseau vasculaire deux fois moins dense observé chez les souris axéniques. Ce réseau est revenu à la normale après inoculation d'un microbiote intestinal complexe en seulement dix jours (Stappenbeck et al., 2002). En effet, la colonisation de l'intestin chez des souris axéniques provoque une restructuration des villosités épithéliales, cette dernière augmente les besoins en oxygène de l'épithélium intestinal et entraîne alors une angiogenèse (Reinhardt et al., 2012).

Enfin, le microbiote peut moduler les propriétés physiologiques du mucus ainsi que son renouvellement. Il a été montré que des souris axéniques ne développent qu'une très fine couche de mucus colique due à l'absence de sécrétion de la protéine Muc2 (mucine majoritaire du mucus) par les cellules à gobelet. L'épaisseur de la couche de mucus peut être cependant restaurée à un niveau observé chez des souris conventionnelles uniquement par l'exposition à des produits bactériens (peptidoglycanes ou lipopolysaccharides) (Pettersson et al., 2011).

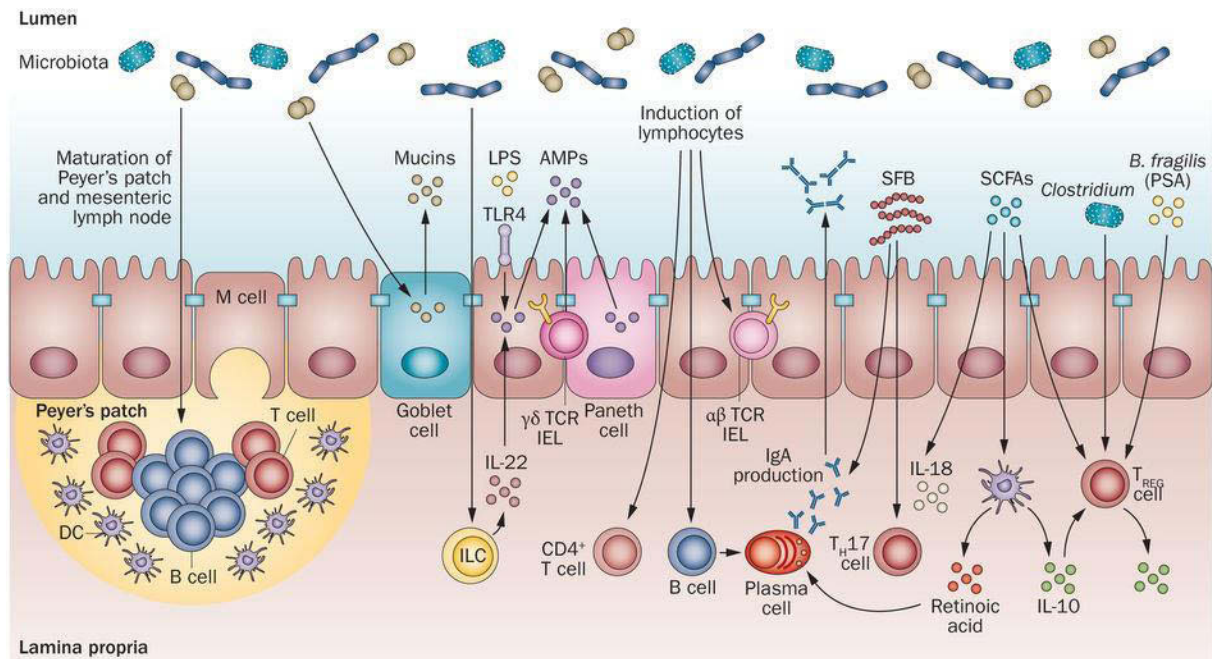


Figure 17 : Maturation du SI par le microbiote intestinal. DC : cellule dendritique ; LPS : lipopolysaccharide ; TLR : toll-like receptor ; IL : interleukine ; AMP : peptide antimicrobien ; TCR : T-cell receptor ; IEL : lymphocyte intra-épithélial ; IgA : Immunoglobuline A ; SFB : bactéries filamenteuses segmentées ; PSA : polysaccharide A. Tirée de Verdu *et al.*, 2015.

2.3.3. Développement et maturation du système immunitaire

La colonisation par les microorganismes commensaux est essentielle au développement et à la maturation du système immunitaire (SI) inné et acquis et ce, dès le début de la colonisation microbienne chez le nouveau-né (**Figure 17**) (Gensollen et al., 2016). Son importance a été mise en évidence lors d'études en modèle axénique. Les animaux axéniques présentent en effet un défaut de développement des structures lymphoïdes associées à l'intestin, tel qu'une hypoplasie des plaques de Peyer, mais également des tissus lymphoïdes systémiques, avec une malformation des ganglions lymphatiques et de la rate (Macpherson and Harris, 2004; Sekirov et al., 2010). Ils montrent également une réduction à la fois du nombre de lymphocytes intraépithéliaux et du niveau d'immunoglobuline A (IgA) sécrétée (Macpherson et al., 2001). Enfin, ils manifestent des irrégularités dans le profil et le niveau d'expression des cytokines. Les structures et fonctions du SI peuvent être restaurées en seulement quelques semaines lorsque ces animaux axéniques sont inoculés avec le microbiote fécal de souris conventionnelles ou sont mono-associés avec des bactéries commensales de l'intestin. Il a en effet été montré que lorsque des souris axéniques sont inoculées avec la bactérie *Bacteroides fragilis*, la prolifération des lymphocytes T (LT) CD4⁺ est restaurée (Mazmanian et al., 2005). Ce mécanisme est lié à la reconnaissance du polysaccharide A de la bactérie par les cellules dendritiques. Certains composés, dérivés du microbiote, tels que les AGCC (particulièrement le butyrate) contribuent également au maintien de l'homéostasie immunitaire *via* la modulation de la production de cytokines et la différenciation des LT en LT régulateurs (LTreg) (Furusawa et al., 2013; Lee and Hase, 2014). Le rôle central du microbiote intestinal dans le développement et la maturation du SI n'est pas surprenant étant donné qu'il représente la plus grande source d'antigènes auxquels le SI est exposé.

Le SI intestinal doit remplir deux fonctions qui semblent contradictoires. Il doit non seulement défendre le tractus intestinal contre les agents pathogènes (bactéries, virus, parasites) et empêcher leur translocation à travers la barrière intestinale. Mais, il doit également développer une tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires et du microbiote intestinal pour prévenir l'induction d'une réponse immunitaire excessive et dommageable pour la physiologie de l'organisme. Ce phénomène, dit de tolérance orale, est médié notamment par le SI inné. Ce dernier reconnaît des motifs moléculaires associés aux microbes (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs). Chez les bactéries, ces MAMPs peuvent

être des constituants de la paroi bactérienne, comme des lipopolysaccharides et des peptidoglycanes, ou encore des composés du flagelle. Ces motifs bactériens sont reconnus par des récepteurs portés par les cellules de l'hôte (Pattern Recognition Receptors, PRRs), comme par exemple les récepteurs Toll-like (Toll-Like Receptor, TLR) ou les récepteurs NOD-like (Nucleotide Oligomerization Domain, NLR) (Clemente et al., 2012; Thursby and Juge, 2017). Certains des PRRs seront localisés dans la membrane cellulaire, d'autres dans les membranes endosomales afin de reconnaître respectivement les MAMPs extracellulaires ou endocytosés (Maier et al., 2015). Les MAMPs des bactéries commensales, en interagissant avec les TLRs des cellules intestinales permettent de supprimer la réponse inflammatoire, de discriminer les bactéries commensales des bactéries pathogènes, et donc de développer la tolérance immunologique (Round et al., 2011).

Le SI acquis est également programmé par le microbiote intestinal. Les bactéries commensales influencent la différenciation des LT en LTreg, au niveau intestinal mais également dans la circulation sanguine générale (Round et al., 2011). Les LTreg sont responsables de la suppression de la réponse inflammatoire et permettent au microbiote d'être reconnu comme non pathogène (Sommer and Bäckhed, 2013). Le microbiote intestinal joue ainsi un rôle primordial dans l'homéostasie intestinale en permettant le maintien de l'équilibre entre les LTh17 (effecteurs) et les LTreg. Lorsque cet équilibre est rompu, une réponse inflammatoire incontrôlée peut être déclenchée et conduire à un état pathologique. De plus, le microbiote intestinal stimule la sécrétion d'IgA par les cellules intestinales *via* l'activation des cellules dendritiques. La présence du microbiote intestinal est indispensable pour que la production d'IgA soit maximale. Toutes les bactéries commensales ne semblent pas stimuler de manière équivalente la production d'IgA. Il a été montré que les *Bacteroides* induisent un niveau de sécrétion d'IgA supérieur à celui induit par les *Lactobacilli* (Yanagibashi et al., 2009). Par ailleurs, Hapfelmeier et collaborateurs ont mis en évidence que la colonisation par des bactéries commensales provoque la sécrétion d'IgA bactérie-spécifiques, et que le répertoire d'IgA varie et s'adapte en fonction de la composition du microbiote intestinal (Hapfelmeier et al., 2010). Les IgA remplissent une double fonction au niveau intestinal. Elles empêchent le surdéveloppement du microbiote, mais elles réduisent également les interactions de ce dernier avec le SI permettant ainsi d'augmenter la tolérance de l'hôte vis-à-vis des populations microbiennes qu'il héberge (Sekirov et al., 2010).

2.3.4. Protection contre les microorganismes pathogènes

Le microbiote intestinal joue enfin un rôle de protection contre les microorganismes pathogènes pour l'hôte communément appelé « effet barrière » du microbiote intestinal. Ces microorganismes peuvent être exogènes à l'organisme ou habituellement présents mais en concentration limitée (pathobiontes). Les pathobiontes peuvent ainsi s'avérer néfastes pour l'hôte dès lors que leur prévalence dans le TGI augmente. Les infections à *Clostridium difficile* en sont un bon exemple. En effet, approximativement 3% des adultes sains sont des porteurs asymptomatiques de cette bactérie, et le développement de l'infection ne survient essentiellement que suite à une antibiothérapie conduisant à une altération du microbiote intestinal (Ng et al., 2013). *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile* ainsi que les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) utilisent le fucose et l'acide sialique libérés par le microbiote. Ainsi l'augmentation du niveau d'acide sialique observée post traitement antibiotique, couplée à la dysbiose induite par le traitement, favorise leur expansion dans le TGI (Ferreira et al., 2014; Huang et al., 2015; Ng et al., 2013).

Le microbiote crée avec l'épithélium intestinal et le SI un effet barrière contre l'établissement des microorganismes pathogènes. Plusieurs mécanismes sont mis en jeu. Premièrement, un phénomène de compétition est observé pour les sites d'attachement à l'épithélium intestinal ainsi que pour la disponibilité des nutriments. L'établissement et le maintien d'un pathogène se feront en partie par sa capacité à utiliser une niche nutritionnelle non pourvue par les bactéries commensales (Bäumler and Sperandio, 2016; Kamada et al., 2012). C'est notamment le cas pour *Citrobacter rodentium* capable de coloniser le tractus de souris axéniques et non de souris conventionnelles où le pathogène se retrouve en compétition directe avec les *E. coli* commensales pour l'utilisation des monosaccharides (Kamada et al., 2012). Le microbiote intestinal peut également produire et sécréter des composés antimicrobiens comme les bactériocines. La colonisation de la bactérie pathogène EHEC O157:H7 est ainsi inhibée par la sécrétion de molécules antimicrobiennes par une souche probiotique appartenant au genre *Lactobacillus* (Medellin-Peña and Griffiths, 2009). Enfin, la régulation du SI par le microbiote intestinal *via* le dialogue PRRs-MAMPs résulte en l'activation de voies de signalisation qui vont notamment favoriser le resserrement des jonctions apicales des entérocytes et promouvoir la production par les cellules de l'hôte (i) de peptides antimicrobiens (*e.g.* cathélicidines, défensines, lactoferrines), (ii) de mucine et (iii) d'IgA. Cette immunomodulation contribue ainsi à limiter l'attachement et l'invasion des organismes pathogènes mais prévient également la croissance de bactéries commensales

potentiellement néfastes pour l'hôte (Bäumler and Sperandio, 2016; Jandhyala et al., 2015; Mathias et al., 2014; Ribet and Cossart, 2015).

2.4. Modèles d'étude du microbiote intestinal et de l'interaction microbiote-hôte

L'étude de la physiologie du TGI et du rôle du microbiote intestinal est rendue difficile chez l'Homme par certains aspects éthiques (exposition à des pathogènes, diverses molécules chimiques, pharmaceutiques ou nutritionnelles) et techniques (difficulté d'accès au TGI), limitant le plus souvent les études à l'analyse de fèces (non invasif, peu coûteux). Ainsi, pour répondre aux questions en lien avec le microbiote intestinal et son interaction avec l'hôte, de nombreux modèles *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* ont été développés.

2.4.1. Modèles *in vivo*, *ex-vivo*

Les modèles animaux monogastriques (le plus souvent souris et rat) se rapprochent du système digestif humain puisqu'ils prennent en compte l'organisme en entier, incluant les processus endocriniens, immunologiques, le rôle des cellules de l'hôte et du microbiote (Venema and van den Abbeele, 2013). Ces modèles comportent de nombreux avantages comme (i) le contrôle de l'environnement (*e.g.* stress, nutrition, exercices physiques), (ii) le contrôle du fond génétique de la population, (iii) accès aux microorganismes commensaux non encore cultivables et (iv) accès aux contenus intestinaux, tissus et organes après sacrifice des animaux (Boureau et al., 2000). Cependant, ces modèles présentent des limites. La diversité microbienne sera différente en relation avec la physiologie, l'alimentation, les conditions d'élevage et le comportement (coprophagie des rongeurs). De ce fait, il existe des différences physiologiques et métaboliques entre les modèles animaux et l'Homme qui doivent être considérées lors de l'extrapolation des résultats (Nguyen et al., 2015). Ley *et al.* ont notamment reporté que 85% des espèces bactériennes retrouvées chez la souris sont absentes du microbiote intestinal humain (Ley et al., 2005). Les modèles gnotobiotiques à microbiotes humanisés ont ainsi été développés pour mimer au plus près le modèle humain et ont été employés dans de nombreuses études (Faith et al., 2011; Goodman et al., 2011; Planer et al., 2016; Smith et al., 2013; Turnbaugh et al., 2009b). Pourtant, des réserves sont émises sur ce modèle où les taxa rares du microbiote humain sont absents du microbiote des souris

humanisées (Turnbaugh et al., 2009b). Enfin, l'exposition de modèles animaux à des molécules pharmacologiques ou chimiques parfois très toxiques pose également des problèmes d'éthique. Des études sur modèles animaux démontrent par exemple la formation de tumeurs ou de polypes au niveau du tractus digestif après une prise chronique ou aiguë de B[a]P par voie orale (Culp et al., 1998; Huderson et al., 2013). Ces études utilisent majoritairement des modèles animaux susceptibles dont le fond génétique (présence de mutations) favorise le développement rapide de tumeurs.

Les modèles *ex vivo* du TGI sont des systèmes où la complexité de l'environnement associé à l'hôte est réduite, permettant de cibler des mécanismes cellulaires et moléculaires d'intérêt dans le dialogue microbiote-hôte. Ils permettent, dans un environnement contrôlé, d'étudier les processus biologiques et biochimiques dans le contexte d'une architecture de tissu intact. Après résection chirurgicale, les tissus peuvent être cultivés en chambre de Ussing, initialement développée pour la mesure du transport des ions, des nutriments ainsi que des molécules pharmaceutiques et toxiques à travers la membrane épithéliale (Alam et al., 2012; Clarke, 2009; Garrait et al., 2006). L'avantage de ces modèles tissulaires est la présence de la complexité cellulaire retrouvée dans l'épithélium intestinal contrairement aux cultures de cellules en modèle unique. On retrouve notamment les entérocytes, mais également les cellules productrices de mucus, les cellules endocrines, les cellules de Paneth, les cellules lymphocytaires et dendritiques mais également les enzymes et protéines retrouvées au niveau du segment considéré. Le tissu étudié peut provenir de différentes parties de l'intestin (du duodénum au côlon) et de diverses espèces animales permettant ainsi l'étude d'un large panel d'interactions microbiote-hôte (Roeselers et al., 2013). Le TNO (organisation Hollandaise pour la recherche scientifique appliquée ; <https://www.tno.nl/en/>) a décrit un système utilisant des segments intestinaux issus du cochon pour l'étude de la libération d'hormones intestinales après exposition à des métabolites microbiens (Voortman et al., 2012). Certains travaux se sont intéressés à l'impact de probiotiques et de leurs métabolites sur l'inflammation induite par certains pathogènes tels que *Salmonella* ou simplement aux effets physio-pathologiques de *Campylobacter jejuni* pour comprendre les mécanismes d'adhésion à la muqueuse (Grant et al., 2006; Tsilingiri et al., 2012). Enfin, Udden et collaborateurs ont démontré la capacité des cellules épithéliales coliques à produire des peptides antimicrobiens suite à l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires (Udden et al., 2017).

Les principales limites liées à l'utilisation de ces systèmes *ex vivo* sont principalement techniques. La préparation des tissus est laborieuse et doit être soigneuse pour éviter que le

Tableau 3 : Comparaison des paramètres techniques de différents systèmes *in vitro* du TGI. Adapté de Fritz *et al.*, 2013 et Williams *et al.*, 2015.

Modèle <i>in vitro</i>	Région ciblée	Volume utilisé (mL)	pH	Temps de fonctionnement	Pompe péristaltique	Absorption	Mucus	Cellules de l'hôte	Références
Système batch	Toute région du TGI (souvent côlon distal)	varie	dépendant de la région ciblée	<48 h	Non	Non	Non	Non	Wang and Gibson, 1993
Système continu tri-étagé (ECSIM)	V1=côlon proximal V2=transverse V3=distal	V1=1000 V2=1000 V3=1000	V1=5,7 V2=6,2 V3=6,8	variable	Oui	Non	Non	Non	Feria-Gervasio <i>et al.</i> , 2014
Enteromix	Côlon	6-15	5,5-7,0	2 j	Non	Non	Non	Non	Makivuokko <i>et al.</i> , 2006
PolyFermS	Côlon proximal	300	5,5	6 j	Oui	Non	Non	Non	Berner <i>et al.</i> , 2013
SHIME	Estomac au côlon	300-1600	2,0-7,0	Généralement 30 jours par cycle	Non	Oui	Non	Non	Molly <i>et al.</i> , 1994
M-SHIME	Estomac au côlon proximal	300-1600	2,0-7,0	Généralement 30 jours par cycle	Non	Oui	Oui	Non	Van den Abbeele <i>et al.</i> , 2012
TIM1	Estomac à l'iléon	200	1,8 à 6,5	~1 j	Oui	Oui	Non	Non	Minekus, 2015
TIM2	Côlon proximal	200	5,8	~3 j	Oui	Oui	Non	Non	Venema, 2015
HMI	Côlon	-	5,6-5,9	48 h	Oui	Oui	Oui	Oui	Marzorati <i>et al.</i> , 2014
Gut-on-a-chip	Côlon ^{ab}	0,7	Non contrôlé	96 h	Oui	Oui	Oui	Oui	Kim <i>et al.</i> , 2016
HuMIX	Côlon ^c	-	Non contrôlé	24 h	Oui	Oui	Oui	Oui	Shah <i>et al.</i> , 2016 ; Mac Giolla Eain <i>et al.</i> , 2017

^a Condition de culture aérobie. ^b Microbiote intestinal absent mais co-culture avec certaines souches bactériennes aérobies et aéro-tolérantes possible. ^c Microbiote intestinal absent mais co-culture avec souches bactériennes anaérobies possible.

mucus soit endommagé lors de la résection chirurgicale. Enfin, le débit est relativement faible et la viabilité tissulaire sous conditions physiologiques reste relativement courte (Roeselers et al., 2013).

2.4.2. Modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* sont une alternative aux modèles animaux et représentent une plateforme technologique innovante essayant de mimer au plus près le tractus digestif humain. La complexité des modèles s'étend de systèmes de type batch (système fermé, statique) à des systèmes en flux continu (système dynamique) à plusieurs compartiments (Payne et al., 2012). Différentes régions du tube digestif peuvent être reproduites (région gastrique, intestinale et colique) pour une période de temps définie qui sera fonction du modèle choisi (**Tableau 3**).

Les modèles *in vitro* statiques mimant la région stomacale et/ou intestinale permettent de simuler une digestion (i) gastrique (pH=1-4; 37°C; ≈3h) *via* l'ajout de pepsine (enzyme présente dans les sucs gastriques), (ii) et/ou intestinale (pH=4-7,5; 37°C; ≈7h) *via* l'ajout d'enzymes pancréatiques et de sels biliaires (Guerra et al., 2012). Les modèles dynamiques sont eux moins limités dans leurs paramètres et permettent de se rapprocher des conditions réelles de digestion. Actuellement, le système TIM-1 (TNO gastro Intestinal tract Model-1) est le système digestif artificiel reproduisant de la façon la plus physiologique les conditions rencontrées dans la lumière gastro-intestinale humaine. Ce modèle à quatre compartiments simulant la digestion gastro-intestinale, reproduit (i) la sécrétion de bile, (ii) le transit du chyme (résultat de la digestion de la nourriture par l'estomac), (iii) les changements de pH, (iv) l'arrivée séquentielle des sécrétions digestives, (v) ainsi que les capacités d'absorption passive de l'intestin supérieur (**Figure 18**) (Déat et al., 2009; Guerra et al., 2012). Ce système a notamment été utilisé au sein du laboratoire pour l'étude de la survie et de la virulence des EHEC dans la région gastro-intestinale simulée de l'enfant de moins de deux ans (Roussel et al., 2016).

Les modèles *in vitro* mimant la région colique, sont eux, caractérisés par l'inoculation d'un ou de plusieurs chémostats avec une suspension fécale en anaérobiose sous pH, température et conditions physico-chimiques physiologiques. Les systèmes de type batch mimant le côlon proximal ont largement été utilisés pour observer la fermentation de composants alimentaires, tels que l'amidon ou l'inuline, non dégradés par les cellules de

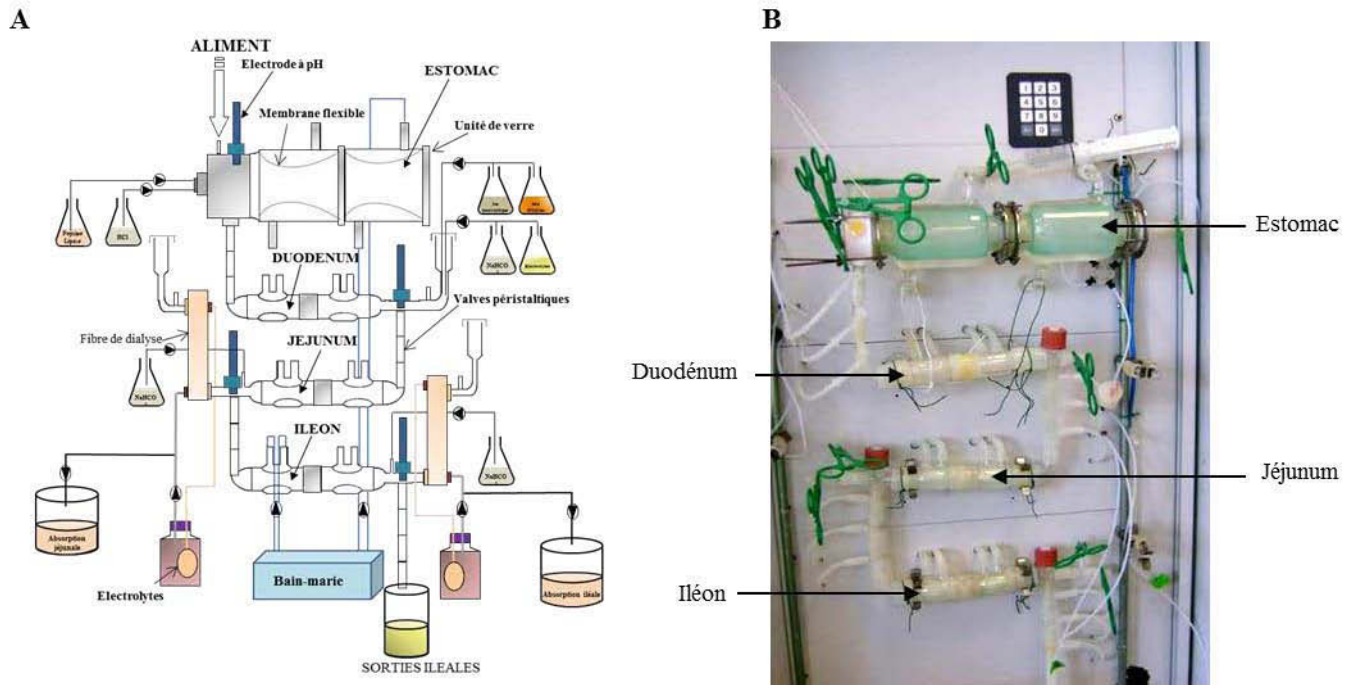


Figure 18 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du système digestif artificiel TIM-1 (estomac et intestin grêle artificiels). Tirée de Guerra *et al.*, 2012 et Blanquet *et al.*, 2001.

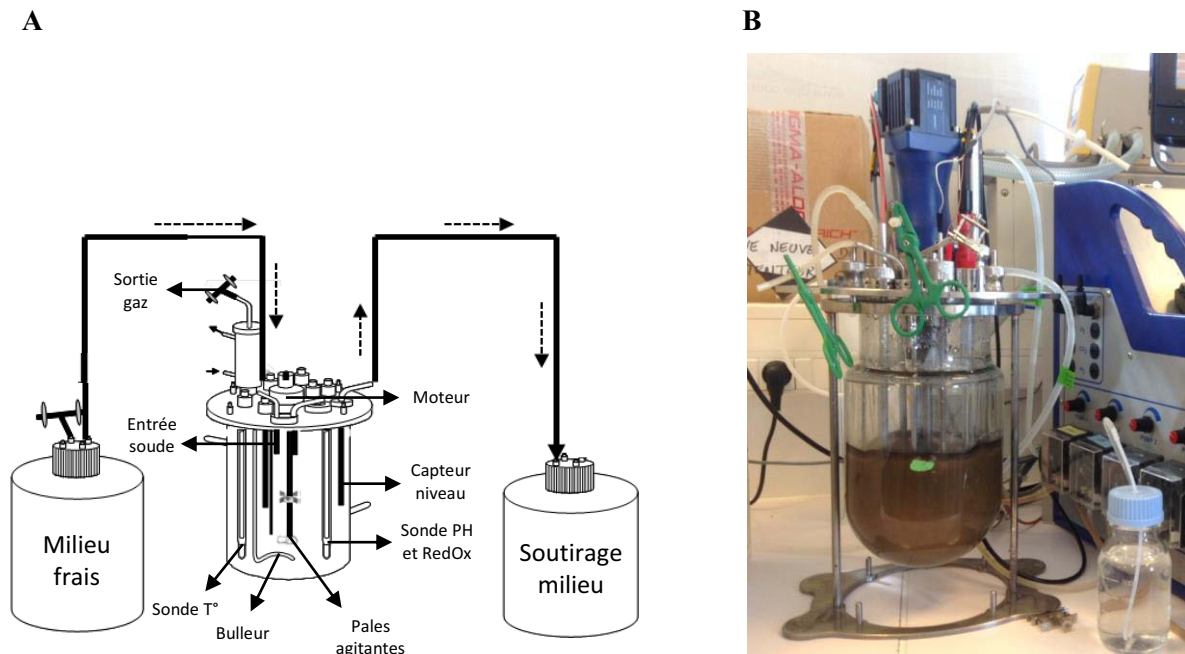


Figure 19 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du fermenteur continu ECSIM. Tirée de Feria-Gervasio *et al.*, 2011.

l'hôte (Lesmes et al., 2008; Pompei et al., 2008; Takagi et al., 2016). Du fait de l'appauvrissement en nutriments, de l'accumulation des métabolites microbiens ainsi que de l'acidification non contrôlée du milieu, ce type de système est utilisé sur une courte période (24-48h). Cependant, son faible coût, son haut débit ainsi que sa simplicité d'exécution font du système batch un modèle d'étude privilégié précédant l'utilisation de modèles plus complexes. Les modèles de fermentation continue, à un ou plusieurs compartiments, permettent, quant à eux, d'effectuer des études sur le long terme par l'entrée et la sortie des substrats et métabolites (Berner et al., 2013; Feria-Gervasio et al., 2014; Mäkituokko et al., 2006). Ces systèmes offrent un environnement plus proche des conditions physico-chimiques coliques que les systèmes fermés (efflux constant des nutriments, des déchets métaboliques et des gaz, contrôle du pH, du potentiel d'oxydoréduction) (**Figure 19**). Ces modèles de fermentation ont notamment été utilisés pour appréhender l'impact d'antibiotiques sur le microbiote de patients atteints de la maladie de Crohn (Maccaferri et al., 2010), pour l'étude du métabolisme des archées méthanogènes au sein du microbiote fécal humain ou encore pour le criblage de différentes méthodes de préservations du microbiote fécal (Gaci et al., 2017; Tottey et al., 2015).

Il existe également des systèmes digestifs artificiels très aboutis avec l'inclusion des fonctions digestives de l'hôte. Le modèle TIM-2 simule le côlon proximal avec le mélange péristaltique ainsi que l'absorption de l'eau et des nutriments *via* un système de dialyse. Hatanaka et collaborateurs ont notamment couplé les modèles TIM-1 et TIM-2 pour aboutir à la création d'un système artificiel complet pour l'étude de l'impact de *Bacillus subtilis* sur le microbiote intestinal (Hatanaka et al., 2012). Le SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) comporte lui 5 compartiments simulant, l'estomac, l'intestin grêle, ainsi que le côlon proximal, transverse et distal (Van de Wiele et al., 2015). Ce modèle a notamment été utilisé pour déterminer la biodisponibilité de divers composés toxiques comme les HAPs ou l'arsenic pour le métabolisme microbien (Laird et al., 2007; Van de Wiele et al., 2004b). Une extension au SHIME, le M-SHIME, comporte des microsphères enrobées de mucine permettant aux bactéries adhérentes au mucus de se maintenir plus facilement dans le système (Van den Abbeele et al., 2012).

Ces divers modèles *in vitro* du TGI ne prennent pas en compte l'interaction du microbiote avec l'hôte. Ainsi des modèles cellulaires intestinaux, composés de monocouches de cellules polarisées et différenciées, peuvent être utilisés comme modèle simplifié de la barrière épithéliale intestinale. Ces modèles sont largement utilisés pour l'étude de

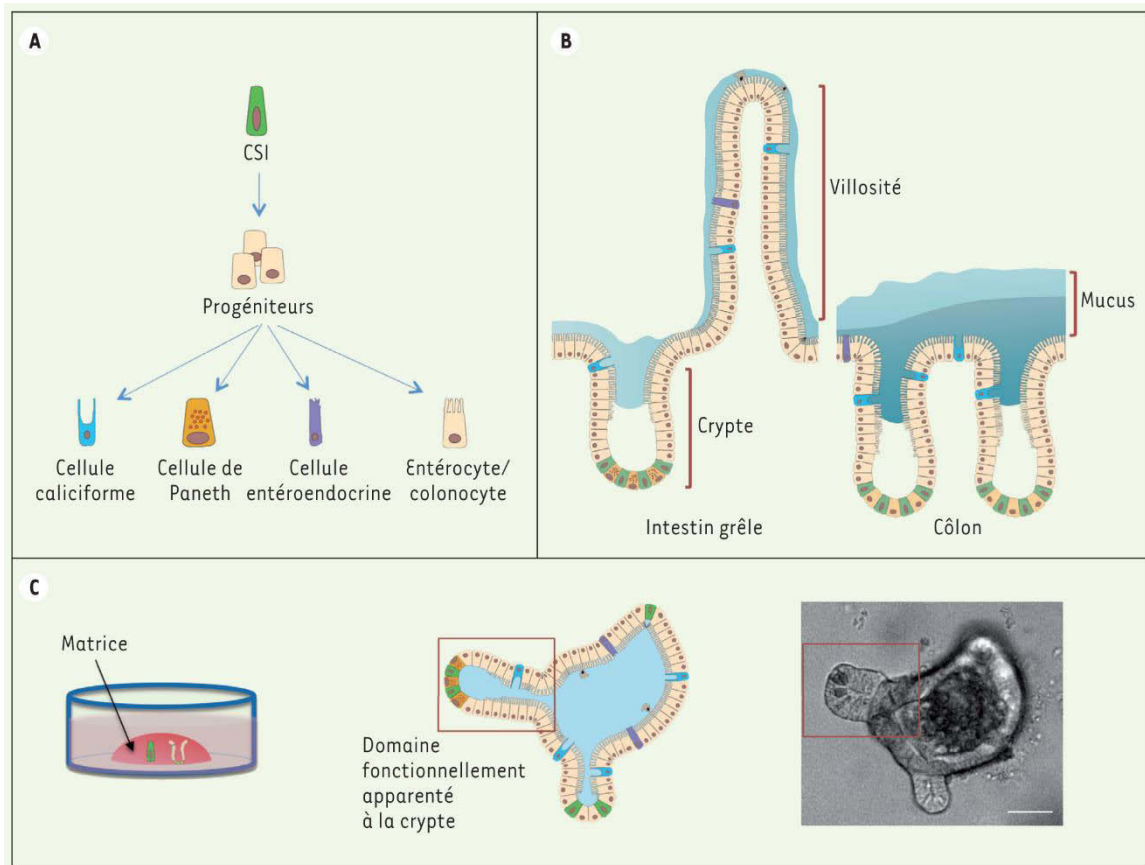


Figure 20 : Formation d'un organoïde à partir de cellules souches intestinales. A. Schéma simplifié du lignage intestinal. B. Schéma de l'organisation fonctionnelle de l'épithélium intestinal. C. Illustration de la technique de culture des organoïdes intestinaux. Tirée de Stedman *et al.*, 2016.

l'interaction hôte-pathogènes-probiotiques, notamment dans les mécanismes d'adhésion, d'invasion et de stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Bahrami et al., 2011; Chiu et al., 2013; O'Hara et al., 2006; Simonovic et al., 2000; Tyrer et al., 2011). Ces études impliquent généralement des lignées cellulaires tumorales du côlon telles que les lignées Caco-2, TC7, T84 et HT-29. Contrairement aux modèles *ex vivo*, ces modèles ne peuvent pas reproduire les interactions des différents types cellulaires présents au niveau de la muqueuse intestinale et leur phénotype est également instable du fait des différentes remises en culture (nombre de passages) et des milieux utilisés. Cependant, ces lignées immortelles possèdent des caractéristiques physiologiques très proches des cellules épithéliales intestinales (enzymes et protéines de la bordure en brosse, microvillosités) et permettent notamment d'éviter le sacrifice de modèles animaux (Meunier et al., 1995; Zeller et al., 2015). Afin de pallier aux limites des cultures cellulaires en monocouches et de se rapprocher de la physiologie et des fonctions du TGI, des structures cellulaires tridimensionnelles ont été développées: les organoïdes (Sato et al., 2009; Sato and Clevers, 2013). Ces organoïdes, pouvant se développer sur la seule base de la différenciation de cellules souches intestinales, comprennent des régions fonctionnellement identiques aux cryptes, où résident les cellules souches et progéniteurs, et des régions intermédiaires essentiellement composées de cellules différenciées (**Figure 20**) (Stedman et al., 2016). Une variété de culture d'organoïdes a été proposée pour régénérer différentes régions du TGI dont l'estomac, l'intestin grêle et le côlon (Park et al., 2017). Ces organoïdes sont de plus en plus utilisés dans l'étude des interactions microbiote-hôte (Nigro et al., 2016; Park et al., 2017), notamment dans l'interaction microbiote-cellules souches nécessaire à la régénération de l'épithélium intestinal (Stedman et al., 2016) ou encore dans les mécanismes d'infection par les pathogènes (Bartfeld, 2016; Karve et al., 2017). Malgré les avancées qui ont été entreprises *in vitro*, les modèles *in vivo* ne peuvent être totalement remplacés puisque certaines fonctions de l'hôte comme les réponses immunologiques et neuroendocriniennes sont toujours manquantes.

3. Microbiote Intestinal et Pathologies Humaines

Les connaissances initiales du rôle des microorganismes sur la santé humaine reposent sur la théorie des germes développée par Louis Pasteur et Robert Koch (Koch, 1890). Ces premiers travaux se sont intéressés aux microorganismes, définis comme agents de pathologies, et de leurs facteurs de virulence entraînant de grandes avancées médicales

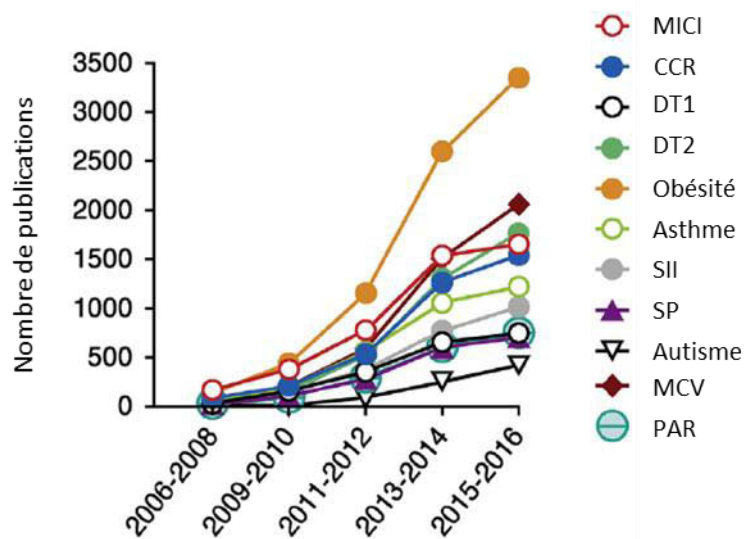


Figure 21 : Graphe représentant le nombre de publications issues de PubMed au 31.12.2016 depuis les 10 dernières années, comprenant les termes « intestinal microbiota » associés à diverses pathologies humaines. MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; CCR : cancer colorectal ; DT1 : diabète de type 1 ; DT2 : diabète de type 2 ; SII : syndrome de l'intestin irritable ; SP : sclérose en plaque ; MCV : maladies cardiovasculaires ; PAR : polyarthrite rhumatoïde. Tirée de Butto and Haller, 2017.

(Gradmann, 2014). Ces travaux ont ainsi initié le développement de méthodes de lutte contre les maladies infectieuses comme les pratiques d'hygiène et d'assainissement public ou encore les traitements antibiotiques. Parallèlement aux maladies infectieuses (transmissibles), les maladies chroniques (non transmissibles) sont des pathologies complexes et multifactorielles pour lesquelles il est difficile d'identifier une cause unique (*e.g.* facteurs environnementaux, génétiques, immunitaires et microbiens). De par les nombreuses fonctions physiologiques qu'il remplit, le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans l'homéostasie du TGI et plus globalement dans celle de l'hôte. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des altérations de la structure du microbiote intestinal, appelées dysbioses, associées à un état pathologique chronique de l'hôte (Lynch and Pedersen, 2016). Toutefois, il est difficile de déterminer (i) si la pathologie est provoquée par une altération du microbiote intestinal, ou (ii) si l'état pathologique modifie l'environnement digestif, provoquant une dysbiose du microbiote intestinal (Chow et al., 2011). En revanche, il apparaît clairement que lorsque la dysbiose et l'état pathologique se sont installés, ces deux phénomènes s'auto-entretiennent. De nombreuses études ont mis en évidence une association entre des pathologies humaines et une dysbiose du microbiote intestinal. Ces pathologies ne se limitent pas à l'environnement digestif mais touchent l'ensemble de l'organisme (**Figure 21**).

3.1. Pathologies digestives

Les dysbioses du microbiote intestinal sont très fréquemment associées à des pathologies digestives telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le syndrome de l'intestin irritable (SII) ou le cancer colorectal (CCR) (**Tableau 4**).

Les MICI regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) qui se caractérisent par une inflammation de la paroi du tube digestif. Dans la MC, cette inflammation peut être localisée à tous les niveaux du système digestif, même si c'est au niveau de l'intestin qu'on la retrouve le plus souvent. Dans la RCH, l'inflammation est localisée au niveau du rectum et du côlon. Ces maladies évoluent par alternance avec des phases d'inflammation et de rémission, de durées et de fréquences très variables selon les patients. Bien qu'à ce jour, les facteurs responsables de la survenue des MICI ne sont pas tous clairement définis, une partie du mécanisme sous-jacent est identifié comme une réponse immunitaire anormale, dirigée contre le microbiote intestinal d'individus génétiquement

Tableau 4 : Pathologies humaines et dysbioses du microbiote intestinal. MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; SII : syndrome de l'intestin irritable. Adapté de Butto and Haller, 2017 ; Schroeder and Bäckhed, 2016 ; Tang *et al.*, 2017 et Nistal *et al.*, 2015.

PATHOLOGIE	ALTERATION DU MICROBIOTE INTESTINAL	REFERENCES
MALADIES IMMUNITAIRES		
MICI	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des Firmicutes (<i>e.g. Faecalibacterium prausnitzii</i> et <i>Akkermansia muciniphila</i>) • Augmentation des Actinobacteria et Proteobacteria 	Gevers <i>et al.</i> , 2014 ; Rehman <i>et al.</i> , 2016 ; Joossens <i>et al.</i> , 2011 ; Walujkar <i>et al.</i> , 2014
SII	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des Firmicutes (<i>e.g. Lachnospiraceae</i> et <i>Clostridium cluster XIVa</i>) • Diminution du genre <i>Bacteroides</i> 	Jeffery <i>et al.</i> , 2012 ; Jalanka-Tuovinen <i>et al.</i> , 2014
ASTHME	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des Proteobacteria (<i>e.g. Comamonadaceae, Sphingomonadaceae</i> et <i>Oxalobacteraceae</i>) • Diminution des genres <i>Lachnospira, Veillonella, Faecalibacterium</i> et <i>Rothia</i> 	Fujimura and Lynch, 2015 ; Azad <i>et al.</i> , 2015
POLYARTHRITE RHUMATOÏDE	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des espèces <i>Prevotella copri, Porphyromonas gingivalis, Lactobacillus salivarius</i>, et du genre <i>Clostridium</i> • Diminution du genre <i>Haemophilus</i> 	Zhang <i>et al.</i> , 2015 ; Van de Wiele <i>et al.</i> , 2016 ; Wu <i>et al.</i> , 2016
DIABETE DE TYPE 1	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution des bactéries productrices de lactate et de butyrate • Augmentation des Bacteroidetes 	Kostic <i>et al.</i> , 2015 ; Giancchetti and Fierabracci, 2017
SCLEROSE EN PLAQUE	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de certains genres de Bacteroidetes (<i>e.g. Pedobacter</i> et <i>Flavobacterium</i>), de Firmicutes (<i>e.g. Blautia</i> et <i>Dorea</i>), de Proteobacteria (<i>e.g. Pseudomonas</i> et <i>Mycoplana</i>), de Euryarchaeota (<i>e.g. Methanobrevibacter</i>) et des Verrucomicrobia (<i>Akkermansia</i>) • Diminution de certains genres de Bacteroidetes (<i>e.g. Butyricimonas</i>) et d'Actinobacteria (<i>e.g. Prevotella</i>) 	Chen <i>et al.</i> , 2016 ; Jangi <i>et al.</i> , 2016
DESORDRES METABOLIQUES		
OBESITE	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la diversité en espèces • Augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes 	Le Chatelier <i>et al.</i> , 2013 ; Qin <i>et al.</i> , 2012 ; Karlsson <i>et al.</i> , 2013 ; Ley <i>et al.</i> , 2006
DIABETE DE TYPE 2	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation ou diminution du ratio Firmicutes/Bacteroidetes • Diminution des espèces productrices de butyrate • Augmentation de pathogènes opportunistes (<i>e.g. Clostridium ramosum, Eggerthella lenta</i> et <i>Escherichia coli</i>), de <i>Prevotella copri</i> et <i>Bacteroides vulgatus</i> 	Pedersen <i>et al.</i> , 2016 ; Qin <i>et al.</i> , 2012 ; Forslund <i>et al.</i> , 2015 ; Karlsson <i>et al.</i> , 2013
MALADIES CARDIOVASCULAIRES	<ul style="list-style-type: none"> • Athérosclérose : Augmentation des genres <i>Lactobacillus</i> et <i>Collinsella</i> et diminution des genres <i>Roseburia</i> et <i>Eubacterium</i> • Hypertension : Augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes • Attaque cardiaque : Augmentation d'<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Streptococcus viridans</i> 	Yamashiro <i>et al.</i> , 2017 ; Karlsson <i>et al.</i> , 2012 ; Yang <i>et al.</i> , 2015
AUTRES		
AUTISME	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du genre <i>Sutterella</i> et de <i>Ruminococcus torques</i> • Diminution du genre <i>Prevotella</i> 	De Angelis <i>et al.</i> , 2015 ; Kang <i>et al.</i> , 2013
CANCER COLORECTAL	<ul style="list-style-type: none"> • Surexpression de pathobiontes dont <i>Fusobacterium nucleatum, Streptococcus galolyticus</i> et <i>bovis, Enterococcus faecalis, Bacteroides fragilis, Escherichia coli, Helicobacter pylori, Clostridium septicum, Alistipes, Akkermansia, Peptostreptococcus, Campylobacter</i> • Diminution des genres <i>Faecalibacterium, Roseburia, Bifidobacterium</i> 	Sears and Garrett, 2014 ; Flemer <i>et al.</i> , 2016 ; Chen <i>et al.</i> , 2012 ; Wu <i>et al.</i> , 2013
CIRRHOSE DU FOIE	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation des genres <i>Veillonella, Megasphaera, Dialister, Atopobium, Fusobacterium</i> et <i>Prevotella</i> 	Qin <i>et al.</i> , 2014 ; Tilg <i>et al.</i> , 2016

susceptibles (Abegunde et al., 2016). La plupart des facteurs de risques génétiques identifiés sont impliqués dans les mécanismes du SI inné contre l'invasion par les pathogènes tels que les gènes codant pour les PRRs (*e.g.* NOD2, TLR4, CARD8, CARD9, ou NLRP3) ainsi que des gènes de l'autophagie (*e.g.* ATG16L1, IRGM et LRRK2) (Biedermann and Rogler, 2015). La présence d'une dysbiose du microbiote intestinal a largement été démontrée chez des patients atteints de MICI, s'accompagnant généralement d'une réduction de la diversité bactérienne (Gong et al., 2016; Ott et al., 2004; Pascal et al., 2017). D'une manière générale, une réduction de l'abondance des phyla Firmicutes et Bacteroidetes, associée à une augmentation des Proteobacteria et des Actinobacteria, est retrouvée chez les personnes atteintes de MICI (Frank et al., 2007; Walujkar et al., 2014; Willing et al., 2010). Cependant des différences sont également observées, avec notamment une forte diminution de l'abondance des bactéries productrices de butyrate *Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia hominis* retrouvée uniquement chez les individus présentant une MC (Frank et al., 2011; Machiels et al., 2014; Morgan et al., 2012; Sokol et al., 2006). D'autres taxa bactériens producteurs d'AGCC avec des propriétés anti-inflammatoires ont également une abondance réduite chez les personnes atteintes de MICI tels que *Akkermansia muciniphila* (Png et al., 2010) ou encore des bactéries lactiques du genre *Bifidobacterium* (Joossens et al., 2011; Orel and Trop, 2014). Enfin, des travaux ont souligné le rôle des *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC) dans l'étiologie de la MC. Divers facteurs de virulence des AIEC, tels que la survie et la réplication intracellulaire, la survie dans les macrophages, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires font des AIEC des pathogènes probables capables d'induire et de maintenir une inflammation intestinale (Darfeuille-Michaud, 2002; Galtier et al., 2017). L'ensemble de ces éléments souligne donc l'importance du rôle du microbiote intestinal dans les MICI et soutient l'hypothèse qu'une perte de l'équilibre entre bactéries bénéfiques et défavorables contribue au développement et/ou au maintien de ces pathologies.

Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est un trouble digestif chronique, caractérisé par des douleurs abdominales, des ballonnements et des troubles du transit (avec diarrhée ou constipation prédominante voire une alternance des deux) (Jin et al., 2016; Khanna and Tosh, 2014) et il est estimé que 5,8 à 17,5% de la population générale serait atteinte par ce syndrome (Sperber et al., 2017). Le SII présente un tableau clinique hétérogène dont les différents symptômes sont décrits et classifiés par les critères de Rome IV (Lacy et al., 2016). Des travaux récents ont montré que la susceptibilité génétique (Gazouli et al., 2016), les intolérances alimentaires (Gibson et al., 2015) ainsi que les polluants environnementaux

(Marynowski et al., 2015) sont étroitement associés au SII. Les données actuelles indiquent que la diversité, la stabilité et les activités métaboliques du microbiote intestinal seraient altérées chez la majorité des personnes souffrant de SII (Carroll et al., 2012; Durbán et al., 2013; Rajilić-Stojanović et al., 2015). Cependant, aucune signature spécifique du microbiote intestinal n'a pu être mise en évidence. Il apparaît toutefois qu'une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes ainsi qu'une diminution de la diversité microbienne caractériseraient le mieux les perturbations du microbiote dans le SII (Jeffery et al., 2012b). Une autre caractéristique commune retrouvée chez les individus atteints de SII est l'augmentation de la production colique d'AGCC, qui serait corrélée avec les variations observées dans la sévérité des symptômes (Tana et al., 2010). Farup et collaborateurs proposent notamment d'utiliser les AGCC fécaux (plus particulièrement l'acide butyrique et propionique) comme marqueurs du SII (Farup et al., 2016).

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquemment diagnostiqué avec plus des 2/3 des cas répertoriés dans les pays développés. Il est également la quatrième cause de décès par cancer dans le monde (Arnold et al., 2017). Le développement d'un CCR est un processus qui se déroule en plusieurs étapes avec notamment la formation d'adénomes, laquelle s'accompagne d'une modification du microbiote intestinal avec une augmentation du phylum des Proteobacteria et Fusobacteria et une diminution des Bacteroidetes (Dejea et al., 2014; Flemer et al., 2016; Shen et al., 2010). Contrairement aux MICI, une augmentation de la diversité du microbiote fécal a été observée chez des patients atteints de CCR et de polypes coliques (Sanapareddy et al., 2012; Scanlan et al., 2008). Leur microbiote intestinal est également enrichi en taxa pro-inflammatoires tels que *Fusobacterium* et *Campylobacter*, et subit une réduction des taxa anti-inflammatoires comme *Faecalibacterium*, *Roseburia* ou encore *Bifidobacterium* (Nistal et al., 2015). Le microbiote intestinal favoriserait la survenue et/ou la progression du CCR (i) en induisant un état inflammatoire chronique et/ou (ii) en synthétisant des métabolites toxiques interférant avec la régulation du cycle cellulaire ou provoquant des dommages directs à l'ADN (Candela et al., 2014; Schwabe and Jobin, 2013). Notamment *Fusobacterium nucleatum* possède une adhésine lui permettant d'adhérer et d'envahir les cellules intestinales humaines, d'éliciter une réponse inflammatoire et de stimuler la prolifération cellulaire (Rubinstein et al., 2013). *E. coli* peut, elle, induire des dommages à l'ADN dans les cellules de l'hôte *via* la production de la toxine colibactine, un métabolite secondaire génotoxique (Cuevas-Ramos et al., 2010).

3.2. Pathologies extra-digestives

L'impact du microbiote intestinal sur l'organisme de l'hôte ne se limite pas à l'environnement digestif. Les composants microbiens ainsi que les métabolites que le microbiote produit sont des molécules médiatrices capables de traverser la barrière intestinale et d'atteindre la circulation générale. Ces molécules, impliquées dans de nombreuses cascades de signalisation, permettent alors au microbiote de communiquer avec les organes et les tissus périphériques de l'hôte. De nombreux travaux ont ainsi montré qu'une altération de ce dialogue microbiote-hôte (dysbiose, perturbation du métabolisme microbien) peut être associée à divers dysfonctionnements immunitaires, métaboliques et psychologiques chez l'Homme (**Tableau 4**) (Schroeder and Bäckhed, 2016).

3.2.1. Dysfonctionnements immunitaires

Le microbiote intestinal est en dialogue permanent avec le SI de l'hôte afin de maintenir une protection contre les agressions exogènes. Lorsque cette interaction vient à être altérée, des pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes peuvent survenir au niveau systémique. Les maladies auto-immunes représentent un état pathophysiologique où les réponses immunitaires sont anormalement dirigées contre les propres cellules de l'organisme. Le microbiote intestinal a été associé à diverses maladies auto-immunes, comme la polyarthrite rhumatoïde (Wu et al., 2016), la sclérose en plaque (Berer et al., 2011; Colpitts et al., 2017; Jangi et al., 2016; Lee et al., 2011), le lupus érythémateux (Mu et al., 2015) ou encore le diabète de type 1 (Giancchetti and Fierabracci, 2017; Kostic et al., 2015; Mathis and Benoist, 2012; Wen et al., 2008) (**Tableau 4**). Son rôle a été confirmé par des études en modèle murin où il a été montré que des souris axéniques ne développaient pas ce type de pathologies (Carding et al., 2015; Clemente et al., 2012; Lee and Mazmanian, 2010). Il a également été montré qu'une altération du microbiote intestinal est associée au développement de l'asthme et des allergies *via* une perturbation de la tolérance immunitaire. Les corps exogènes, normalement tolérés par l'organisme, vont alors déclencher une réponse immunitaire disproportionnée (Ferreira et al., 2014; Noverr and Huffnagle, 2005). Notamment, des réactions allergiques exacerbées ont été observées chez des souris axéniques ou chez des souris recevant une antibiothérapie (Chung et al., 2012; Hill et al., 2012; Stefka et al., 2014). Ces réactions seraient liées à une différenciation des LTh anormale (balance

LTh2/LTh1) ainsi qu'à une non maturation des LTreg, montrant l'importance de l'interaction du microbiote intestinal avec le SI. Ces résultats supportent l'observation qu'une exposition microbienne chez l'enfant est cruciale pour le bon développement de l'immunité et est associée à une diminution de l'apparition d'évènements allergiques (Kamada et al., 2013; Russell and Finlay, 2012).

3.2.2. Les maladies métaboliques

De par son rôle primordial dans le métabolisme de l'hôte, le microbiote intestinal est également impliqué dans les troubles métaboliques tels que l'obésité ou le diabète de type 2 (**Tableau 4**). Dans le cadre de l'obésité, des études conduites en modèle murin ont ainsi permis de montrer que contrairement aux animaux conventionnels, les souris axéniques ne développent pas d'obésité lorsqu'elles consomment une alimentation riche en sucres et en graisses (Bäckhed et al., 2007). Par ailleurs, il a aussi été démontré que le phénotype d'obésité est transmissible par transplantation fécale d'une souris obèse (déficiente du gène codant la leptine) à une souris maigre sans modification de l'alimentation (Turnbaugh et al., 2006). De manière générale, le phénotype d'obésité est associé à une augmentation de l'abondance des Firmicutes et une diminution de celle des Bacteroidetes. Cette modification est liée à une augmentation de la capacité du microbiote à extraire de l'énergie à partir des aliments ainsi qu'à l'établissement d'une inflammation à bas bruit (Ley et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006, 2009a). De récents travaux ont notamment proposé que le microbiote pourrait influencer le métabolisme énergétique de l'hôte *via* le métabolisme microbien des acides biliaires (Parséus et al., 2017; Trabelsi et al., 2015). Le diabète de type 2, dont l'obésité est un facteur de risque avéré, est également associé à une altération de la composition du microbiote intestinal caractérisé par une réduction de la diversité. Ce dernier serait impliqué dans le développement de la résistance à l'insuline et dans l'instauration d'un état inflammatoire (Bekkering et al., 2013). Récemment, Pedersen *et al.* ont mis en évidence, chez des individus présentant une résistance à l'insuline, un métabolome sérique enrichi en acides aminés branchés. Ils ont également identifié les espèces bactériennes *Prevotella copri* et *Bacteroides vulgatus* comme étant les espèces principalement impliquées dans l'association entre les acides aminés branchés et les mécanismes de résistance à l'insuline (Pedersen et al., 2016).

3.2.3. Les pathologies cardio-vasculaires

Le microbiote intestinal est aussi impliqué dans le développement de maladies cardiovasculaires de par son rôle dans le métabolisme de la choline (**Tableau 4**) (Lau et al., 2017; Tang et al., 2017). Cette dernière est un nutriment essentiel apporté par l'alimentation en particulier par les œufs et la viande rouge. La choline est métabolisée principalement par le foie mais le microbiote intestinal catalyse aussi sa conversion en triméthylamine (TMA) (Rath et al., 2017; Romano et al., 2015). La TMA est ensuite métabolisée en triméthylamine-N-oxyde (TMAO) au niveau hépatique. Cette molécule possède des propriétés délétères qui favorisent le développement de l'athérosclérose, établissant ainsi le lien entre microbiote intestinal et maladies cardio-vasculaires (Wang et al., 2011; Zhu et al., 2016). De façon intéressante, des travaux ont mis en évidence les capacités métaboliques des archées pour contrecarrer le développement de cette pathologie. En effet, certaines archées, plus précisément le taxon des *Methanomassiliicoccales*, sont capables d'utiliser la TMA comme substrat, détournant la production de TMAO dans le foie et limitant ainsi le risque d'athérosclérose (Borrel et al., 2017; Brugère et al., 2014). Parallèlement au métabolisme microbien de la choline, une dysbiose du microbiote fécal de patients atteints de plaques d'athérome instables a été observée, avec une augmentation du genre *Collinsella* et une diminution des genres *Roseburia* et *Eubacterium* (Karlsson et al., 2012). Enfin, de récents travaux ont montré une association entre le microbiote intestinal et l'hypertension en modèle animal, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas encore clairement établis (Adnan et al., 2017; Mell et al., 2015; Yang et al., 2015). Une dysbiose a été observée chez des rats souffrant d'hypertension avec une réduction de la richesse et de la diversité microbienne ainsi qu'une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes (Yang et al., 2015). Enfin, l'utilisation de souches probiotiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*), seules ou co-administrées sur le long terme, réduit l'hypertension, principalement lorsque cette dernière présente une valeur de référence élevée (Gomez-Guzman et al., 2015; Khaledi et al., 2014).

3.2.4. Les troubles neurologiques et/ou comportementaux

De nombreux liens entre microbiote intestinal et système nerveux central (SNC) ont pu être établis, à la fois au niveau de la morphologie et de la physiologie du cerveau mais

également sur le développement de troubles neurologiques et/ou comportementaux comme l'autisme ou encore la maladie d'Alzheimer (**Tableau 4**) (Heijtz et al., 2011; Sudo et al., 2004).

La recherche, basée sur l'étude d'animaux axéniques, a permis de révéler le rôle du microbiote intestinal (i) dans l'intégrité structurale de certaines régions du cerveau comme l'amygdale et l'hippocampe (Luczynski et al., 2016), (ii) dans les mécanismes de neurogénèse et de myélinisation (Hoban et al., 2016; Ogbonnaya et al., 2015), ainsi que (iii) dans la modulation de la barrière hémato-encéphalique (Braniste et al., 2014). Ces perturbations ont pu être le plus souvent restaurées après supplémentation, soit par des probiotiques (Hornig, 2013) soit par des produits issus du métabolisme microbiens comme les AGCC (Heijtz et al., 2011; Sudo et al., 2004). De nombreux troubles neurologiques et/ou comportementaux ont été récemment associés à une dysbiose du microbiote intestinal. C'est le cas notamment chez des souris et des patients atteints de stress ou de symptômes dépressifs (Dinan and Cryan, 2013; Naseribafrouei et al., 2014; Park et al., 2013). La dépression chronique chez l'Homme a notamment été associée à une augmentation du niveau d'IgM et d'IgA sanguins dirigés contre des lipopolysaccharides d'entérobactéries (Maes et al., 2012). Cependant, il est à noter que les troubles comportementaux sont associés à de nombreux changements dans l'alimentation et l'activité physique qui peuvent influencer la composition du microbiote.

Des travaux ont mis en évidence une altération de la composition du microbiote chez des enfants autistes (Adams et al., 2011; De Angelis et al., 2015; Finegold et al., 2010; Wang et al., 2014). L'autisme est un trouble du développement touchant le cerveau mais, les enfants souffrant de cette pathologie présentent fréquemment des troubles gastro-intestinaux. Le 4-éthylphénylsulfate est un composé microbien produit au niveau intestinal qui a été retrouvé comme enrichi en modèle animal mimant l'autisme et qui a été identifié comme impliqué dans la modulation du comportement (Hsiao et al., 2013). Enfin, l'implication du microbiote intestinal a également été mise en cause dans le développement d'autres pathologies neurologiques comme la sclérose en plaques (Colpitts et al., 2017; Jangi et al., 2016), la maladie de Parkinson (Mukherjee et al., 2016; Sampson et al., 2016) ou encore la maladie d'Alzheimer (Bonfili et al., 2017; Jiang et al., 2017a).

En conclusion, le microbiote intestinal est un facteur déterminant dans de nombreuses pathologies humaines. Celles-ci touchent l'ensemble de l'organisme, du tractus digestif jusqu'au SNC. La grande majorité de ces troubles présente un caractère inflammatoire

associant une perturbation du microbiote intestinal à un dérèglement du SI. D'autres pathologies, comme les maladies cardio-vasculaires ou l'obésité, mettent en cause un dysfonctionnement du rôle métabolique des bactéries intestinales. Certaines pathologies non citées précédemment ont également été associées au microbiote intestinal notamment le syndrome métabolique, la dermatite atopique, la stéatose hépatique non alcoolique ou encore les cancers du foie et du sein.

3.3. Interaction polluant-microbiote et pathologies humaines

Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux POPs puisqu'ils sont un des nombreux facteurs responsables de la hausse de l'obésité, du diabète, de certaines maladies auto-immunes et troubles neurologiques dans le monde (Jin et al., 2014; Neel and Sargis, 2011). Étant donné que l'exposition aux POPs et aux produits chimiques d'origine alimentaire se produit principalement *via* l'alimentation, le TGI et le microbiote intestinal sont perpétuellement exposés à ces composés. Ainsi, de précédents travaux ont montré que les interactions xénobiotiques-microbiote peuvent conduire à des modifications de la composition et des fonctions du microbiote intestinal. Ces changements ont pu être associés, en modèle murin, à des perturbations du métabolisme énergétique, de l'absorption des nutriments et des fonctions du SI (Jin et al., 2017). Notamment, l'exposition de souris à la carbendazime (fongicide), a induit, dès le cinquième jour, une dysbiose du microbiote intestinal, avec une augmentation de l'abondance relative des Firmicutes, Proteobacteria et Actinobacteria et une diminution des Bacteroidetes. Les auteurs ont observé, parallèlement aux modifications du microbiote, une accumulation des lipides hépatiques et des triglycérides dans le foie et les tissus adipeux ainsi qu'une augmentation du niveau d'interleukines (IL) sériques IL-1 β et IL-6, suggérant le développement d'un état inflammatoire chez ces souris (Jin et al., 2015). Une autre étude a montré qu'une administration de TCDF (famille des furanes) par voie orale pendant cinq jours a conduit à une modification profonde de la structure du microbiote intestinal de la souris en réduisant le ratio Firmicutes/Bacteroidetes et en stimulant la fermentation microbienne (augmentation du niveau des AGCC dans les selles et le cæcum) (Zhang et al., 2015b). Ces changements, ont été associés à un métabolisme des acides biliaires altérés chez l'hôte *via* l'inhibition de la voie de signalisation du récepteur FXR. À l'inverse, une exposition chronique à la TCDD (famille des dioxines) pendant 26 semaines, a induit chez la souris une augmentation majeure du rapport Firmicutes/Bacteroidetes. Ces résultats

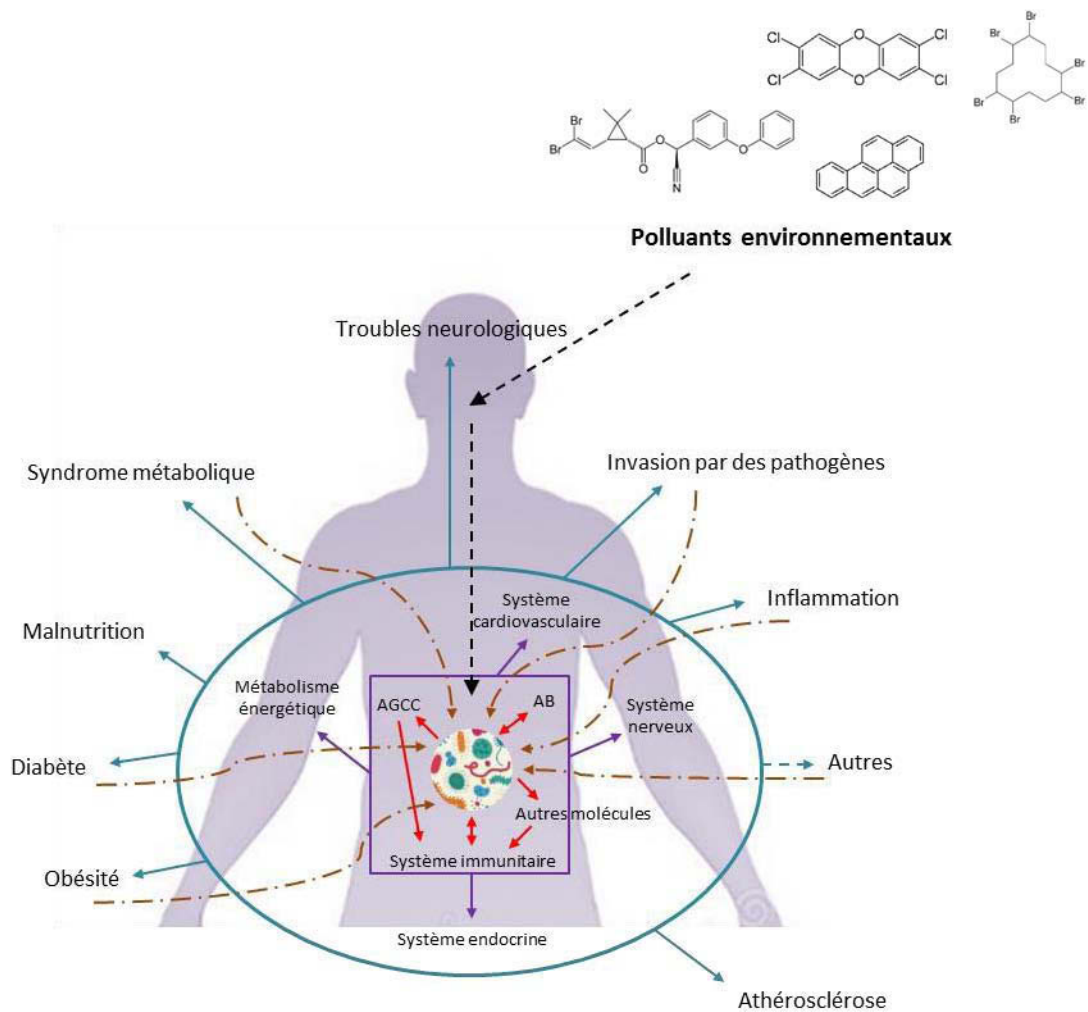


Figure 22 : Impact des polluants environnementaux sur le microbiote intestinal et conséquences sur l'hôte. AB : acides biliaires ; AGCC : acides gras à chaîne courte. Adaptée de Jin *et al.*, 2017.

ont été associés à des effets toxiques au niveau du foie et du SI (Lefever et al., 2016). Pour compléter ces observations, une étude récente a observé, lors d'une exposition de huit jours à la TCDD, l'augmentation de l'expression de 13 gènes de résistance aux antibiotiques et d'un gène codant pour un élément génétique mobile dans le microbiome murin (Stedtfeld et al., 2017). Enfin, des expositions orales aiguës à un mélange de PCB (famille des dioxines-like) ou au B[a]P (famille des HAPs) ont induit, respectivement, soit une diminution de l'abondance relative des Proteobacteria dans le microbiote murin, soit n'a pas eu d'impact significatif sur le microbiote intestinal humain mais a cependant induit une perturbation de l'activité métabolique microbienne (Choi et al., 2013; Defois et al., 2017). D'autres polluants environnementaux tels que le bisphénol (Javurek et al., 2016), le trichloroacétamide (Zhang et al., 2015e), le trichlosan (Yee and Gilbert, 2016) ou encore certains métaux lourds (Zhang et al., 2015c) ont également induit des perturbations du microbiote intestinal liées à de potentiels dysfonctionnements métaboliques et immunitaires chez l'hôte.

Le microbiote intestinal peut, en retour, métaboliser les composés chimiques, détournant ainsi leurs propriétés thérapeutiques (médicaments) ou toxiques (produits chimiques environnementaux et alimentaires) envers l'hôte (Claus et al., 2016; Spanogiannopoulos et al., 2016; Tralau et al., 2014; Wilson and Nicholson, 2016). Maurice et collaborateurs ont rapporté que six molécules thérapeutiques couramment utilisées, ont induit l'expression de 328 gènes microbiens, dont la plupart pourraient être associés au transport ou à la dégradation de ces molécules (Maurice et al., 2013). Il a également été montré, chez l'Homme et le rat, que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un insecticide organochloré, peut être métabolisé en dichlorodiphényl-dichlorophényléthane (DDD) par le microbiote fécal. Le DDT et le DDD étant tous deux des perturbateurs endocriniens probables pour l'Homme, il est difficile de dire si cette biotransformation correspond à une bioactivation ou à une détoxification (Mendel and Walton, 1966; Yim et al., 2008). Enfin, il a été montré que le microbiote intestinal humain est capable de métaboliser le B[a]P et la PhIP, en 7-hydroxybenzo[a]pyrène et en chlorure de 7-hydroxy-5-méthyl-3-phényl-6,7,8,9-tétrahydropyrido [3', 2': 4,5] imidazo [1,2-a] pyrimidin-5-ium (PhIP-M1) identifiés comme les dérivés respectifs du B[a]P et de la PhIP (Fekry et al., 2016; Van de Wiele et al., 2005; Vanhaecke et al., 2006).

Les polluants environnementaux, le microbiote intestinal et l'hôte interagissent ensemble créant un réseau complexe de connexions dont il est difficile à l'heure actuelle d'en connaître les causes et les conséquences (**Figure 22**). Il apparaît cependant que les polluants

environnementaux perturbent l'homéostasie de l'hôte ainsi que l'équilibre du microbiote intestinal pouvant à son tour favoriser le développement de pathologies chez l'Homme.

CHAPITRE 2 : TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Présentation des résultats

Le travail expérimental réalisé au cours de cette thèse a eu pour objectif de mettre en évidence l'impact de polluants environnementaux et/ou néoformés dans les aliments sur le microbiote intestinal humain en modèle *in vitro*. Au sein du laboratoire, ces travaux se situent dans la continuité de travaux précédemment conduits au laboratoire portant sur l'impact d'une exposition orale chronique au B[a]P, sur le microbiote intestinal murin (Rivière et al., 2016). L'ensemble de ces travaux sera présenté en deux parties dans ce manuscrit.

La première partie est consacrée à l'étude de l'impact du benzo[a]pyrène (B[a]P), un hydrocarbure aromatique polycyclique, sur la structure et les fonctions du microbiote intestinal humain.

Article n°1 :

ENVIRONMENTAL POLLUTANT BENZO[A]PYRENE IMPACTS THE VOLATILE METABOLOME AND TRANSCRIPTOME OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA

Clémence Defois, Jérémy Ratel, Sylvain Denis, Bérénice Batut, Réjane Beugnot, Eric Peyretilade, Erwan Engel and Pierre Peyret

Frontiers in Microbiology, Août 2017, 8:1562.

La seconde partie s'intéresse à l'impact de six polluants environnementaux et/ou néoformés dans les aliments, sur les fonctions du microbiote intestinal humain ainsi que les effets potentiels de l'interaction polluant-microbiote sur l'homéostasie du tractus digestif.

Article n°2 :

PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS AND FOODBORNE CHEMICALS INDUCE CHANGES OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA ACTIVITY WITH POTENTIAL IMPACT ON THE GUT HOMEOSTASIS

Clémence Defois, Jérémy Ratel, Ghislain Garrat, Sylvain Denis, Olivier LeGoff, Jérémie Talvas, Eric Peyretilade, Erwan Engel, Pierre Peyret

Article en préparation

1. Impact du B[a]P sur la structure et les fonctions du microbiote intestinal humain

1.1. Introduction à la publication n°1

Le B[a]P est un composé chimique mutagène et cancérigène pour l'Homme appartenant à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (IARC, 2012a). L'exposition aux HAPs se produit principalement par voie orale à partir de produits alimentaires naturellement contaminés mais également par la consommation de produits transformés par la cuisson au barbecue ou encore le fumage (Lee et al., 2016; Martorell et al., 2012; Veyrand et al., 2013).

Les organes cibles de la toxicité du B[a]P semblent dépendants de la voie d'exposition. L'inhalation de B[a]P induirait préférentiellement des cancers du poumon (Denissenko et al., 1996; Mumford et al., 1993; Ueng et al., 2010), alors que le tractus gastro-intestinal (TGI) (Huderson et al., 2013; Labib et al., 2013; Sinha et al., 2005), le foie (Ba et al., 2015; Kroese et al., 2001) et le sein (Guo et al., 2015; White et al., 2016) seront les principaux organes cibles d'une exposition orale. Le mécanisme d'action de la toxicité du B[a]P est lié à sa métabolisation par les enzymes de l'hôte en composés diol-époxydes capables de former des adduits à l'ADN (portion d'ADN liée de façon covalente à un composé chimique) (Ewa and Danuta, 2016; Paules et al., 1988; Pratt et al., 2011). Une partie de ces adduits, s'ils ne sont pas réparés, s'accompagnent de mutations génétiques dans les tissus.

Alors que la toxicité du B[a]P sur l'hôte est bien décrite, son impact sur le microbiote intestinal de l'Homme n'a pas encore été étudié. Pourtant, le microbiote intestinal a été associé à de nombreuses pathologies digestives (Kostic et al., 2014) et extra-digestives (Chen et al., 2008; Mu et al., 2016; Teng et al., 2016; Vatanen et al., 2016; Vijay-Kumar et al., 2010). L'exposition du microbiote intestinal murin à d'autres polluants environnementaux (furanés, fumée de cigarette) a montré des perturbations de la structure et des fonctions microbiennes pouvant altérer certaines voies métaboliques de l'hôte (Allais et al., 2015; Zhang et al., 2015b). Ainsi, la toxicité des xénobiotiques chez l'hôte, doit également prendre en compte l'impact de ces molécules chimiques sur le microbiote intestinal.

L'objectif de cette première étude a été de déterminer, *in vitro*, si une exposition aiguë de B[a]P pouvait induire une dysbiose de la structure et/ou des fonctions du microbiote

intestinal humain. L'exposition a été réalisée à partir de deux microbiotes fécaux humains, en culture batch (ou système fermé) de 24h, à trois concentrations graduelles de B[a]P. Le séquençage de la région V3-V4 du gène exprimant l'ARNr 16S et du transcrite, a été réalisé afin de suivre respectivement les communautés présentes et actives dans la communauté microbienne. L'étude des fonctions du microbiote a été appréhendée par métatranscriptomique et par volatolomique afin de suivre l'impact du B[a]P sur l'expression des gènes et sur le profil des composés organiques volatils du microbiote, composés effecteurs de l'activité microbienne.

1.2. Principaux résultats obtenus

Deux microbiotes fécaux humains ont été exposés au B[a]P à trois concentrations graduelles pendant 24h en système fermé. Dans ces conditions expérimentales, l'exposition au B[a]P n'a pas induit de changement significatif de la composition des microorganismes actifs au sein de la communauté. Les analyses d' α -diversité (diversité intra échantillon) n'ont pas montré d'effet de l'exposition au B[a]P sur la richesse et sur la diversité des communautés bactériennes. Bien que les analyses de β -diversité (diversité inter échantillons) « weighted Unifrac » ne montrent pas de changements significatifs dans la composition et l'abondance relative des taxa, certains groupes bactériens semblent potentiellement impactés suite à l'exposition par le B[a]P. Une augmentation de l'abondance relative des familles des *Sutterellaceae* (anciennement *Alcaligenaceae*), *Ruminococcaceae* et *Tissierellaceae* est observée en présence de B[a]P alors que l'abondance des familles des *Lachnospiraceae* et des *Rikenellaceae* diminue en présence du polluant.

Le B[a]P n'a pas induit de changement notable de la structure du microbiote fécal. Cependant, l'expression des gènes ainsi que l'abondance de certains composés volatils ont été altérés, révélant une déviation du métabolisme microbien en réponse à la présence du polluant. Des composés volatils microbiens marqueurs de cette exposition, ont ainsi pu être identifiés avec une augmentation significative de molécules appartenant à la classe des benzenoïdes, des phénols et une déplétion d'esters, de furanes et de cétones. Ces variations, observées dans le volatolome microbien, ont notamment été reportées en réponse à des désordres métaboliques du TGI tels que la maladie de Crohn ou encore la colite ulcéraire. L'altération des composés volatils microbiens semble également être dose dépendante. Au

niveau de l'expression des gènes, certaines voies métaboliques ont été observées comme surexprimées ou réprimées dans les métatranscriptomes microbiens suite à l'exposition au B[a]P. Une augmentation du niveau de transcrits de voies impliquées dans (i) le métabolisme des vitamines et des cofacteurs, (ii) le métabolisme de composés pariétaux, (iii) les systèmes de réplication et de réparation de l'ADN, et dans (iv) le métabolisme de composés aromatiques a pu ainsi être mise en évidence. A l'inverse, le niveau de transcrits impliqués dans le métabolisme des glucides était diminué par le polluant. Bien que le B[a]P ne semble pas induire de dysbiose du microbiote fécal dans ces conditions expérimentales, les modifications observées dans l'activité du microbiote pourraient, en revanche, altérer l'homéostasie du tractus digestif de l'hôte.

1.3. Article n°1 : “ Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human Gut Microbiota. ”



Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human Gut Microbiota

Clémence Defois¹, Jérémy Ratel², Sylvain Denis¹, Bérénice Batut¹, Réjane Beugnot¹, Eric Peyretailade¹, Erwan Engel² and Pierre Peyret^{1*}

¹ MEDIS, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, ² UR370 QuaPA, MASS Team, Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genes-Champagnelle, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Rachel Susan Poretsky,
University of Illinois at Chicago,
United States

Reviewed by:

William C. Nelson,
Pacific Northwest National Laboratory
(DOE), United States
Florian-Alexander Herbst,
Aalborg University, Denmark

*Correspondence:

Pierre Peyret
pierre.peyret@uca.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Systems Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 21 April 2017

Accepted: 02 August 2017

Published: 15 August 2017

Citation:

Defois C, Ratel J, Denis S, Batut B, Beugnot R, Peyretailade E, Engel E and Peyret P (2017) Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* 8:1562. doi: 10.3389/fmicb.2017.01562

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a ubiquitous, persistent, and carcinogenic pollutant that belongs to the large family of polycyclic aromatic hydrocarbons. Population exposure primarily occurs via contaminated food products, which introduces the pollutant to the digestive tract. Although the metabolism of B[a]P by host cells is well known, its impacts on the human gut microbiota, which plays a key role in health and disease, remain unexplored. We performed an *in vitro* assay using 16S barcoding, metatranscriptomics and volatile metabolomics to study the impact of B[a]P on two distinct human fecal microbiota. B[a]P exposure did not induce a significant change in the microbial structure; however, it altered the microbial volatolome in a dose-dependent manner. The transcript levels related to several metabolic pathways, such as vitamin and cofactor metabolism, cell wall compound metabolism, DNA repair and replication systems, and aromatic compound metabolism, were upregulated, whereas the transcript levels related to the glycolysis-gluconeogenesis pathway and bacterial chemotaxis toward simple carbohydrates were downregulated. These primary findings show that food pollutants, such as B[a]P, alter human gut microbiota activity. The observed shift in the volatolome demonstrates that B[a]P induces a specific deviation in the microbial metabolism.

Keywords: human gut microbiota, polycyclic aromatic hydrocarbons, 16S amplicon sequencing, volatolomics, metatranscriptomics

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of great concern as environmental and foodborne pollutants. These persistent organic pollutants are known to remain in environmental compartments (air, water, soil, and food) and bioaccumulate in organisms (Douben, 2003). Benzo[a]pyrene (B[a]P) is the most well-characterized and toxic member of the PAH compound family. Because of its mutagenic and carcinogenic effects in animal models (Baird et al., 2005;

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; B[a]P, benzo[a]pyrene; ECSIM, environmental control system for intestinal microbiota; FM, fecal microbiota; GIT, gastrointestinal tract; IARC, International Agency for Research on Cancer; IBD, inflammatory bowel disease; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; PCoA, principal coordinate analysis; TCDF, 2,3,7,8-tetrachloro dibenzofuran; VOC, volatile organic compound.

Huderson et al., 2013) and the genotoxic effects observed in humans exposed to B[a]P-containing mixtures (White et al., 2016), B[a]P has been categorized as a human group 1 carcinogen by the IARC (IARC, 2012). Human exposure to PAHs mainly occurs via oral uptake from naturally contaminated food products (Martorell et al., 2012; Veyrand et al., 2013) and the consumption of charcoal-grilled, roasted or smoked food (Lee et al., 2016). However, a recent Chinese cohort study determined that the contribution of high-PAH containing foods, such as barbecued, smoked or deep-fried meats, was approximately 13% of the overall daily dietary intake because of the low associated consumption rates (Duan et al., 2016). Exposure to PAHs occurs to a lesser extent via the inhalation of polluted air particles from cigarette smoke, engine exhaust and domestic heating. Animal model experiments along with *in vitro* cellular studies and clinical studies have shown that the toxicity of B[a]P and B[a]P-containing mixtures targets different organs in the body and has the potential to develop adenomas. The location of tumors appears to be related to the route of exposure. Inhalation of B[a]P preferentially induces lung cancer (Mumford et al., 1993; Denissenko et al., 1996; Ueng et al., 2010), and oral administration preferentially induces tumors and cancers in the GIT (Sinha et al., 2005; Huderson et al., 2013; Labib et al., 2013), liver (Kroese et al., 2001; Ba et al., 2015) and breast (Guo et al., 2015; White et al., 2016). However, because of the difficulty of assigning a particular toxic effect to a particular route of exposure, most clinical studies are focused on environmental B[a]P exposure, including air and oral intake (Su et al., 2014; Tian et al., 2016). Furthermore, the inhalation of polluted air particles also leads to B[a]P transport to the GIT via the mucociliary clearance mechanism (Möller et al., 2004; Mutlu et al., 2011). Once in the GIT, B[a]P enters the entero-hepatic circulatory system and is metabolized by cytochrome P450-dependent monooxygenases present in intestinal enterocytes and liver hepatocytes, thus leading to the formation of diol-epoxide compounds. These toxic molecules subsequently form B[a]P-DNA adducts (DNA binding products) that have been previously characterized as necessary for B[a]P-initiated carcinogenesis (van Herwaarden et al., 2009).

Although the human enzyme metabolism of B[a]P and its impacts on human health have been well described, studies have not been performed to determine the possible impact of B[a]P on microorganisms living in the human GIT. This microbial community, known as the human gut microbiota, is considered a near-organ and plays major roles in human health. Several pathologies are associated with characteristic shifts in the structure of the gut microbiota (also called dysbiosis), such as IBD (Kostic et al., 2014) and extra-digestive disorders, which include metabolic syndromes (e.g., obesity, diabetes, etc.), autoimmune disorders and neurological disturbances (Vijay-Kumar et al., 2010; Chen et al., 2014; Mu et al., 2016; Teng et al., 2016; Vatanen et al., 2016). Gut microbiota dysbiosis can also lead to the emergence of intestinal pathogens naturally present in the GIT such as *Clostridium difficile* (Antharam et al., 2013). Exposure of the murine gut microbiota to xenobiotics leads to perturbations in microbial structures and functions (Zhang L. et al., 2015). Zhang L. et al. (2015) showed that dietary TCDF altered mice gut microbiota by reducing the ratio of *Firmicutes*

to *Bacteroidetes*. Furthermore, AhR signaling activation induces dietary TCDF to alter many host metabolic pathways involved in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and glycogenolysis, bacterial fermentation, and amino acid and nucleic acid metabolism. Allais et al. (2015) exposed mice to cigarette smoke for 24 weeks and observed alterations in the bacterial community structure. Furthermore, the level of 16S rRNA expression (and therefore the activity) of *Lachnospiraceae* sp. strongly increased in the colon. Besides metagenomics and metatranscriptomics, volatolomics has proven to be a promising omic approach to diagnose metabolism changes in response to physiological stresses induced by pathology (Hakim et al., 2012) or xenobiotic exposure (Berge et al., 2011). Regarding gastrointestinal or inflammatory disorders, Ahmed et al. (2013, 2016) reported that changes in fecal VOC pattern may result from changes in the microbiota and/or pathologies in the GIT.

Although studies have not focused on the impact of B[a]P on the human gut microbiota, B[a]P metabolism has been demonstrated by this microbial consortium. van de Wiele et al. (2005) showed, *in vitro*, that the human gut microbiota can biotransform B[a]P into estrogenic metabolites, and they also identified 7-hydroxybenzo[a]pyrene as a B[a]P derivative.

To highlight the underlying mechanisms and associated consequences of the interaction between B[a]P and gut microbiota, we performed 16S barcoding, metatranscriptomic and volatolomic analysis to determine the impact of B[a]P on two distinct human fecal microbiota.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

B[a]P ($\geq 96\%$ HPLC, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was incubated in batches with three replicates along with two different FM suspensions sampled from the continuous fermentor ECSIM (Feria-Gervasio et al., 2014). The FM suspensions contained *in vitro* cultured FM, which were collected from two human volunteer donors: fecal microbiota-1 (FM-1) and fecal microbiota-2 (FM-2) (This study was a non-interventional study with no additions to usual clinical care. According to the French Health Public Law (CSP Art L 1121-1.1), such a protocol does not require approval of an ethics committee). B[a]P is a highly hydrophobic organic compound; thus, to avoid solubility issues in next incubation step, B[a]P was dissolved in sunflower seed oil (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) as described in a wide range of animal studies (Verhofstad et al., 2010; Hodek et al., 2013). The B[a]P and all contaminated effluents and materials were handled in an advised and safe manner with all necessary precautions.

Both FM-1 and FM-2 were incubated (i) with B[a]P (dissolved in sunflower seed oil) at three serial concentrations of 0.005, 0.05, and 0.5 mg/mL, (ii) with sunflower seed oil (vehicle) and (iii) without B[a]P or sunflower seed oil (control). The incubation step was performed in amber flasks (to avoid photocatalytic effects) under shaking at 37°C for 24 h. As the incubation step is processed in a batch fermentor, the incubation time cannot go beyond 24 h because of medium nutrient depletion, acidification

and cell accumulation. The incubation volume (30 mL) was composed of one-fourth FM (sampled from the continuous fermentor) and three-fourths colon medium (see Supplementary Table S1).

At the beginning (T0) and the end (T24) of the incubation step, samples dedicated to DNA extraction were stored at -20°C and those for RNA extraction were immediately centrifuged at $900 \times g$ for 8 min. The pellets were then resuspended in five volumes of RNeasy[®] (Fisher Scientific, Illkirch, France) and maintained at -80°C until extraction. The remaining incubation medium was maintained at -80°C for the VOCs analysis.

Nucleic Acid Extraction

Genomic DNA (gDNA) extractions were performed using a QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) with the following modifications: the samples were centrifuged for 7 min at $900 \times g$ and 4°C and pellets were resuspended with ASL buffer according to the manufacturer's instructions. The final elution volume was 120 μL instead of 200 μL . The quantity and quality of the gDNA were assessed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and by gDNA electrophoresis on a 0.8% agarose gel.

Total RNA extractions were performed using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) with the following modifications: the samples were centrifuged for 8 min at $6000 \times g$ to promote flow through the RNeasy[®] before initiating the cell lysis step. The remaining DNA was removed using a TURBO DNA-free[™] kit (Fisher Scientific). The quantity and quality of the treated RNA were assessed using a NanoDrop 2000 spectrophotometer and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France). Finally, the treated RNA was either stored at -80°C until the RNA-Seq analysis or underwent reverse transcription using a SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Fisher Scientific) to generate 16S rRNA-based amplicons for the barcoding analysis.

16S rDNA/rRNA Amplicon Sequencing and Analysis

Library construction and paired-end sequencing (2×300 bp) were conducted at UMR1289 TANDEM (Toulouse, France) on an Illumina MiSeq platform. The V3–V4 region of the 16S rRNA genes was amplified using the “universal” bacterial primers 343F (ACGGRAGGCAGCAG) (Liu et al., 2007) and 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT) (Andersson et al., 2008), and the library construction was assessed using the TruSeq DNA library preparation protocol (Illumina). 16S rDNA/rRNA amplicon sequencing was performed on both gDNA (referred to as 16S rDNA amplicon sequencing) and reverse-transcribed RNA (referred to as 16S rRNA amplicon sequencing). gDNA was used to investigate the presence of bacteria that are dead or alive within the sample, and cDNA from rRNA was used to investigate bacteria that are alive and active within the sample.

Paired-end reads were joined with fastq-join from the ea-utils software package (Aronesty, 2013), and the resulting sequences were analyzed using the software package Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME v. 1.8.0) (Caporaso et al., 2010).

After de-multiplexing, the sequences were assessed for quality with PRINSEQ (Schmieder and Edwards, 2011), and chimeras were removed using USEARCH 6.1 (Edgar, 2010). Operational taxonomic units (OTUs) were generated with a 97% similarity threshold and taxonomically assigned using the Greengenes database (DeSantis et al., 2006) with UCLUST (Edgar, 2010).

The samples were randomly normalized to the same sequencing depth (16,595 and 10,716 sequences for the FM-1 samples (for the rDNA and rRNA amplicons, respectively), 30,495 and 24,538 sequences for the FM-2 samples (for the rDNA and rRNA amplicons, respectively)). The alpha- (Chao1, Shannon index) and beta-diversity (PCoA on a weighted Unifrac distance matrix) analyses were performed using QIIME. Statistical analyses of the microbial relative abundances were conducted using the Mann-Whitney *U*-test with GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, United States), and the statistical significance was set at $p < 0.05$.

Microbial Volatolome Analysis

The volatile compounds in the samples were analyzed via solid-phase microextraction (SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as previously described (Bouhleb et al., 2017). Briefly, an automated sampler (MPS2, Gerstel) was used to conduct the following successive steps: (i) the sample was preheated in the agitator (500 rpm) for 10 min at 40°C , (ii) the volatile compounds were trapped by SPME (75 μm carboxen-polydimethylsiloxane, 23 gauge needle, Supelco) for 30 min at 40°C , and (iii) thermal desorption was performed at 280°C for 2 min in splitless mode in the GC inlet. A volatile compounds analysis was performed by GC-full scan MS (GC6890, MS5973N, Agilent). The volatile compounds were separated on a RTX-5MS column (60 m \times 0.32 mm \times 1 μm , Restek) according to previously established settings (Bouhleb et al., 2017). The volatiles were tentatively identified according to a comparison between their mass spectra and the NIST 14 mass spectral library and between published retention indices (RI) values and the RI values of an internal databank. The peak area of the tentatively identified compounds was determined for each of the targeted molecules using a mass fragment selected for its specificity and freedom from co-elution.

The data were processed using the Statistica Software (v.10) (StatSoft, Maisons-Alfort, France) and the R software (v.2.1.4). ANOVAs ($p < 0.05$) with a Dunnett's *post hoc* test were conducted on the data and principal component analyses (PCA) were performed on the discriminant volatile compounds selected to visualize the structure of the data.

RNA Sequencing (RNA-Seq) and Analysis

Pooled total RNA (from the three biological replicates) was depleted in the 16S and 23S rRNA using a solution hybridization method (adapted from Ribo-Zero[™] rRNA Removal kit). Library construction (following the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation, Illumina) and paired-end sequencing (MiSeq, 2×300 bp) were performed at Fasteris (Plan-les-Ouates, Switzerland).

The paired-end sequences were assessed for quality with PRINSEQ (Schmieder and Edwards, 2011) and joined with

fastq-join from the ea-utils software package (Aronesty, 2013), and the rRNA sequences were removed from the data set using SortMeRNA (v. 2.0) software (Kopylova et al., 2012). The rRNA depleted-data set was then submitted to a BLASTX analysis with Diamond (Buchfink et al., 2014) against the NCBI non-redundant protein database (nr). Hits with an *e*-value smaller than 1×10^{-3} were investigated with the MEGAN software (v5), (Huson et al., 2007) to perform functional assignment using the KEGG classification. The MEGAN software supports, since version4 (Huson et al., 2011) metagenomic and metatranscriptomic data sets and has been used in studies of microbial ecology (Yu and Zhang, 2012). Finally, the reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) abundances of the KEGG functional pathways were obtained using the HMP Unified Metabolic Analysis Network2 (HUMAN2) software (v0.5) (Abubucker et al., 2012).

RESULTS

No Significant Changes in the Structure of Human Fecal Microbiota Following B[a]P Exposure

Two human FM were exposed to three B[a]P concentrations (0.005, 0.05, and 0.5 mg/mL) for 24 h, and their structures were assessed via 16S rDNA/rRNA-based amplicon sequencing. Treatments without B[a]P but with sunflower seed oil (vehicle) or without oil (control) were also conducted to differentiate the impact of B[a]P on the microbial communities. At T24 for each condition (the three B[a]P concentrations, vehicle and control), the results are provided as the mean relative abundances of the three technical replicates. Because all of the conditions started from the same FM suspension, the results at T0 are considered the mean relative abundances of the fifteen technical replicates.

At T0, the number of mean observed OTUs for FM-1 and FM-2 was 250 and 292 for 16S rDNA analysis, respectively, and 151 and 324 for the 16S rRNA analysis, respectively (see Supplementary Table S2). The initial microbial structure (based on the 16S rDNA amplicons) (Figure 1) showed that the FM-1 and FM-2 compositions were clearly distinct. Although *Bacteroidetes* and *Firmicutes* were the two most represented phyla found in both structures (82.6 and 12.2% for FM-1 and 69 and 27.1% for FM-2, respectively) (Figures 1A,B), the dominant family compositions differed (Figures 1C,D). Indeed, the *Bacteroidaceae* and *Prevotellaceae* families strongly dominated the FM-1 structure and showed 50.7 and 26% relative abundances, respectively, whereas *Bacteroidaceae* (48.1%), *Rikenellaceae* (12.2%), *Porphyromonadaceae* (8.8%), *Lachnospiraceae* (8.4%), *Tissierellaceae* (7.9%), and *Ruminococcaceae* (7%) were the most represented families in the FM-2 structure. The most represented OTUs were assigned to *Bacteroides uniformis* (34.1% of sequences) and *Bacteroides* sp. (33.8% of sequences) for FM-1 and FM-2, respectively. The 16S rRNA-based amplicon analysis (see Supplementary Figure S1) presented differences in the composition of the active

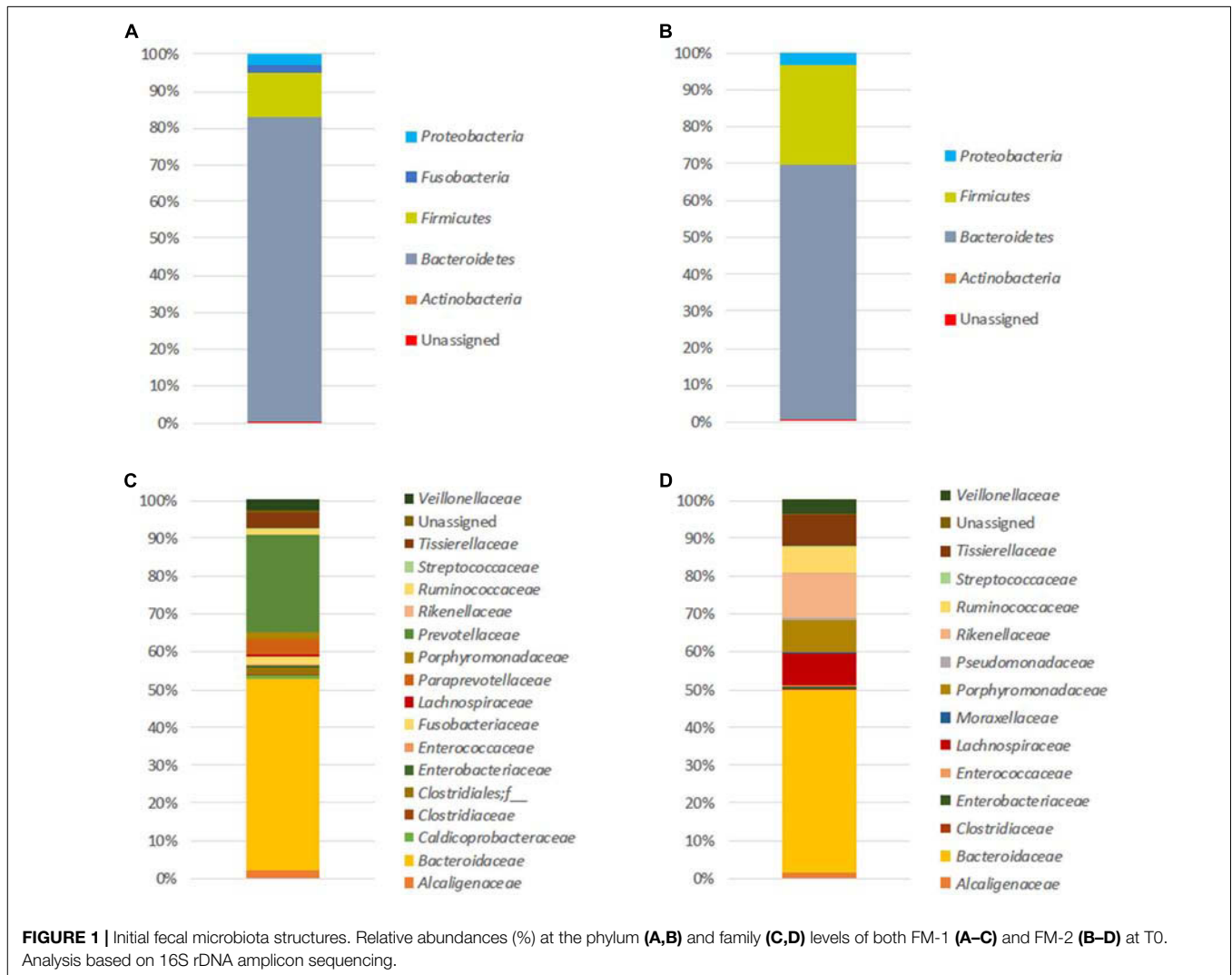
microbiota, even at the phylum level (see Supplementary Figures S1A,B). Although the phylum *Bacteroidetes* is represented in both structures with the same relative abundance (60–65%), the microbial activity in FM-1 and FM-2 was dominated by the phyla *Fusobacteria* (28%) and *Firmicutes* (26.9%), respectively. The differences increased at the family level (see Supplementary Figures S1C,D), with three dominant active families for FM-1 [*Prevotellaceae* (29.8%), *Fusobacteriaceae* (28%), and *Bacteroidaceae* (25.5%)] and four for FM-2 [*Bacteroidaceae* (31.5%), *Ruminococcaceae* (21.8%), *Rikenellaceae* (17.8%), and *Porphyromonadaceae* (15.4%)]. The most represented OTUs were assigned to *Prevotella copri* (28% of sequences) and *Bacteroides* sp. (20.4% of sequences) for FM-1 and FM-2, respectively.

At T24 and depending on the experimental conditions, the number of observed OTUs for FM-1 ranged from 341 to 373 for the 16S rDNA analysis and from 147 to 190 for the 16S rRNA analysis. For FM-2, the number of observed OTUs ranged from 242 to 309 for the 16S rDNA analysis and from 264 to 310 for the 16S rRNA analysis (see Supplementary Table S2). In the batch cultures, dead cells were not removed from the medium; therefore, after 24 h of fermentation, the DNA extracted from the medium could not be used to determine the structure of the microbial community, and only the 16S rRNA sequences were used to analyze and compare the FM structures.

For both FM, significant differences were not observed in the alpha-diversity among the vehicle, control and B[a]P exposed samples. The diversity (Shannon's index) and richness (chao1, observed_otus) values were equivalent for each condition tested (see Supplementary Table S2). A PCoA shows that sunflower seed oil exposure induced a change in the fecal bacterial pattern compared to the control samples (without B[a]P nor oil) (see Supplementary Figure S2). This result confirms the need to include a vehicle control in such an experimental design as observed in other studies (Maurice et al., 2013; Zhang L. et al., 2015). Thus, to remove the sunflower oil effects, the B[a]P conditions were further directly compared with vehicle samples. After 24 h of incubation, significant changes were not observed in the structure of the active FM after B[a]P exposure (see Supplementary Figure S3). However, relative abundance trends occurred at the family level (Figure 2), as the increase in the abundance of the *Alcaligenaceae* family for both microbiota primarily at the lowest dose of B[a]P (0.005 mg/mL). The mean relative abundance increased from 11.4 to 13.4% and from 5.4% to 12.2% for FM-1 and FM-2, respectively. The *Ruminococcaceae* and *Tissierellaceae* families also increased from 1.0 to 1.8% for FM-1 (at 0.005 mg/mL) and from 3.3 to 5.1% (at 0.5 mg/mL) for FM-2. Finally, the *Lachnospiraceae* (from 5.9 to 3.4% at 0.005 mg/mL) and the *Rikenellaceae* (5.2 to 4.4% at 0.5 mg/mL) families decreased for FM-1 and FM-2, respectively.

B[a]P Exposure Alters the Microbial Volatolome

Although B[a]P did not significantly perturb the FM structures, the microbial activity could be altered. Microbial VOCs are the result of microbial biological activity. The volatolome may



thus reflect deviations in microbial metabolism in response to a stimulus. In this work, a non-targeted analysis of the microbial volatolome was conducted to detect potential volatile biomarkers as a response to B[a]P exposure.

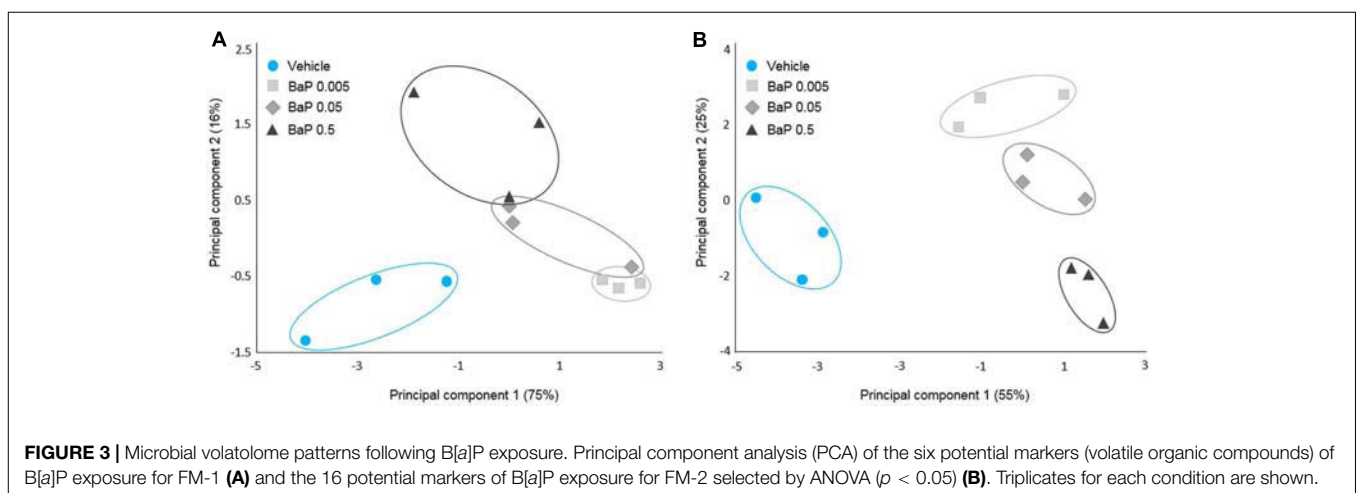
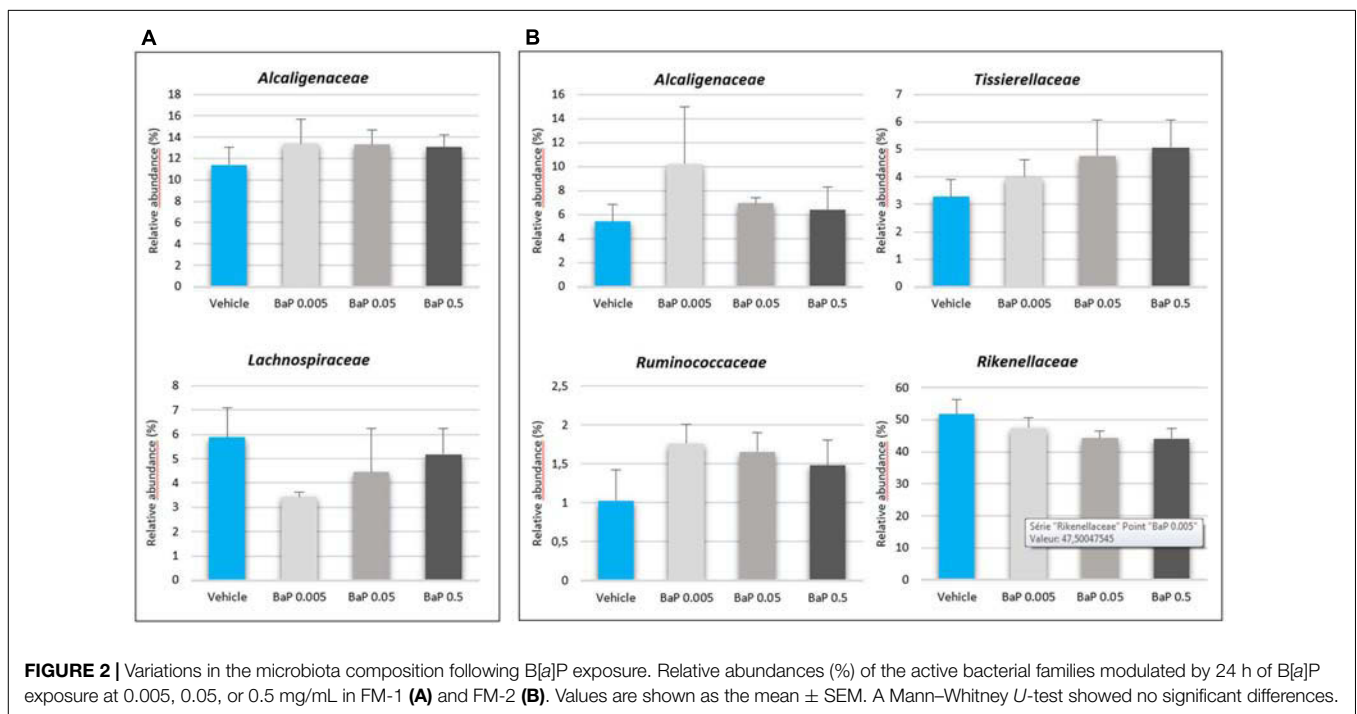
To characterize the effect of B[a]P on the microbial volatolome, more than 200 VOCs were determined by SPME-GC-MS after the incubation step (T24). PCAs were performed on the discriminant VOCs selected by ANOVA with Dunnett’s *post hoc* test. To account for the sunflower seed oil effect, the B[a]P results were compared with the vehicle sample results. For each microbiota (FM-1 and FM-2), vehicle samples were clearly differentiated from the three B[a]P conditions, and each B[a]P condition was distinct from the others (Figure 3). Furthermore, B[a]P exposure appears to change the microbial volatolome in a dose-dependent manner because a linear trend was observed between the three dose groups.

To determine the combined FM responses under B[a]P exposure, an ANOVA with Dunnett’s *post hoc* test was performed on the combined data set of the two microbiota. The Table 1 lists the seven VOCs which are detected in the microbiota

volatolome as significantly altered by the exposure to B[a]P, among which six out of them have been tentatively identified. These shared markers highlight similar functional responses for the two microbiota in terms of volatolome, even if the two microbiota structures were clearly different as shown in Figure 1.

B[a]P Exposure Alters the Microbial Metatranscriptome

The volatolome analysis showed that the microbial activity changed after 24 h of B[a]P exposure. Thus, we investigated the microbial gene response. The FM metatranscriptome analysis was performed on the samples exposed to the highest concentration of B[a]P (0.5 mg/mL) at T24 to identify how B[a]P exposure affected the transcript levels. A functional assignment of metabolic pathways was performed using the KEGG classification, and the results are given as RPKM abundances. To avoid sunflower seed oil effect, the B[a]P samples were directly compared with the vehicle samples. More than 200



metabolic KEGG pathways derived from the KEGG Orthology (KO) database were mapped to the samples (206 and 200 for FM-1 and 240 and 235 for FM-2 for the B[a]P and vehicle samples, respectively).

Upregulated and downregulated pathways are represented in Figure 4 as the log of the B[a]P and vehicle RPKM abundance ratios. Four metabolic groups (including several KEGG metabolic pathways) that were over-expressed in both metatranscriptomes emerged from the analysis. These pathways included vitamin and cofactor metabolism, cell wall compound metabolism, DNA repair and replication systems, and aromatic compound metabolism. Few pathways involved in carbohydrate metabolism were downregulated by B[a]P exposure for both FM. Glycolysis/gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway were repressed in the FM-1 metatranscriptome, whereas bacterial

chemotaxis toward simple carbohydrate (glucose and galactose) was repressed in the FM-2 metatranscriptome.

DISCUSSION

B[a]P is a ubiquitous environmental pollutant that bioaccumulates in organisms and is formed *de novo* by certain food processing methods, such as smoking and high cooking temperatures. Although digestive and extra digestive pathologies have been linked to compositional or functional alterations of the gut microbiota, B[a]P-induced perturbations of the human gut microbiota have not been previously studied.

The B[a]P dosages chosen for this work were informed by two previous studies carried out on the interaction between the

B[a]P and the gut microbiota allowing us to make comparisons and discussions (van de Wiele et al., 2005; Ribi re et al., 2016). These doses are higher than the typical daily consumption of B[a]P; however, B[a]P exposure is chronic throughout a person's life. The experiment included two clearly distinct FM structures which might reflect the large individual gut microbiota variations found in the human population. Thus similar responses of the two FM toward the B[a]P exposure could not be attributed to a restricted microbial composition.

Surprisingly, B[a]P did not induce a significant change in the microbial structure, although slight modifications were observed at the family level, such as increases in the *Sutterellaceae* (formerly *Alcaligenaceae*), *Tissierellaceae* and *Ruminococcaceae* families and reductions in the *Rikenellaceae* and *Lachnospiraceae* families. Our laboratory previously investigated the impact of 28 days of oral B[a]P exposure on the fecal and intestinal mucosa-associated bacteria in mice (Ribi re et al., 2016). Similar to the results of the present work, we showed that B[a]P did not have a significant impact on the bacterial richness (Shannon index) and diversity (chao1 index, observed_otus) during the course of exposure. However, we showed that B[a]P induced significant shifts in the composition and relative abundance of the stool and mucosa associated bacterial communities. These results differed from those presented here because significant variations in the bacterial structure were not observed, which might have been caused by various aspects of the experimental design. Murine models are widely used in gut microbiota studies; however, discrepancies between human and mice gut bacterial composition have been reported. Although *Bacteroidetes* and *Firmicutes* are the two major phyla dominating the human and mouse gut microbiota (Eckburg et al., 2005; Ley et al., 2005), 85% of the bacterial genera found in mouse gut microbiota are not present in humans (Ley et al., 2005). Finally, several environmental factors may shape the mice gut microbiota, specifically cage effects (including coprophagy), dietary factors (standardized chow diet composed mainly of plant materials), and genetic background (including inbreeding to preserve genetic homogeneity).

Similarly to our present work, Maurice et al. (2013) showed that a short period of exposure (4 h) with six host-targeting

drugs did not alter the microbial active community structure of the human gut microbiota. A prior work from Sawulski et al. (2014) demonstrated that in the soil environment, alterations in the bacterial community structure may be correlated to the pattern of degradation of a given PAH. B[a]P was degraded much more slowly than less complex PAHs and to a lower extent, which was reflected in slow changes of the bacterial community structure (no significant variations were observed after 2 days of exposure). Changes of the gut microbiota structure after xenobiotic exposure has previously been reported, and most studies in which xenobiotic exposure (antibiotics excluded) altered the mice microbial structure lasted at least several days and often weeks (Breton et al., 2013; Chassaing et al., 2015; Zhang Y. et al., 2015; Ribi re et al., 2016). Thus, to test such a chronic exposure, a 28-days experiment in continuous fermentor will be carried out in the laboratory.

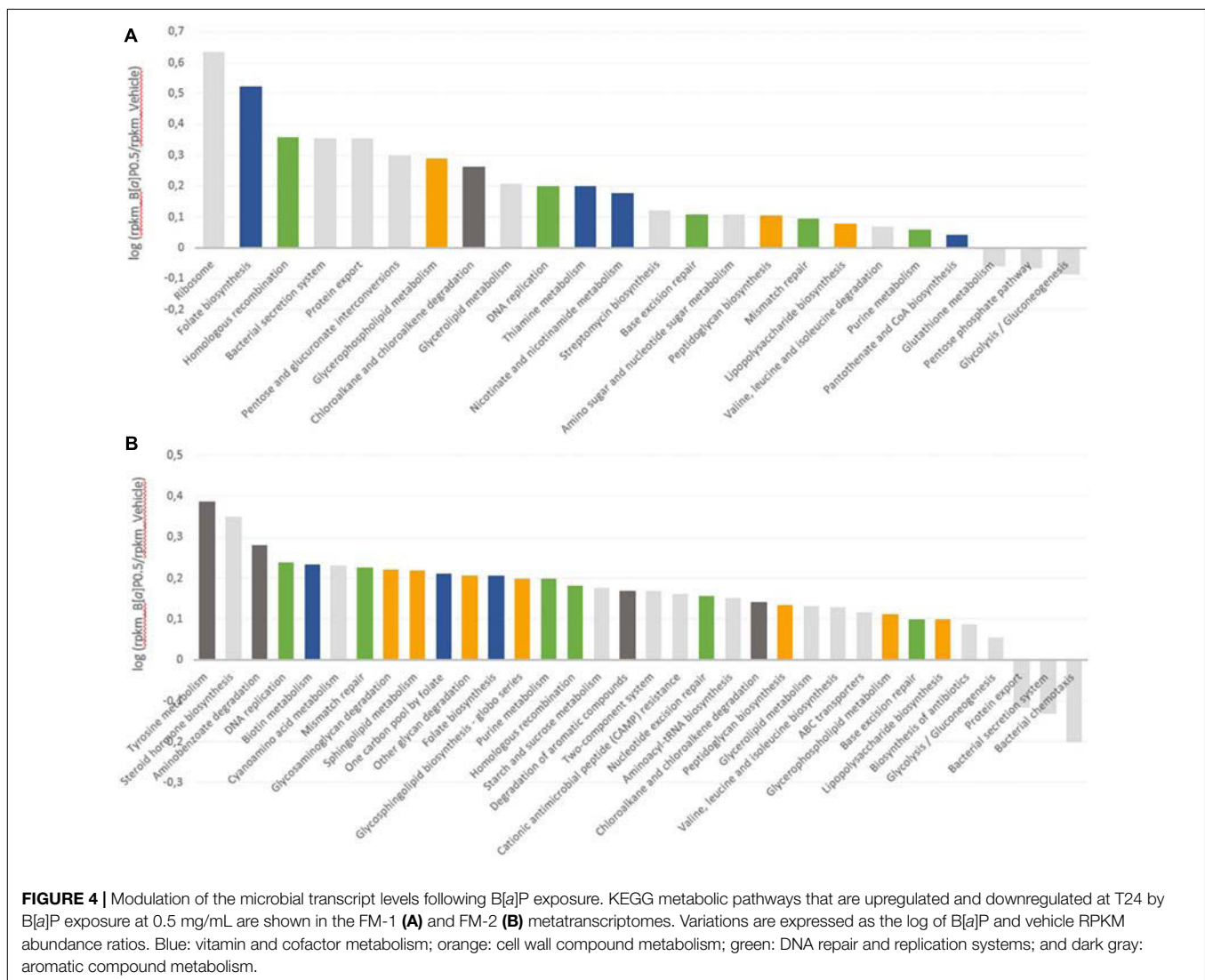
Although the two FM structures appeared to remain stable after a short exposure time, the bacterial activity may have adapted to the presence of the toxic compound. The volatolome profiling has been rapidly emerging in disease diagnosis (Arasaradnam et al., 2014), and changes in VOC patterns have been reported in many physiological and pathological states, including gut dysbiosis in gastrointestinal diseases. Seven VOCs were found to have significantly altered concentrations in both FMs tested under exposure to B[a]P (Table 1). There are no reported links between these compounds and known microbial metabolic processes. As end-products, these compounds may arise from diverse microbial metabolic pathways. Control samples with the pollutant but without gut microbiota were assessed in the SPME-GC-MS analysis. VOCs that are identified as shifting in the manuscript were either not found in control samples or were present in control samples but showed no abundance variation between vehicle and B[a]P samples. We did not look at the fungi community. However, using the SortmeRNA software (Kopylova et al., 2012) on the RNA-Seq data, we did not see any ribosomal eukaryote sequences. Thereby, excluding an abundance below the detection limit, VOCs seem to arise from prokaryote activity.

The depletion of volatolome esters like butyl butanoate has recently been reported in response to gastrointestinal metabolic disorders (De Preter et al., 2015). Accordingly, Ahmed et al.

TABLE 1 | Volatile metabolites detected in the volatolome of the two fecal microbiota as significantly altered by B[a]P exposure compared to control.

Volatile metabolite ¹	m/z	LRI ²	Peak abundance (x 10 ³)			
			Vehicle	BaP 0.005	BaP 0.05	BaP 0.5
Benzaldehyde	106	971	510.8	456.1	527.0	604.4*
3-octanone	99	986	64.0	33.9*	39.8*	46.9*
2-pentylfuran	138	992	43.6	32.1	24.8*	18.0*
Butyl butanoate	57	994	292.4	142.2*	149.7*	171.0*
Unknown	99	1032	7.3	3.1*	3.3*	3.4*
2-methyl-phenol	108	1049	9.6	8.1	10.1	13.6*
2-hexylfuran	81	1087	23.0	17.9	15.7	14.8*

¹Tentative identification based on mass spectrum and LRI from literature or internal databank. ²Linear retention indices on a DB5 capillary column. *Significance ($p < 0.05$) according to Dunnett's post hoc test (control: vehicle).



(2015) suggested that differences in levels of fecal esters may reveal changes in the fermentation process of the gut microbiota. Regarding changes in benzaldehyde, 2-methyl-phenol, 3-octanone, 2-pentylfuran, 2-hexylfuran, De Preter et al. (2013) reported that the depletion or augmentation of metabolites belonging to benzenoids, ketones and furan derivatives would probably be a consequence of the disruption of the normal bacterial ecology in pathologies like IBD. It could be hypothesized that these same compounds would also trigger a gut metabolic response to chemical agents such as B[a]P.

In the present study, B[a]P exposure alters the gut microbiota volatolome in a dose-dependent manner. Furthermore, although the bacterial composition of the two studied microbiota were clearly different, their metabolic responses were similar with seven markers significantly altered by B[a]P exposure in both microbiota. This shift in the volatolome shows that B[a]P induces a deviation in the microbial metabolism. At present, no systematic studies have been conducted on the identification of gut microbiota volatolome after xenobiotic

exposure. Nonetheless, Berge et al. (2011) noted a shift in the volatolome of liver cells of chickens exposed to various dietary chemical contaminants, including a mixture of three PAHs among which was B[a]P. Therefore, the present work may enlarge again the field of potential applications of volatolomics, which already includes cancer diagnosis (Hakim et al., 2012; Broza et al., 2015), food authentication (Engel et al., 2007; Sivadier et al., 2008), and ecotoxicology (Ratel and Engel, 2009; Berge et al., 2011).

Finally, to further characterize the influence of B[a]P on the active gut microbiota, we analyzed gene expression using RNA sequencing. Transcripts related to four KEGG metabolic pathways were found to be upregulated in both fecal metatranscriptomes. These pathways include vitamin and cofactor metabolism, cell wall compound metabolism, DNA repair and replication systems, and aromatic compound metabolism.

Some of these results may be linked to previous data from the literature as for the lipophilic and mutagenic properties of

the B[a]P. As lipophilic compounds, PAHs have been shown to penetrate into the cytoplasmic membrane, which results in an increase in membrane fluidity that leads to the loss of membrane functionality and bacterial cell damage (Sikkema et al., 1994). One of the major adaptive mechanisms of bacteria cells to counteract this effect is to increase membrane rigidity (enhance membrane lipid saturation) to prevent compound accumulation (Murínová and Dercová, 2014). This bacterial physiological adaptation may explain the increase observed in the level of transcripts implicated in the metabolism of cell wall compounds. The mutagenic effect of B[a]P is also known to occur via DNA adducts (Baird et al., 2005). DeMarini et al. (2011) characterized the mutagenic potencies and mutation spectra of B[a]P in *Salmonella* strains TA98, TA100, and TA104. The results from this study showed that (i) 24% of the mutations induced by B[a]P in *Salmonella* led to complex frameshifts, (ii) B[a]P produced primarily GC to TA transversions and (iii) the majority (96%) of stable adducts induced were at a guanine site. Similarly, the mutagenic potencies of the B[a]P might explain the observed induction of the DNA repair and replication systems. Furthermore, within the vitamin and cofactor metabolism pathway, the transcript levels related to folate biosynthesis, which is a major cofactor in DNA synthesis (Harvey and Dev, 1975; Sangurdekar et al., 2011), increased in both metatranscriptomes.

In the FM-2 metatranscriptome, transcripts related to the steroid hormone biosynthesis pathway were also upregulated, which is consistent with prior work from van de Wiele et al. (2005). They implemented a batch fermentation system and showed the ability of the human gut microbiota to metabolize several PAHs, including B[a]P, to metabolites with estrogenic activity. Indeed, several hydroxylated-PAH metabolites are structurally similar to the steroidal hormones that bind the human estrogen receptor (ER) (Fertuck et al., 2001; Hirose et al., 2001; Sievers et al., 2013). These authors confirmed the PAH biotransformation by the identification of the metabolites 1-hydroxypyrene and 7-hydroxybenzo[a]pyrene in colon digests of pyrene and B[a]P, respectively. Finally, few pathways were downregulated, such as the glycolysis-gluconeogenesis and the bacterial chemotaxis toward simple carbohydrates. This reduction in energy metabolism may be part of the cell adaptation process. Stressful environmental conditions, such as B[a]P exposure, may lead the cells to rapidly perform coping mechanisms. Microorganisms may thus engage energy for adaptation mechanisms to ensure necessary physiological functions prior to devoting resources to energy consumption for growth and multiplication (Murínová and Dercová, 2014). The ability of gut microbial strains to bind B[a]P via physical adsorption to peptidoglycans has also been reported (Hongfei et al., 2013). Thus, another hypothesis is that steric hindrance caused by B[a]P adsorption limits the bacterial ability to sense carbohydrates in its environment.

REFERENCES

Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., Schubert, A. M., Izard, J., Cantarel, B. L., et al. (2012). Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to

CONCLUSION

For the first time, a model of acute B[a]P exposure in the human gut microbiota was initiated. Although significant impacts were not observed on the gut microbiota structure, the microbial activity was altered both at the metatranscriptome and at the volatolome levels that could contribute to disturb human gut homeostasis. Humans are exposed to B[a]P as well as to mixtures of PAHs and other environmental and foodborne chemicals. Thus, our results suggested that further works should consider pollutants that could contribute to the development of microbial functional dysbiosis, which will potentially impair the human host homeostasis.

ACCESSION CODES

All sequence data produced via 16S rRNA/rDNA amplicon and RNA sequencing are available in the NCBI Sequence Read Archive, BioProject PRJNA339203, under accession no. SRP082261.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD, PP, EP, and EE conceived the study and design the experiments. CD and JR performed experimental procedures. CD, JR, EE, and PP analyzed data. SD provided support for batch fermentations and RB for metatranscriptomic experiments. BB helped with treatments of sequencing data analysis. CD, PP, EP, and EE interpreted data and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript. All authors agree to be accountable for all aspects of the work.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Frederic Mercier for providing technical assistance in the SPME-GC-MS analysis and Nicolas Parisot for 16S amplicons QIIME treatment. CD received a graduate grant from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” of France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01562/full#supplementary-material>

the human microbiome. *PLoS Comput. Biol.* 8:e1002358. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002358

Ahmed, I., Fayyaz, F., Nasir, M., Niaz, Z., and Furnari, M. (2015). Extending landscape of volatile metabolites as novel diagnostic biomarkers of

- inflammatory bowel disease – a review. *Scand. J. Gastroenterol.* 51, 385–392. doi: 10.3109/00365521.2015.1105286
- Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B., Ratcliffe, N., and Probert, C. S. (2016). Investigation of faecal volatile organic metabolites as novel diagnostic biomarkers in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 43, 596–611. doi: 10.1111/apt.13522
- Ahmed, I., Greenwood, R., Costello, B. D. L., Ratcliffe, N. M., and Probert, C. S. (2013). An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome. *PLoS ONE* 8:e58204. doi: 10.1371/journal.pone.0058204
- Allais, L., Kerckhof, F., Verschuere, S., Bracke, K. R., Smet, R., De Laukens, D., et al. (2015). Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environ. Microbiol.* 18, 1352–1363. doi: 10.1111/1462-2920.12934
- Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., and Engstrand, L. (2008). Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 3:e2836. doi: 10.1371/journal.pone.0002836
- Antharam, V. C., Li, E. C., Ishmael, A., Sharma, A., Mai, V., Rand, K. H., et al. (2013). Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2884–2892. doi: 10.1128/JCM.00845-13
- Arasaradnam, R. P., Covington, J. A., Harmston, C., and Nwokolo, C. U. (2014). Review article: next generation diagnostic modalities in gastroenterology - Gas phase volatile compound biomarker detection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39, 780–789. doi: 10.1111/apt.12657
- Aronesty, E. (2013). Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinform. J.* 7, 1–8. doi: 10.2174/1875036201307010001
- Ba, Q., Li, J., Huang, C., Qiu, H., Li, J., Chu, R., et al. (2015). Effects of Benzo[a]pyrene exposure on human hepatocellular carcinoma cell angiogenesis, metastasis, and NF- κ B signaling. *Environ. Health Perspect.* 123, 246–254. doi: 10.1289/ehp.1408524
- Baird, W., Hooven, L., and Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114. doi: 10.1002/em.20095
- Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., et al. (2011). Use of volatile compound metabolic signatures in poultry liver to back-trace dietary exposure to rapidly metabolized xenobiotics. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6584–6591. doi: 10.1021/es200747h
- Bouhrel, J., Ratel, J., Abouelkaram, S., Mercier, F., Travel, A., Baéza, E., et al. (2017). Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. *J. Chromatogr. A* 1497, 9–18. doi: 10.1016/j.chroma.2017.03.008
- Breton, J., Massart, S., Vandamme, P., De Brandt, E., Pot, B., and Folligné, B. (2013). Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 14:62. doi: 10.1186/2050-6511-14-62
- Broza, Y. Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., Amann, A., and Haick, H. (2015). Hybrid Volatolomics and Disease Detection. *Angew. Chem.* 54, 11036–11048. doi: 10.1002/anie.201500153
- Buchfink, B., Xie, C., and Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* 12, 59–60. doi: 10.1038/nmeth.3176
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., et al. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96. doi: 10.1038/nature14232
- Chen, Z., Guo, L., Zhang, Y., Walzem, R. L., Pendergast, J. S., Printz, R. L., et al. (2014). Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. *J. Clin. Invest.* 124, 3391–3406. doi: 10.1172/JCI72517
- De Preter, V., Joossens, M., Ballet, V., Shkedy, Z., and Rutgeerts, P. (2013). Metabolic profiling of the impact of oligofructose-enriched inulin in Crohn's disease patients: a double-blinded randomized controlled trial. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 4, e30. doi: 10.1038/ctg.2012.24
- De Preter, V., Machiels, K., Joossens, M., Arijs, I., Matthys, C., Vermeire, S., et al. (2015). Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut* 64, 447–458. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306423
- DeMarini, D. M., Hanley, N. M., Warren, S. H., Adams, L. D., and King, L. C. (2011). Association between mutation spectra and stable and unstable DNA adduct profiles in *Salmonella* for benzo[a]pyrene and dibenzo[a,h]pyrene. *Mutat. Res.* 714, 17–25. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.06.003
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G. P. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274, 430–432. doi: 10.1126/science.274.5286.430
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05
- Douben, P. E. T. (2003). *PAHs: an Ecotoxicological Perspective*. Chichester: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/0470867132
- Duan, X., Shen, G., Yang, H., Tian, J., Wei, F., and Gong, J. (2016). Dietary intake polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and associated cancer risk in a cohort of Chinese urban adults: inter- and intra- individual variability. *Chemosphere* 144, 2469–2475. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.019
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Engel, E., Ferlay, A., Cornu, A., Chilliard, Y., Agabriel, C., Bielicki, G., et al. (2007). Relevance of isotopic and molecular biomarkers for the authentication of milk according to production zone and type of feeding of the cow. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9099–9108. doi: 10.1021/jf0714620
- Feria-Gervasio, D., Tottey, W., Gaci, N., Alric, M., Cardot, J.-M., Peyret, P., et al. (2014). Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobia to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *J. Microbiol. Methods* 96, 111–118. doi: 10.1016/j.mimet.2013.11.015
- Fertuck, K. C., Kumar, S., Sikka, H. C., Matthews, J. B., and Zacharewski, T. R. (2001). Interaction of PAH-related compounds with the alpha and beta isoforms of the estrogen receptor. *Toxicol. Lett.* 121, 167–177. doi: 10.1016/S0378-4274(01)00344-7
- Guo, J., Xu, Y., Ji, W., Song, L., Dai, C., and Zhan, L. (2015). Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling. *Toxicol. Lett.* 234, 201–210. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.02.016
- Hakim, M., Broza, Y. Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., et al. (2012). Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chem. Rev.* 112, 5949–5966. doi: 10.1021/cr300174a
- Harvey, R. J., and Dev, I. K. (1975). Regulation in the folate pathway of *Escherichia coli*. *Adv. Enzyme Regul.* 13, 99–124. doi: 10.1016/0065-2571(75)90010-2
- Hirose, T., Morito, K., Kizu, R., Toriba, A., Hayakawa, K., Ogawa, S., et al. (2001). Estrogenic / antiestrogenic activities of benzo[a]pyrene monohydroxy derivatives. *J. Health Sci.* 47, 552–558. doi: 10.1248/jhs.47.552
- Hodek, P., Koblíhová, J., Kizek, R., Frei, E., Arlt, V. M., and Stiborová, M. (2013). The relationship between DNA adduct formation by benzo[a]pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 989–996. doi: 10.1016/j.etap.2013.09.004
- Hongfei, Z., Fang, Z., Ye Qiong, Q., Dziugan, P., Fengling, B., Walczak, P., et al. (2013). Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to bind Benzo(a)pyrene and the mechanism of the process. *Food Chem. Toxicol.* 59, 67–71. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.040
- Hudson, A. C., Myers, J. N., Niaz, M. S., Washington, M. K., and Ramesh, A. (2013). Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced colon polyps in ApcMin mice by resveratrol. *J. Nutr. Biochem.* 24, 713–724. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.04.005
- Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J., and Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.* 17, 377–386. doi: 10.1101/gr.5969107

- Huson, D. H., Mitra, S., Ruscheweyh, H., Weber, N., and Schuster, S. C. (2011). Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res.* 21, 1552–1560. doi: 10.1101/gr.120618.111
- IARC (2012). A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 100F, 111–144.
- Kopylova, E., Noe, L., and Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217. doi: 10.1093/bioinformatics/bts611
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., and Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel diseases: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146, 1489–1499. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.009
- Kroese, E. D., Muller, J. J. A., Mohn, G. R., Dortant, P. M., and Wester, P. W. (2001). *Tumorigenic Effects in Wistar rats Orally Administered Benzo[a]Pyrene for Two Years (Gavage Studies). Implications for Human Cancer Risks Associated with Oral Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Report no. 658603 010. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment.
- Labib, S., Guo, C. H., Williams, A., Yauk, C. L., White, P. A., and Halappanavar, S. (2013). Toxicogenomic outcomes predictive of forestomach carcinogenesis following exposure to benzo(a)pyrene: relevance to human cancer risk. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273, 269–280. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.027
- Lee, J., Kim, S., Moon, J., Kim, S., Kang, D., and Yoon, H. (2016). Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. *Food Chem.* 199, 632–638. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.017
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., and Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35:e120. doi: 10.1093/nar/gkm541
- Martorell, I., Nieto, A., Nadal, M., Perelló, G., Marcé, R. M., and Domingo, J. L. (2012). Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using data from a duplicate diet study in Catalonia, Spain. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4103–4108. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.011
- Maurice, C. F., Haiser, H. J., and Turnbaugh, P. J. (2013). Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* 152, 39–50. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.052
- Möller, W., Häußinger, K., Winkler-Heil, R., Stahlhofen, W., Meyer, T., Hofmann, W., et al. (2004). Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects. *J. Appl. Physiol.* 97, 2200–2206. doi: 10.1152/japplphysiol.00970.2003
- Mu, C., Yang, Y., and Zhu, W. (2016). Gut microbiota: the brain peacekeeper. *Front. Microbiol.* 7:345. doi: 10.3389/fmicb.2016.00345
- Mumford, J. L., Lee, X., Lewtas, J., Young, T. L., and Santella, R. M. (1993). DNA adducts as biomarkers for assessing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in tissues from Xuan Wei women with high exposure to coal combustion emissions and high lung cancer mortality. *Environ. Health Perspect.* 99, 83–87. doi: 10.1289/ehp.939983
- Murinová, S., and Dercová, K. (2014). Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.* 2014:873081. doi: 10.1155/2014/873081
- Mutlu, E. A., Engen, P. A., Soberanes, S., Urich, D., Forsyth, C. B., Nigdeliöglu, R., et al. (2011). Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice. *Part. Fibre Toxicol.* 8:19. doi: 10.1186/1743-8977-8-19
- Ratel, J., and Engel, E. (2009). Determination of benzenic and halogenated volatile organic compounds in animal-derived food products by one-dimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 7889–7898. doi: 10.1016/j.chroma.2009.09.012
- Ribiére, C., Peyret, P., Parisot, N., Darcha, C., and Déchelotte, P. J. (2016). Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci. Rep.* 6:31027. doi: 10.1038/srep31027
- Sangurdekar, D. P., Zhang, Z., and Khodursky, A. B. (2011). The association of DNA damage response and nucleotide level modulation with the antibacterial mechanism of the anti-folate drug Trimethoprim. *BMC Genomics* 12:583. doi: 10.1186/1471-2164-12-583
- Sawulski, P., Clipson, N., and Doyle, E. (2014). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation* 25, 835–847. doi: 10.1007/s10532-014-9703-4
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026
- Sievers, C. K., Shanle, E. K., Bradfield, C. A., and Xu, W. (2013). Differential action of monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons with estrogen receptors alpha and beta. *Toxicol. Sci.* 132, 359–367. doi: 10.1093/toxsci/kfs287
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022–8028.
- Sinha, R., Kulldorff, M., Gunter, M. J., Strickland, P., and Rothman, N. (2005). Dietary benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 2030–2035. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0854
- Sivadier, G., Ratel, J., Bouvier, F., and Engel, E. (2008). Authentication of meat products: determination of animal feeding by parallel GC-MS analysis of three adipose tissues. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9803–9812. doi: 10.1021/jf801276b
- Su, Y., Zhao, B., Guo, F., Bin, Z., Yang, Y., Liu, S., et al. (2014). Annals of epidemiology interaction of benzo[a]pyrene with other risk factors in hepatocellular carcinoma: a case-control study in Xiamen, China. *Ann. Epidemiol.* 24, 98–103. doi: 10.1016/j.annepidem.2013.10.019
- Teng, F., Klinger, C. N., Felix, K. M., Tran, N. L., Umetsaki, Y., Wu, H. J., et al. (2016). Gut microbiota drive autoimmune arthritis by promoting differentiation and migration of Peyer's Patch T Follicular helper cells. *Immunity* 44, 875–888. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.013
- Tian, M., Zhao, B., Zhang, J., Martin, F. L., Huang, Q., Liu, L., et al. (2016). Science of the total environment association of environmental benzo[a]pyrene exposure and DNA methylation alterations in hepatocellular carcinoma: a Chinese case – control study. *Sci. Total Environ.* 541, 1243–1252. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.003
- Ueng, T., Chang, Y., Tsai, Y., Su, J., Chan, P., Shih, J., et al. (2010). Potential roles of fibroblast growth factor-9 in the benzo(a)pyrene-induced invasion in vitro and the metastasis of human lung adenocarcinoma. *Arch. Toxicol.* 84, 651–660. doi: 10.1007/s00204-010-0547-3
- van de Wiele, T., Vanhaecke, L., Boeckaert, C., Peru, K., Headley, J., Verstraete, W., et al. (2005). Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environ. Health Perspect.* 113, 6–10. doi: 10.1289/ehp.7259
- van Herwaarden, A. E., van Waterschoot, R. A. B., and Schinkel, A. H. (2009). How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 223–227. doi: 10.1016/j.tips.2009.02.003
- Vatanen, T., Kostic, A. D., Hennezel, E., Cullen, T. W., Knip, M., Xavier, R. J., et al. (2016). Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans article. *Cell* 165, 1–12. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.056
- Verhofstad, N., Pennings, J. L. A., van Oostrom, C. T., van Benthem, J., van Schooten, F. J., van Steeg, H., et al. (2010). Benzo(a)pyrene induces similar gene expression changes in testis of DNA repair proficient and deficient mice. *BMC Genomics* 11:333. doi: 10.1186/1471-2164-11-333
- Veyrand, B., Sirot, V., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Dervilly-pinel, G., et al. (2013). Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: results of the second French total diet study. *Environ. Int.* 54, 11–17. doi: 10.1016/j.envint.2012.12.011
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., et al. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking toll-like receptor 5. *Science* 328, 228–231. doi: 10.1126/science.1179721
- White, A. J., Bradshaw, P. T., Herring, A. H., Teitelbaum, S. L., Beyea, J., Stellman, S. D., et al. (2016). Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environ. Int.* 8, 185–192. doi: 10.1016/j.envint.2016.02.009

- Yu, K., and Zhang, T. (2012). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge. *PLoS ONE* 7:e38183. doi: 10.1371/journal.pone.0038183
- Zhang, L., Nichols, R. G., Correll, J., Murray, I. A., Tanaka, N., Smith, P. B., et al. (2015). Persistent organic pollutants modify gut microbiota – host metabolic homeostasis in mice through aryl hydrocarbon receptor activation. *Environ. Health Perspect.* 123, 679–688. doi: 10.1289/ehp.1409055
- Zhang, Y., Zhao, F., Deng, Y., Zhao, Y., and Ren, H. (2015). Metagenomic and metabolomic analysis of the toxic effects of trichloroacetamide-induced gut microbiome and urine metabolome perturbations in mice. *J. Proteome Res.* 14, 1752–1761. doi: 10.1021/pr5011263

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Defois, Ratel, Denis, Batut, Beugnot, Peyretilade, Engel and Peyret. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

**ENVIRONMENTAL POLLUTANT BENZO[A]PYRENE
IMPACTS THE VOLATILE METABOLOME AND
TRANSCRIPTOME OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA**

Clémence Defois¹, Jérémy Ratel², Sylvain Denis¹, Bérénice Batut¹, Réjane Beugnot¹, Eric Peyretailade¹, Erwan Engel² and Pierre Peyret^{1*}

* Corresponding author: Pierre Peyret

Tel: +33 (0)473178308; E-mail: pierre.peyret@udamail.fr

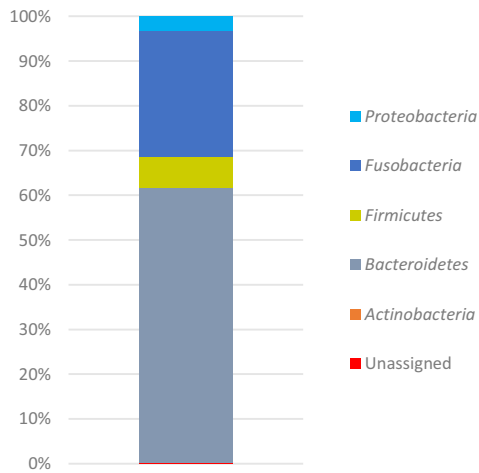
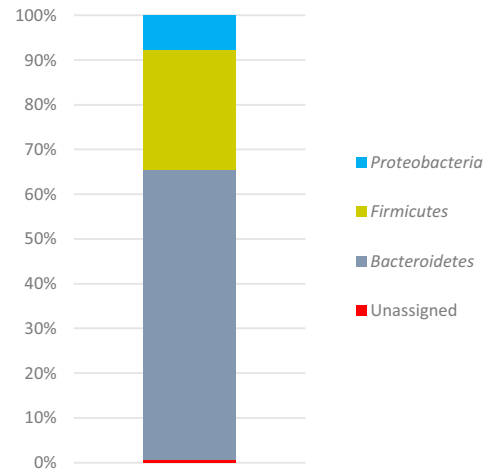
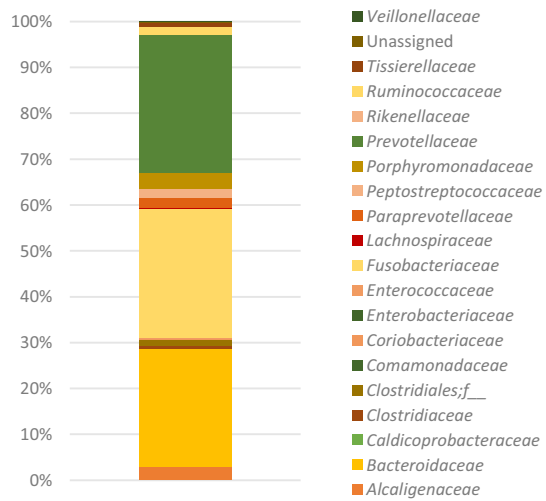
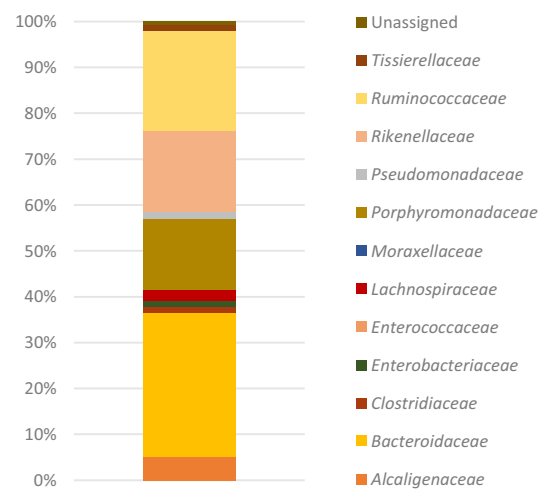
PREPARATION FOR :	1 L	UNIT	VITAMIN SOLUTION	mg.L ⁻¹
Tween 80	1	g	Menadione	1
Demineralized water	990	mL	D-biotin	2
<i>Reach 50°C with microwave heating</i>				
<i>Incorporate with a Turrax homogenizer:</i>				
Potato starch	4	g	Panthothenate	10
Corn starch	1	g	Nicotinamide	5
Cellulose	2	g	Vitamine B ₁₂	0.5
Pectin	2	g	Thiamin	4
Xylan	1	g	Para-aminobenzoic acid	5
Arabinogalactan	2	g		
Arabic gum	0.67	g		
Guar	0.33	g		
Inulin	1	g		
Primatone	5	g		
Bacto tryptone	5	g		
Bacto Peptone	3	g		
Yeast extract	4	g		
Mucin type II	4	g		
Soy lecithin	375	mg		
Egg yolk	125	mg		
Bile salts	200	mg		
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	19.4	g		
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	5.8	g		
NaCl	4.5	g		
KCl	4.5	g		
MgSO ₄ 7H ₂ O	200	mg		
FeSO ₄ 7H ₂ O solution (2.5 g.L ⁻¹)	2	mL		
Hemin solution (5 g.L ⁻¹)	1	mL		
L-cystein-HCl	500	mg		
Resazurin solution (1 g.L ⁻¹)	1	mL		
<i>Ajust pH at 6.2</i>				
CaCl ₂ 2H ₂ O	100	mg		

Supplementary Table S1. Media composition and preparation for batch fermentation. After homogenizing all of the media components, the media were flushed with nitrogen *via* shaking (500 rpm) and heating (75 °C) on a Labotech EM3300T. Under nitrogen flow, 22 mL of media was aliquoted into 50-mL vials and autoclaved at 115 °C for 15 min. Before the incubation period (T₀), 1 µL of a vitamin solution was added to each 50-mL vial along with the FM suspension sampled from the continuous fermentor ECSIM (7.5 mL) and either the B[a]P-sunflower seed oil solution (0.5 mL) or the sunflower seed oil alone (0.5 mL). The final fermentation volume was 30 mL.

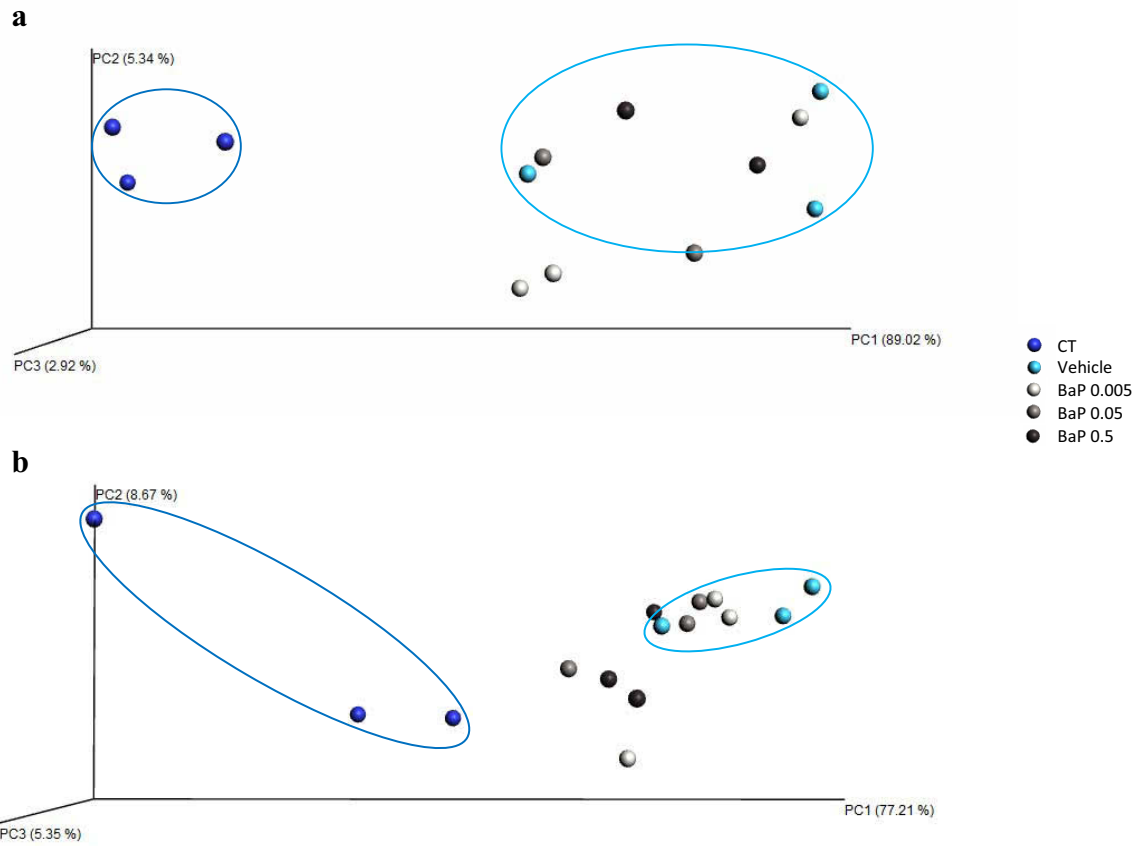
		FM-1			FM-1		
		T0			T24		
		Shannon	chao1	observed_otus	Shannon	chao1	observed_otus
a	BaP 0.005				4.25 ± 0.04	645.3 ± 70.3	349.7 ± 12.5
	BaP 0.05				4.28 ± 0.09	744.2 ± 147.0	373.3 ± 17.9
	BaP 0.5	3.57 ± 0.34	411.3 ± 104.9	250.1 ± 64.9	4.35 ± 0.16	670.0 ± 72.0	357.3 ± 32.4
	CT				4.06 ± 0.05	596.4 ± 18.2	341.3 ± 11.8
	Vehicle				4.27 ± 0.18	667.2 ± 105.8	354.3 ± 34.9
b	BaP 0.005				3.37 ± 0.04	315.9 ± 76.4	163.7 ± 10.7
	BaP 0.05				3.47 ± 0.10	311.8 ± 38.3	182.5 ± 0.7
	BaP 0.5	3.07 ± 0.18	247.1 ± 64.5	151.3 ± 28.4	3.51 ± 0.19	289.8 ± 11.7	157.0 ± 1.4
	CT				2.83 ± 0.09	269.4 ± 10.2	147.3 ± 5.8
	Vehicle				3.54 ± 0.15	325.5 ± 40.9	190.0 ± 23.0

		FM-2			FM-2		
		T0			T24		
		Shannon	chao1	observed_otus	Shannon	chao1	observed_otus
a	BaP 0.005				3.60 ± 0.03	514.8 ± 107.5	285.3 ± 24.8
	BaP 0.05				3.65 ± 0.09	511.3 ± 64.2	300.0 ± 26.6
	BaP 0.5	3.57 ± 0.04	566.4 ± 77.7	291.9 ± 21.5	3.65 ± 0.10	499.4 ± 47.4	299.3 ± 21.9
	CT				3.36 ± 0.16	447.5 ± 23.6	241.7 ± 13.7
	Vehicle				3.72 ± 0.06	516.6 ± 54.9	309.3 ± 9.3
b	BaP 0.005				3.20 ± 0.08	514.4 ± 16.2	293.3 ± 14.2
	BaP 0.05				3.30 ± 0.02	594.7 ± 90.9	307.7 ± 3.9
	BaP 0.5	3.71 ± 0.12	574.6 ± 99.2	323.6 ± 50.7	3.34 ± 0.13	591.4 ± 44.4	310.3 ± 40.5
	CT				3.31 ± 0.34	485.4 ± 217.4	279.0 ± 111.4
	Vehicle				3.01 ± 0.19	486.4 ± 46.4	263.7 ± 28.0

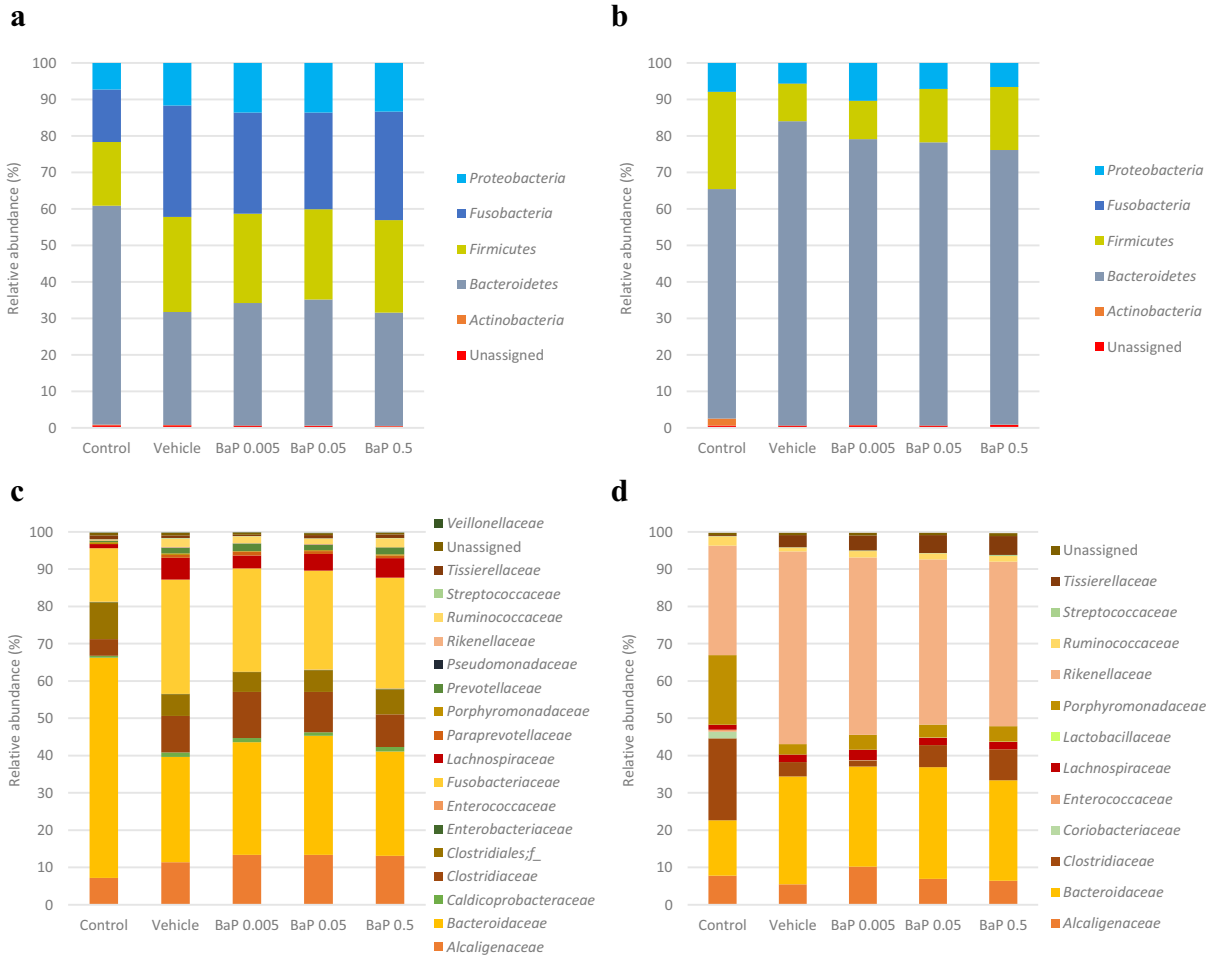
Supplementary Table S2. Diversity and richness values for the fecal microbiota samples at T0 and T24 for each condition studied. Diversity (Shannon) and richness (chao1, observed_otus) values were derived from 16S rDNA (a) or 16S rRNA (b) amplicon sequencing. At T24 for each condition, the results are listed as the mean ± SD of the relative abundances of the three biological replicates. Because all of the conditions started from the same FM suspension, the results at T0 are listed as the mean ± SD of the relative abundances of the fifteen biological replicates (5 conditions and three replicates). The operational taxonomic units (OTUs) were defined with 97% sequence identity. Calculations were performed based on rarefied OTU tables with 16,595 and 10,716 sequences for the FM-1 samples (for the rDNA and rRNA amplicons respectively) and 30,495 and 24,538 sequences for the FM-2 samples (for the rDNA and rRNA amplicons respectively).

a**b****c****d**

Supplementary Figure S1. Initial structure of the active microbial community. Relative abundances (%) at the phylum (a-b) and family (c-d) levels of FM-1 (a-c) and FM-2 (b-d) at T0. Analysis based on 16S rRNA amplicon sequencing.



Supplementary Figure S2. Fecal bacterial patterns following B[a]P exposure. FM-1 (**a**) and FM-2 (**b**) structures after 24 hr of B[a]P exposure; the values are differentiated by a principal coordinate analysis (PCoA) on a weighted UniFrac distance matrix. Analysis based on 16S rRNA amplicon sequencing. The p -values from ADONIS were 0.013 ($R^2=0.769$) and 0.007 ($R^2=0.666$) for FM-1 and FM-2 respectively.



Supplementary Figure S3. Structure of the active microbial community following B[a]P exposure. Relative abundances (%) at the phylum (**a-b**) and family (**c-d**) levels of both FM-1 (**a-c**) and FM-2 (**b-d**) at T24. Analysis based on 16S rRNA amplicon sequencing. A Mann-Whitney *U*-test showed no significant differences.

1.4. Conclusion et perspectives

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition au B[a]P n'a pas eu d'impact significatif sur la structure de deux microbiotes fécaux humains. De précédents travaux réalisés au sein du laboratoire, ont montré en modèle murin, qu'une exposition chronique au B[a]P pendant 28 jours ne modifiait pas la richesse ni la diversité microbienne (Rivière et al., 2016). Cependant, une altération modérée de l'abondance relative de certains taxa a pu être mise en évidence. D'autres travaux, ayant rapporté une dysbiose du microbiote fécal murin, présentaient une plus longue durée d'exposition aux xénobiotiques (antibiotiques exclus), souvent de plusieurs jours voire plusieurs semaines (Breton et al., 2013; Chassaing et al., 2015; Zhang et al., 2015e). Il serait ainsi intéressant de mener une exposition chronique en système continu afin de déterminer si le B[a]P peut induire, sur un plus long terme, une dysbiose du microbiote intestinal pouvant conduire ultérieurement à de potentiels effets pathologiques chez l'hôte. Cette hypothèse est notamment soutenue par les travaux de Sawulski *et al.* (2014), qui démontrent que dans les sols, une altération de la structure de la communauté bactérienne peut être corrélée au profil de dégradation d'un HAP donné en fonction du temps. Le B[a]P (5 cycles aromatiques) étant dégradé plus difficilement que d'autres HAPs moins complexes, les changements induits dans la structure microbienne de la communauté sont plus longs à se mettre en place. L'exposition au B[a]P a induit un changement significatif de la structure de la communauté microbienne du sol à partir du 20^{ème} jour d'exposition avec une diminution de la concentration initiale en B[a]P de près de 20% (Sawulski et al., 2014). Ainsi, des expériences avec une durée de fermentation plus longue pourraient permettre de mettre en évidence et d'identifier des métabolites issus de la dégradation du B[a]P.

Bien que la structure des deux microbiotes fécaux soit restée stable après l'exposition, le B[a]P a induit une perturbation des fonctions microbiennes. En effet, une modification du profil du volatolome microbien a été observée suggérant une altération des activités métaboliques microbiennes pouvant être néfaste pour l'hôte (De Preter et al., 2015) (De Preter et al., 2013). De plus, les variations observées dans certaines voies métaboliques telles que le métabolisme des composés pariétaux et les systèmes de réparation et de réplication de l'ADN, mettant en évidence les propriétés lipophiles et mutagènes du B[a]P, suggèrent la mise en place de mécanismes adaptatifs et de protection des microorganismes vis-à-vis de la toxicité du polluant. De plus, la répression des voies métaboliques impliquées dans le métabolisme

des glucides suggère également la mise en place de processus d'adaptation cellulaire en réponse à une situation de stress. Les microorganismes vont préférentiellement engager de l'énergie aux fonctions physiologiques associées aux mécanismes adaptatifs avant de consacrer des ressources à la croissance et la multiplication (Murínová and Dercová, 2014). L'analyse métatranscriptomique ayant été réalisée à la plus forte dose de B[a]P, il serait intéressant de voir si des doses plus faibles seraient capables d'induire la mise en place des mêmes réponses de protection microbienne.

Ces travaux ont été conduits sur la communauté bactérienne du microbiote fécal. Cependant, dans d'autres environnements comme les sols, les champignons démontrent des capacités métaboliques importantes dans la dégradation de polluants environnementaux comme le B[a]P (Godoy et al., 2016; Morelli et al., 2013). Le suivi des microorganismes fongiques du microbiote fécal pourrait ainsi être mené dans de prochaines études d'exposition aux polluants environnementaux.

Enfin, les systèmes *in vitro*, présentent de nombreux avantages en termes de coût, de mise en place et d'utilisation, qui rendent leur utilisation pertinente pour des études de crible. Cependant, une validation des travaux en modèle animal reste importante, notamment car ces modèles prennent en compte la physiologie de l'hôte incluant les systèmes immunitaires et neurologiques ainsi que le métabolisme des xénobiotiques par l'hôte. Des études en modèle murin ont notamment montré que l'induction d'une perturbation du microbiote intestinal par des xénobiotiques était dépendante du récepteur aux hydrocarbures arylés (AhR) (Korecka et al., 2016; Zhang et al., 2015b). Dans ce contexte, la poursuite des travaux initiés précédemment au laboratoire serait une bonne perspective de travail. L'étude d'une exposition au B[a]P à plus long terme (2-3 mois) sur des souris conventionnelles et axéniques permettrait de mettre en évidence à la fois l'impact de la chronicité et le rôle du microbiote intestinal dans la toxicité médiée par le polluant sur l'hôte.

2. Impact de polluants chimiques alimentaires sur l'activité du microbiote intestinal humain et potentielles perturbations de l'homéostasie intestinale

2.1. Introduction à la publication n°2

L'Homme est exposé aux polluants environnementaux issus de l'industrie, des transports, ou encore de l'agriculture. Les polluants organiques persistants (POPs) sont des composés chimiques prioritaires en termes de santé publique du fait (i) de leur toxicité pour les organismes, (ii) de leur persistance dans l'environnement, et (iii) de leur capacité à se déplacer sur de longues distances et à s'accumuler dans les organismes (Ahlgren, 2014; Jones and de Voogt, 1999; UNEP, 2009).

Un lien entre l'exposition à ces polluants et certaines pathologies métaboliques (Labaronne et al., 2017; Ruiz et al., 2016), immunitaires (Kinoshita et al., 2006; Lamin et al., 2017), reproductives (Yang et al., 2017) mais également certains cancers (Rehman et al., 2017; Sévère et al., 2015; Shen et al., 2017; Wei et al., 2016) a pu être mis en évidence.

Les composés chimiques alimentaires, comprennent également les polluants néoformés par la transformation des aliments. La cuisson à haute température de la viande et du poisson, génère notamment des amines hétérocycliques (AHs), dont la structure chimique et la toxicité sont proches des POPs.

De récents travaux ont montré que l'interaction xénobiotique-microbiote conduisait à des modifications de la structure et des fonctions du microbiote intestinal, pouvant ultérieurement altérer l'homéostasie de l'hôte (Defois et al., 2017; Jin et al., 2017; Lefever et al., 2016; Roca-Saavedra et al., 2017; Stedtfeld et al., 2017; Zhang et al., 2015b). En retour, le microbiote intestinal a démontré la capacité à métaboliser les xénobiotiques, détournant ainsi leurs propriétés thérapeutiques (molécules pharmacologiques) ou toxiques (composés chimiques alimentaires) pour l'hôte (Claus et al., 2016; Fekry et al., 2016; Spanogiannopoulos et al., 2016; Tralau et al., 2014; Wilson and Nicholson, 2016; Zhang et al., 2017).

L'objectif de cette seconde étude a été de caractériser l'impact d'un panel de six contaminants chimiques alimentaires sur les fonctions du microbiote intestinal humain. Les contaminants inclus dans l'étude sont représentatifs des principales familles retrouvées dans l'alimentation : les dioxines, les retardateurs de flammes bromés (RFBs), les pesticides (pyréthrinoïdes), les amines hétérocycliques (AHs) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). L'exposition a été réalisée à partir d'un microbiote fécal humain, en

système batch pendant une période de 24h. Les fonctions microbiennes ont été appréhendées par des approches de métatranscriptomique et de volatolomique. Enfin, les propriétés inflammatoires des métabolites issus de l'interaction polluant-microbiote ont été évaluées sur une lignée cellulaire intestinale tumorale.

2.2. Principaux résultats obtenus

Après une exposition de 24h de différentes classes de polluants chimiques alimentaires sur le microbiote fécal humain, une altération de l'activité microbienne a été observée dans le niveau d'expression des gènes ainsi que dans le profil du volatolome microbien. Des composés volatils marqueurs de l'exposition aux polluants ont pu être identifiés. Globalement, après exposition aux polluants, une augmentation des composés soufrés, couplée à une déplétion des esters, des cétones, des composés aromatiques et des hydrocarbures a été observée suite à l'étude du profil volatolomique. Bien que l'information sur l'activité biologique des composés volatils microbiens soit encore limitée, certaines études ont établi un lien entre des modifications du volatolome fécal humain et certaines pathologies digestives (Boots et al., 2015; De Preter et al., 2015). La déplétion du volatolome en cétones, en esters et en composés aromatiques comme les furanes a récemment été reportée chez des patients atteints de la maladie de Crohn ou encore de la colite ulcéraire (De Preter et al., 2015).

Au niveau de l'expression des gènes, une augmentation de l'abondance relative des transcrits impliqués dans le métabolisme des lipides, la membrane plasmique, l'espace périplasmique, l'activité protéine kinase et l'activité de liaison aux récepteurs a été mise en évidence suite à l'exposition aux polluants chimiques. A l'inverse, une diminution de l'abondance relative des transcrits en lien avec la traduction et la liaison aux acides nucléiques a été observée. Plusieurs gènes codant pour des rubrédoxines ont été identifiés comme surexprimés par trois familles de polluants : les AHs, les RFBs et les HAPs. Les rubrédoxines, ont été notamment décrites comme impliquées dans la voie de dégradation des alcanes incluse dans le métabolisme des hydrocarbures (Shanklin and Whittle, 2003; van Beilen et al., 2002).

La réponse de l'hôte au niveau de l'environnement digestif a été appréhendée par l'exposition de cellules épithéliales intestinales TC7 au surnageant issu du milieu de fermentation. La viabilité cellulaire et la production de cytokines de l'inflammation ont été

évaluées après l'exposition. Les métabolites issus de l'interaction polluant-microbiote ont, pour la majorité des polluants, stimulé la production d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales pouvant potentiellement conduire à l'établissement d'un état pro-inflammatoire de bas niveau dans l'environnement digestif. Cependant, aucun effet apoptotique ou nécrotique n'a été observé.

Enfin, pour mettre en évidence le rôle potentiel du microbiote dans la toxicité médiée par le polluant, nous avons également exposé les cellules épithéliales intestinales avec du surnageant de milieu de culture stérile supplémenté par chaque polluant à leur concentration expérimentale initiale. En absence de microbiote intestinal, une légère diminution de la viabilité cellulaire a été observée pour trois polluants (PhIP, B[a]P et HAPs) suggérant un potentiel rôle protecteur du microbiote vis-à-vis de la toxicité des polluants sur l'hôte.

2.3. Article n°2 : “ Persistent Organic Pollutants and Foodborne Chemicals Induce Changes of the Human Gut Microbiota Activity with Potential Impact on the Gut Homeostasis ”

Article en préparation

1 **PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS AND FOODBORNE CHEMICALS**
2 **INDUCE CHANGES OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA ACTIVITY WITH**
3 **POTENTIAL IMPACT ON THE GUT HOMEOSTASIS**

4
5 Clémence Defois¹, Jérémy Ratel², Ghislain Garrat¹, Sylvain Denis¹, Olivier LeGoff¹, Jérémie
6 Talvas^{3,4}, Pascale Mosoni¹, Erwan Engel², Pierre Peyret^{1*}

7
8 ¹MEDIS, Université Clermont Auvergne, INRA, Clermont-Ferrand, France

9 ²UR370 QuaPA, MASS Group, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France

10 ³UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, Equipe ECREIN, CLARA, Université Clermont
11 Auvergne, Clermont-Ferrand, France

12 ⁴UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, INRA, Clermont-Ferrand,
13 France

14
15 **Running Title:** POPs impact human gut microbiota functions
16

17 * **Corresponding author:** Pierre Peyret
18 Tel: +33 (0)473178308; E-mail: pierre.peyret@uca.fr

19
20 **Keywords:** human gut microbiota, persistent organic pollutants, volatolomics,
21 metatranscriptomics, TC7 cells
22

23 **Word count length (main body of the text, footnotes, citations):** 5500

24 **Figure number:** 6 Figures, 0 Table
25

26 **ABSTRACT**

27 Exposure to environmental pollutants has been associated with various health
28 disorders, including dysregulation of the immune and reproductive systems, metabolic
29 diseases and cancer. Growing evidences indicate that the gut microbiota, which plays major
30 roles in host metabolic and immune functions, interacts with xenobiotics including persistent

31 organic pollutants (POPs) and foodborne chemicals. The toxicological relevance of the gut
32 microbiota-pollutant interplay is of great concern for the host since the chemicals may disrupt
33 the gut microbiota functions leading to a potential impairment of the host homeostasis. The
34 impact of a panel of POP and foodborne chemical families on the human gut microbiota was
35 investigated at the metatranscriptome and the volatolome levels. Metabolites from the
36 supernatant, resulting from this interaction, were added to intestinal epithelial TC7 cells to
37 decipher a potential inflammatory host cell response. We identified microbial volatiles and
38 gene families that shifted after chemical exposure leading to an imbalance of the microbial
39 activity. Overall, in the volatolome, sulfur compounds were increased following the pollutant
40 exposure while esters, ketones, aromatic compounds and hydrocarbons were decreased. At the
41 gene level, an increase in the transcript levels related to lipid metabolism process, plasma
42 membrane, periplasmic space, protein kinase activity and receptor activity was observed
43 following pollutant exposure. Conversely, the transcript levels related to ribosome, translation
44 and nucleic acid binding were depleted. We finally demonstrated that gut microbiota-pollutant
45 interplay may potentially lead to the establishment of a pro-inflammatory state in the gut with
46 a release of IL-8 cytokine by the intestinal epithelial cells.

47

48 **INTRODUCTION**

49 People are daily exposed to a myriad of environmental pollutants arising from
50 industries, transports, heating or agriculture. Persistent organic pollutants (POPs) such as
51 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorobiphenyls (PCBs), brominated flame
52 retardants (BFRs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and pesticides are compounds
53 that cause concern because of their toxicity, persistence in the environment, their capacity to
54 move over very long distances and ability to accumulate in organisms (Ahlgren, 2014; Jones
55 and de Voogt, 1999; UNEP, 2009).

56 Exposure to these pollutants has been linked with various pathologies including
57 metabolic (Labaronne et al., 2017; Ruiz et al., 2016), immune (Kinoshita et al., 2006; Liamin
58 et al., 2017) and reproductive disturbances (Yang et al., 2017), and even cancers (Rehman et
59 al., 2017; Sévère et al., 2015; Shen et al., 2017; Wei et al., 2016). Heterocyclic amines
60 (HCAs) are foodborne chemicals produced by some cooking practices close to POPs in terms
61 of structure and toxic properties. HCAs are mutagenic and characterized as possible human
62 carcinogens (WHO and IARC, 1993), increasing the risk of the emergence of the colorectal
63 cancer (Bouvard et al., 2015; Rohrmann et al., 2009).

64 Because exposure to POPs and foodborne chemicals occurred mainly through the diet,
65 the host gastrointestinal tract and the gut microbiota are likely to be exposed to these
66 compounds. Recent works have shown that the xenobiotic-microbiota interactions may lead to
67 modifications of the gut microbiota composition and functions, which could then impact the
68 host homeostasis (Jin et al., 2017; Roca-Saavedra et al., 2017). Zhang and colleagues have
69 shown in a murine model that five days of orally administered 2,3,7,8-
70 tetrachlorodibenzofuran (TCDF) lead to deep modification of the structure of the mice gut
71 microbiota by reducing the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes accompanied by an activation
72 of the microbial fermentation (elevation of short chain fatty acids in feces and cecal content
73 extracts) (Zhang et al., 2015). Conversely, a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)
74 chronic exposure (26 weeks) induced in the mice gut microbiota a major increase in the
75 Firmicutes to Bacteroidetes ratio, while the same exposure on a short time scale (2 days) did
76 not appear to have any significant effects (Lefever et al., 2016). To complement these
77 observations, a recent study observed, within 8 days of TCDD exposure, the increase of 13
78 antimicrobial resistance genes and 1 mobile genetic element gene in the murine gut
79 microbiome (Stedtfeld et al., 2017). Finally, acute exposures to a mixture of PCBs or to
80 benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), induced, respectively, either a substantial decrease in the level of

81 Proteobacteria in the mice gut microbiota or showed no significant impact on the human gut
82 microbiota but induce a shift in the microbial metabolic activity (Choi et al., 2013; Defois et
83 al., 2017).

84 The gut microbiota may, in return, metabolize the chemical compounds, which might
85 deflect its therapeutic (drugs) or toxic (environmental and foodborne chemicals) properties
86 toward the host (Claus et al., 2016; Spanogiannopoulos et al., 2016; Tralau et al., 2014;
87 Wilson and Nicholson, 2016). A previous work reported that six commonly used host-
88 targeted drugs, induced some 328 microbial genes, most of which could be associated with
89 drug transport or degradation (Maurice et al., 2013). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT),
90 an organochlorine insecticide, has been found to be metabolized in dichlorodiphenyl-
91 dichlorophenylethane (DDD) by the rat and human fecal microbiota, though it remains
92 unclear whether this biotransformation corresponds to bioactivation or detoxification, as both
93 DDT and DDD are probable endocrine disruptors in humans (Mendel and Walton, 1966; Yim
94 et al., 2008). Finally, the human gut microbiota has been shown to biotransform the B[a]P and
95 the 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), into the 7-
96 hydroxybenzo[a]pyrene and the 7-hydroxy-5-methyl-3-phenyl-6,7,8,9-
97 tetrahydropyrido[3',2':4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidin-5-ium chloride (PhIP-M1) identified as
98 the B[a]P and PhIP derivatives, respectively (Fekry et al., 2016; Van de Wiele et al., 2005;
99 Vanhaecke et al., 2006).

100 In the present work we characterized the impact of six POPs and/or foodborne
101 chemicals, most frequently found in diet and considered as models from various classes of
102 pollutants, on the human gut microbiota functions at the metatranscriptome and volatolome
103 level. We also measured the inflammatory properties of the metabolites arising from this
104 xenobiotic-gut microbiota interaction to characterize their effects on the gut homeostasis.

105

106 MATERIALS AND METHODS

107 *Chemicals*

108 Deltamethrin (pyrethroid insecticide), α -hexabromocyclododecane (α -HBCD) and γ -
109 hexabromocyclododecane (γ -HBCD) (BFRs), B[a]P (PAH), PAH Mix 3, methanol and
110 dichloromethane were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).
111 TCDD (PCDD) and PhIP (HCA) were purchased from LGC Standards (Molsheim, France).
112 To avoid solubility issues in batches, all pollutants were dissolved in methanol (vehicle 1)
113 except PAH Mix 3 which was purchased already dissolved in a methanol:dichloromethane
114 (1:1) (v/v) solution (vehicle 2). The HBCD solution was an equal mixture of the α and γ
115 isomers. The composition of the PAH Mix 3 solution is detailed in Supplementary Table 1.
116 Chemicals and all contaminated effluents and materials were handle in an advised and safe
117 manner with all necessary precautions.

118 *Experimental design*

119 The pollutants were incubated in batches along with a fecal microbiota suspension
120 sampled from the continuous fermentor Mini Bioreactor Applikon® (Applikon, The
121 Netherlands) following seven days of microbial settlement. The fecal microbiota suspension
122 contained *in vitro* cultured feces collected from a human volunteer donor. This study was a
123 non-interventional study with no additions to usual clinical care. According to the French
124 Health Public Law (CSP Art L 1121-1.1), such a protocol does not require approval of an
125 ethics committee.

126 The pollutant concentrations in batches were 0.005, 0.90, 2.60, 5, 21 and 38 $\mu\text{g/mL}$ for
127 TCDD, PhIP, HBCD, B[a]P, deltamethrin, and PAHs, respectively. The vehicle 1 and vehicle
128 2 were added at 0.5% (v/v) in batches. The concentration of methanol might be kept below
129 1% (v/v) in medium to avoid potential microbial growth inhibition (Caldwell, 1989; Patterson

130 and Ricke, 2015; Wadhvani et al., 2008). To remove the impact of the vehicles on the fecal
131 microbiota, batches with the vehicles 1 and 2 (vehicle 1 condition and vehicle 2 condition) at
132 0.5% (v/v) and batches without pollutant nor vehicle (control condition) were added in the
133 experimental design. Five replicates were carried out for all control and experimental
134 conditions. The incubation step was performed in a volume of 10 mL as previously described
135 (Defois et al., 2017).

136 At the beginning (T0) and the end (T24 hr) of the incubation step, samples dedicated
137 to RNA extractions were immediately centrifuged at 2000 x g for 8 min. The pellets were then
138 resuspended in 5 volumes of RNAlater® (Fisher Scientific, Illkirch, France) and maintained
139 at -80 °C until extraction. The remaining incubation medium was either directly maintained at
140 -20 °C for SPME-GC-MS analysis or centrifuged at 2000 x g for 10 min (referred as
141 fermentation-derived supernatants (FDS)). The five FDS replicates were pooled and
142 maintained at -20 °C until challenging on TC7 cells.

143 ***Microbial volatolome analysis***

144 The volatolome analysis was performed as previously described by Defois *et al.*,
145 (2017). Briefly, the volatile compounds in the samples were analyzed *via* solid-phase
146 microextraction (SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A
147 volatile compounds analysis was performed by GC-full scan MS (GC6890, MS5973N,
148 Agilent). The volatiles were tentatively identified according to a comparison between their
149 mass spectra and the NIST 14 mass spectral library and between published retention indices
150 (RI) values and the RI values of an internal databank. Peak areas of the volatile compounds
151 were determined with a home-made automatic algorithm developed under Matlab R2014b
152 (The MathWorks, Natick, USA) (Bouhleb et al., 2017). The data were processed using the
153 Statistica Software (v.10) (StatSoft, Maisons-Alfort, France) and the R software (v.2.1.4).
154 ANOVAs ($p < 0.05$) were conducted on each data set comparing exposed group with vehicle

155 group and principal component analyses (PCA) were performed on the discriminant volatile
156 compounds selected to visualize the structure of the data. Datasets were normalized using the
157 systematic ratio normalization (SRN) procedure developed by Lehallier et al. (2012) to
158 improve sample set discrimination. The procedure consists in calculating all the log-ratios
159 between variables for each sample, then selecting the log-ratio(s) that best maximize the
160 discrimination between sample-sets by one-way ANOVA at 1% level of significance
161 corrected by the Bonferroni post-test. 3D projection of microbial volatolome patterns were
162 realized according to the 3 best ratios of volatile compounds selected by linear discriminant
163 analysis.

164

165 ***RNA extraction, sequencing and analysis***

166 RNA extractions and rRNA depletion were performed as previously described (Defois
167 et al., 2017). The metatranscriptome analysis was performed on the pooled rRNA-depleted
168 RNA arising from the five technical replicates.

169 Library construction (following the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation,
170 Illumina) and paired-end sequencing (MiSeq, 2x250 bp) were performed at Fasteris (Plan-les-
171 Ouates, Switzerland). The paired-end sequences were assessed for quality with Trimmomatic
172 (Bolger et al., 2014) and PRINSEQ (Schmieder and Edwards, 2011), joined with fastq-join
173 from the ea-utils software package (Aronesty, 2013) and the remaining rRNA sequences were
174 removed from the data set using SortMeRNA (v. 2.0) software (Kopylova et al., 2012). The
175 UniRef50 gene family and the Gene Ontology (GO) slim terms relative abundances in copies
176 per million units (CPM) were obtained using the HMP Unified Metabolic Analysis Network2
177 (HUMAN2) software (v0.5) (Abubucker et al., 2012). Genes and GO slim terms derived
178 heatmaps were created using the Shinyheatmap software (Khomtchouk et al., 2017).

179 ***TC7 cell culture***

180 TC7 cells (clone of the parenteral Caco-2 epithelial cell line) was kindly provided by
181 Dr Adeline Sivignon (M2iSH, Clermont-Ferrand, France). The cell culture medium contained
182 Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (4.5 g/L) supplemented with 10% fetal
183 bovine serum, 1% of glutamine, 1% of non-essential amino acids (100X) and 1% of
184 penicillin-streptomycin (100X). The DMEM and the added components were purchased from
185 Gibco® (Fisher Scientific).

186 TC7 cells were maintained in 75 cm² flasks (Falcon™, Fisher Scientific) at 37°C, in a
187 humidified atmosphere of 5% CO₂. When TC7 cells reached 80% confluence, the medium
188 was removed from the dish and cells were washed twice with 10 mL of PBS solution (Gibco,
189 Fisher Scientific). The cells were then supplemented with trypsin-EDTA 0.25% (Gibco,
190 Fisher Scientific) and left in the incubator for 5 min. Trypsin action was arrested by addition
191 of 10 mL of complete medium and cell suspension was centrifuge 5 min at 900 g. After
192 removing supernatant, cell pellet was resuspended in complete medium and seeded directly
193 into 12-well plates Nunclon™ (Fisher Scientific) (2.10⁵ cells/well) and were maintained in
194 culture for 14 days before challenging to allow full cell differentiation (Zeller et al., 2015).
195 The medium was changed three times a week the first week and every other day until day 14.
196 TC7 cells were used between passages 30 and 41.

197 *Exposure of fermentation-derived supernatants on TC7 cells*

198 Cells were treated for 4 hr with the FDS from each pollutant, vehicle and control
199 conditions. Furthermore, TC7 cells were also exposed to fecal microbiota-free colon medium
200 supplemented with each pollutant at its initial experimental concentration (microbiota-free
201 condition). The supernatants were diluted 1:4 in DMEM as this dilution of the colon medium
202 showed no cytotoxic effect on TC7 cells (results not shown). Finally, cellular control
203 conditions (DMEM, dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% (Eurobio, Les Ulis, France) and
204 Interleukin (IL) 1 beta (IL-1β) (Sigma Aldrich) at 25 ng/mL) were added in the experimental

205 design and each condition was done with three replicates. DMSO and IL-1 β were used as
206 positive controls for the induction of toxicity (apoptosis and necrosis) and inflammation
207 (cytokine release) to TC7 cells, respectively (Bai et al., 2005; Da Violante et al., 2002; Meng
208 et al., 2017).

209 Following the 4 hr of exposure, the cellular supernatants were stored at -80 °C for
210 cytokine release measurements and the cell monolayers were harvested for apoptosis/necrosis
211 detection. Results are the mean of the three replicates and statistical analyses were conducted
212 using the Mann-Whitney *U*-test with GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA, USA). The
213 statistical significance was set at $p < 0.05$.

214 ***Apoptosis detection***

215 TC7 cell monolayers were washed twice with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
216 (Gibco, Fisher Scientific) and treated with trypsin-EDTA 0.25%. Cells were recovered with
217 cold Phosphate-Buffered Saline (Gibco, Fisher Scientific), centrifuged (500 g, 4 °C, 5 min)
218 and handled with the Annexin A5-FITC Kit (Beckman Coulter, Villepinte, France) following
219 the manufacturer's instructions. The assay combines Annexin A5 and Propidium Iodide
220 staining, distinguishing viable cells from apoptotic cells and necrotic cells, respectively. Cells
221 were then analyzed with a Cytomics FC 500 MPL flow cytometer.

222 ***TC7 cytokine quantification***

223 TC7 cells supernatants were centrifuged (1,000 g, 4 °C, 12 min) and the amount of IL-
224 8, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) and IL-10 released was determined using the Human
225 IL-8 / CXCL8 ELISA Kit, Human TNF-Alpha ELISA Kit and Human IL-10 ELISA Kit
226 (Sigma Aldrich), respectively. Cytokine concentrations were assessed according to the
227 manufacturer's instructions.

228

229 **RESULTS**

230 *Pollutant exposure alters the fecal microbiota volatolome pattern.*

231 The analysis of the microbial volatolome is a promising approach to detect an
232 imbalance of the microbial activity. Five pollutants (TCDD, deltamethrin, HBCD, B[a]P and
233 PhIP) and one mixture of pollutants (PAHs) were screened for their impact on the human
234 fecal microbiota functions following a 24 hr exposure. Volatolome patterns were assessed by
235 SPME-GC-MS analysis and vehicle (methanol (vehicle 1) and methanol:dichloromethane
236 mixture (vehicle 2)) conditions were conducted to remove the effects of the vehicles on the
237 microbial community.

238 More than 250 volatile organic compounds (VOCs) were detected by SPME-GC-MS
239 following the 24 hr of pollutant exposures. PCAs were performed on the discriminant VOCs
240 selected by ANOVA ($p < 0.05$). All pollutant conditions were clearly differentiated from their
241 respective vehicle samples with 19, 16, 20, 14, 18 and 53 VOCs identified as significantly
242 altered by the deltamethrin, TCDD, PhIP, HBCD, B[a]P and PAHs exposure, respectively
243 (Supplementary Figure 1). Deltamethrin, PhIP, TCDD, B[a]P and HBCD samples having the
244 same vehicle condition, it is of interest to determine if the exposure to these pollutants leads to
245 a specific or a shared response in terms of microbial volatolome signatures. 3D projections of
246 deltamethrin, PhIP, TCDD, B[a]P and HBCD volatolome patterns were realized according to
247 the three best discriminant ratios of VOCs (Figure 1). Relative to the vehicle 1 condition,
248 three different shifts were observed. The deltamethrin, PhIP and TCDD samples responded
249 similarly while the B[a]P and the HBCD samples showed other distinctive volatolome
250 patterns. The Supplementary Table 2 lists the VOCs detected in the microbial volatolome as
251 significantly altered by the exposure to the different pollutants. Sulfur (including thioesters)
252 and phenol compounds increased in exposed samples in deltamethrin, PhIP, TCDD, HBCD
253 and B[a]P conditions with 6, 4, 8, 3 and 4 (exclusively sulfur) compounds, respectively. In

254 contrary, only one sulfur compound (carbon disulfide) decreased for deltamethrin, PhIP and
255 TCDD. An overall decrease in ester compounds was observed in PhIP, TCDD, HBCD, B[a]P
256 and PAHs conditions with 4, 2, 2, 9 and 8 compounds respectively although some esters
257 increased in PhIP, HBCD and PAHs samples with 1, 1 and 8 compounds, respectively.
258 Finally, ketones, aromatic compounds and hydrocarbons decreased in all samples except 1
259 ketone for deltamethrin (1-octen-3-one) and 2 ketones (3-octanone and methylacetophenone)
260 and 3 aromatic compounds (indole, 2-(3-methylbutyl)-3,5-dimethylpyrazine and 3-
261 methylindole) for PAHs exposure which increased. It is interesting to note that carbon
262 disulfide and an unknown compound ($m/z = 73$, LRI = 1452) strongly decreased only for
263 deltamethrin, PhIP and TCDD whose microbiote response appears close. Finally each
264 pollutant shows specific compounds modulated during the microbiote response.

265

266 ***Pollutant exposure alters the fecal microbiota metatranscriptome.***

267 The volatolome analysis showed that chemicals shifted the microbial volatile pattern,
268 indicating changes in the microbial activity. Thus, using RNA-sequencing, we investigated
269 the microbial gene response to determine the potential altered genes expression and by
270 deduction metabolic pathways.

271 The functional assignation was realized at the GO and at the gene family levels, and
272 the results are given as CPM abundances. To avoid the effects of both vehicles on the fecal
273 microbiota, the pollutant samples were directly compared to the vehicle samples. Following
274 the 24 hr of exposure, variations observed at the GO level clustered the pollutant samples in
275 two main groups (Figure 2). The PAHs, the B[a]P and the deltamethrin samples showed
276 higher down regulation of GO slim terms combined to lower up regulated slim terms, whereas
277 the PhIP, the TCDD and the HBCD samples showed higher up regulation of GO slim terms

278 combined with lower down regulated slim terms. General trends largely shared by the six
279 pollutant samples (even if each pollutant shows specific response from the microbiota) are an
280 increase in the transcript levels related to lipid metabolism process, plasma membrane,
281 periplasmic space, protein kinase activity and receptor activity. Conversely, a depletion in the
282 transcript levels related to ribosome, translation and nucleic acid binding was observed
283 (Supplementary Figure 2).

284 At the gene family level the number and the mean abundance of the differentially
285 expressed (DE) genes (> 3 -fold change) differed between the pollutant samples (Figure 3).
286 The number of up regulated genes varies from 157 to 456 for the B[a]P and the PAHs
287 exposures, respectively. The number of down regulated genes varies from 174 to 245 for the
288 PhIP and the PAHs exposures, respectively (Figure 3.A). While the mean abundance per up
289 regulated gene is in a similar range for all samples (from 29 to 43 CPM for B[a]P and HBCD
290 samples, respectively), the mean abundance per down regulated gene is far higher for the
291 PAHs sample (from 7 to 63 CPM for deltamethrin and PAHs samples, respectively) (Figure
292 3.B). The high mean abundance of down regulated genes in the PAHs sample might explain
293 the substantial down regulation observed for some GO slim terms (Figure 2).

294 Among the DE genes, we identified three rubredoxin (Rdx) coding genes that were
295 found in the most up regulated genes in the PhIP and PAHs samples (27 to 437-fold change)
296 (Supplementary Table 3). The products of this gene family have been described as implicated
297 in the pathway of the alkane degradation, which is part of the hydrocarbon metabolism
298 (Shanklin and Whittle, 2003; van Beilen et al., 2002).

299 Some genes were found to be specifically induced by the pollutants (not expressed in
300 the vehicle samples) (Supplementary Table 4). PhIP/PAHs is the couple of samples that
301 shared the largest number of pollutant-specific genes (41 genes) highlighting common
302 microbial metabolic pathways activated by the exposure (Figure 4.A). Conversely, the PAHs

303 sample shared few pollutant-specific genes (7 to 11 genes) with the other chemicals (except
304 with PhIP). We identified 109 to 1 core pollutant-specific genes shared by 2 to 6 of the
305 chemicals, respectively (Figure 4.B and Supplementary Table 4). Among the pollutant-
306 specific genes, a Rdx coding gene (different from the three others previously described) was
307 the most highly induced gene by the HBCD (344 CPM). Finally, a specifically induced gene
308 by the PhIP and PAH pollutants encodes an uncharacterized protein harboring the Toluene_X
309 Outer Membrane Transport family domain (UniRef50_R5K1C5). Proteins of this family are
310 implicated in toluene catabolism and degradation of aromatic hydrocarbons. One gene found
311 specifically expressed by the 6 pollutants is an uncharacterized protein coding gene
312 (UniRef50_R7EHV5) (Supplementary Table 4).

313

314 ***Fermentation-derived supernatants did not induce TC7 cell death.***

315 The pollutant exposure modifies the microbial activity and thus modifies the
316 compounds produced in the FDS. The microbial community may also metabolize the
317 chemicals generating potentially less or more harmful compounds for the host. These
318 compounds may induce damages at the intestinal epithelium level potentially through the
319 release of inflammatory molecules.

320 We exposed TC7 cells to FDS for 4 hr. Cells were analyzed by cytometry to assess
321 their viability and cell culture supernatant was harvested to quantify pro (IL-8, TNF α) and
322 anti (IL-10) inflammatory cytokine release. No difference in the proportion of necrotic or
323 apoptotic cells was observed between the pollutant and the vehicle samples. Only the
324 exposure of DMSO 10%, as necrotic and apoptotic reagent, leads to a significant increase in
325 both the necrotic and the apoptotic cells with 25.7% and 7.9% of the total cells, respectively
326 (Supplementary Figure 3). FDS were also compared to fecal microbiota-free colon medium

327 supplemented with each pollutant at its initial experimental concentration. Slight but
328 significant modifications were seen for PhIP, B[a]P and PAHs samples (Figure 5). Without
329 the fecal microbiota, a slight increase in necrotic (and apoptotic for PAHs) cells was
330 observed. Necrotic cells increase from 0.72, 0.72 and 0.76% to 1.40, 1.31 and 1.49% for PhIP,
331 B[a]P and PAHs samples, respectively. Apoptotic cells for PAHs sample increase from 0.64
332 to 1.14%.

333 *Fermentation-derived supernatants alter IL-8 production in TC7 cells.*

334 IL-8, TNF α and IL-10 release was measured in TC7 cell supernatants to highlight a
335 potential pro or anti-inflammatory cell response.

336 The vehicle samples did not induce the release of IL-8 compare to the DMEM
337 condition (Figure 6). However the control condition induced a slight significant increase of
338 IL-8 compare to the vehicle 1 condition (62.1 to 101.5 ng/mL). Deltamethrin, HBCD and
339 PAHs samples induced a significant increase of IL-8 compare to their associated vehicle
340 sample. The strongest increase was observed for the PAHs sample with a 3.85-fold increase
341 (from 62.1 to 239 ng/mL). The PAHs and the IL-1 β (pro-inflammatory control) responses
342 were close, with 239 and 298 ng/mL of IL-8 release. Compared to the microbiota-free
343 conditions, significant variations were observed for deltamethrin and PAHs samples with, on
344 average, a 2-fold increase. Interestingly, PhIP and B[a]P samples induced less IL-8 release
345 compared to the microbiota-free condition but these variations were not significant.
346 Conversely to IL-8, TNF α and IL-10 cytokines were not detected in any of the culture cell
347 supernatants.

348

349 **DISCUSSION**

350 Food pollution by chemical is of great concern due to the toxicity of the compounds
351 accumulating in the food chain and because the exposure is chronic throughout people life.
352 While the toxicity toward the host has been evaluated for some representatives of the main
353 groups of contaminants, their impact on the gut microbiota has received less attention. We
354 investigated in this work, the impact of six pollutants on the human gut microbiota activity at
355 the volatolome and metatranscriptome level. The microbial and chemical compounds derived
356 from this microbial-pollutant interplay were then assessed on TC7 cell monolayers to
357 characterize their toxicity and inflammatory properties on the host.

358 The doses used in this work are lower or in the range of previous studies carried out on
359 the impact of the TCDD, PhIP and B[a]P on the gut microbiota allowing us to make
360 comparisons and discussions (Defois et al., 2017; Lefever et al., 2016; Stedtfeld et al., 2017;
361 Van de Wiele et al., 2005; Vanhaecke et al., 2006). Doses used for PAHs, HBCD and
362 deltamethrin exposures were far lower than doses used for toxicity studies in mice (Ben Slima
363 et al., 2017; Bernhard et al., 2016; Long et al., 2017; Szabo et al., 2017). The doses used in
364 this study are still higher than the expected daily consumption; however, the exposure to these
365 chemicals is chronic throughout a person's life.

366 Volatile organic compounds (VOCs) are small molecules produced by living
367 organisms, which play an important role in chemical ecology specifically in the biological
368 interactions between organisms (Schenkel et al., 2015). During the past decade, VOCs have
369 gained recognition in the health care field as they are presently used as a biomarker to detect
370 various human diseases including cancers (Agarwal et al., 2016; Arasaradnam et al., 2014). In
371 this work, we analyzed the volatolome pattern of the fecal microbiota following 24 hr of
372 pollutant exposure. Overall, a similar response to the presence of the pollutants was observed
373 with the microbial volatolome being enriched in sulfur compounds, and depleted in esters,
374 ketones, aromatic compounds and hydrocarbons (Supplementary Table 2). Interestingly,

375 similar alterations were identified in a previous work from the laboratory where two human
376 fecal microbiota were exposed to B[a]P at three gradual concentrations (Defois et al., 2017).
377 More precisely, in both studies, octanone, furan and ester compounds were depleted, while
378 phenolic compounds, arising from bacterial metabolism of aromatic amino acids, were
379 enhanced by the pollutants. Until now, studies on microbial VOCs are scarce in the literature
380 and there is still few available databases describing VOCs, their emitting organisms and their
381 biological activities (Abdullah et al., 2015; Lemfack et al., 2014). Despite limited information
382 on the VOC biological activities some links between microbial VOC patterns and many
383 physiological and pathological states have been reported including gastrointestinal metabolic
384 disorders (Boots et al., 2015; De Preter et al., 2015). The depletion of volatolome ketones,
385 esters and heterocyclic compounds like furans has recently been reported in patients with
386 inflamed gut (Crohn's disease, ulcerative colitis or pouchitis) (De Preter et al., 2015).
387 Moreover, Crohn's patient showed higher level of phenol as observed in our present results
388 with the TCDD and PhIP exposures. However, sulfur compounds, showed to be increased in
389 our study, were observed as depleted in Crohn patients. As alterations in microbial VOC
390 patterns are probably a consequence of the disruption of the normal bacterial ecology in
391 pathologies like IBD, it could be hypothesized that these same compounds would also be a
392 consequence of the disruption of the normal bacterial ecology triggered to chemical agents
393 such as environmental pollutants.

394 To go deeper in the characterization of the altered metabolic pathways we analyze the
395 gene expression using the RNA sequencing. Variations observed at the GO level were
396 pollutant dependent; however, general trends emerge from the analysis, with an increase in
397 the transcript levels related to lipid metabolism process, plasma membrane and periplasmic
398 space. A previous work from the laboratory also identified an increase in these metabolic
399 pathways after a 24 hr of B[a]P exposure (Defois et al., 2017), indicating a clear impact of

400 such hydrophobic compounds on the cell membranes. It has been proposed that lipophilic
401 compounds, crossing through membranes, increase the membrane fluidity that leads to the
402 loss of membrane functionality (Sikkema et al., 1994). One of the major adaptive mechanisms
403 of bacteria cells to counteract this effect is to increase their membrane rigidity (enhance
404 membrane lipid saturation) to prevent compound accumulation (Murínová and Dercová,
405 2014).

406 We also identified an increase in the transcript levels related to protein kinase activity
407 and receptor activity. Such variations have never been identified elsewhere following
408 environmental toxicant exposures. However the increase in the transcript levels of these two
409 GO slim terms might indicate an increase in cell signaling network and thus an activation or
410 repression of cellular responses due to the presence of the pollutants.

411 A decrease in transcript levels related to the GO slim terms ribosome, translation and
412 nucleic acid binding was observed. Recently in a previous work, we identified a reduction in
413 energy metabolism following B[a]P exposure and we proposed that the bacteria cells may
414 engage adaptive processes to manage stressful events. Microorganisms may thus engage
415 energy for adaptation mechanisms to ensure necessary physiological functions prior to
416 devoting resources to energy consumption for growth and multiplication (Murínová and
417 Dercová, 2014). Ribosome assembly and protein synthesis processes are major targets for a
418 large number of antibiotics (Hong et al., 2014; Wilson, 2009, 2014). This observation
419 potentially raises the hypothesis that POPs may act as antibiotics targeting the bacterial
420 translation apparatus. Interestingly, a >2-fold increase of 13 ARGs was observed in the
421 murine gut microbiome within 8 days of TCDD exposure (Stedtfeld et al., 2017). Among
422 these genes, some of them (multidrug resistant genes) were associated with resistance to
423 antibiotic targeting bacterial protein synthesis (aminoglycoside, glycylcycline, macrolide and
424 erythromycin).

425 Rubredoxin coding genes have been found highly over expressed in PhIP and PAHs
426 samples and found specific (absence from the vehicle condition) for the HBCD sample. Rdxs
427 are essential electron transfer components of bacterial membrane-bound alkane hydroxylases
428 found in aerobic n-alkane degradation pathways (Ji et al., 2013; Nie et al., 2014; van Beilen et
429 al., 2002). However, in anaerobic organisms, Rdxs have been identified as crucial for
430 oxidative stress responses (reduction of oxygen or reactive oxygen species) (Hagelueken et
431 al., 2007).

432 Interestingly, an uncharacterized protein coding gene, identified as specific of the PhIP
433 and PAHs samples, was carrying the Toluene_X Outer Membrane Transport family domain
434 (Kahng et al., 2000; Wang et al., 1995). This family includes in part, membrane proteins of
435 uncertain function that are involved in toluene catabolism and degradation of aromatic
436 hydrocarbons highlighting a potential metabolism of PhIP and PAHs compounds by the
437 human gut microbiota. Previous studies demonstrated that the gut microbiota was capable of
438 metabolizing these two chemical compounds and identified the 1-hydroxypyrene, 7-
439 hydroxybenzo[*a*]pyrene and PhIP-M1 as pyrene, benzo[*a*]pyrene and PhIP metabolites,
440 respectively (Fekry et al., 2016; Van de Wiele et al., 2005; Vanhaecke et al., 2006).

441 Gut microbial products play a major role in human health and disease (Lee and Hase,
442 2014). An imbalance of these compounds (mediated by an altered microbial activity) may,
443 first of all, directly or indirectly, impacts the gut environment. Furthermore, the microbial
444 metabolism of xenobiotics such as POPs has been demonstrated, leading to pollutant-derived
445 compounds whose toxicity remains unknown. We thus characterize the impact of a 4 hr
446 exposure of the FDS on the TC7 cell line. The induction of the necrotic and apoptotic
447 processes along with the release of inflammatory cytokines were measured.

448 The FDS did not induce specifically necrosis or apoptosis in TC7 cell line in these
449 experimental conditions. However, we observed that microbiota seems to limit the necrotic

450 effect of PhIP, B[a]P and PAHs. Thus, microbiota for some pollutants could play a protective
451 role for host against toxic compounds. At this stage, it is not possible to precisely identify the
452 protective mechanism and discriminate between a potential pollutant degradation or
453 sequestration. No necrotic or apoptotic effects have been observed for the other pollutants in
454 our experimental conditions. We cannot exclude toxicity effects for prolonged contact period
455 and/or on other cellular types. Concerning inflammatory response, FDS from deltamethrin,
456 HBCD and PAHs samples induced a significant increase of IL-8 release. In this situation,
457 pollutants could induce a functional dysbiosis limiting the production of anti-inflammatory
458 metabolites or increasing pro-inflammatory metabolites. In contrary, we also observed that
459 microbiota in contact to pollutants like PhIP and B[a]P could slightly reduce IL-8 release. In
460 this case, microbiota could also play a protective role against inflammatory induction by
461 chemical compounds but as previously, we cannot determine the involved mechanisms
462 (pollutant degradation and/or sequestration, anti-inflammatory metabolites production).
463 Previous *in vivo* studies showed the establishment of a pro-inflammatory intestinal
464 environment following B[a]P exposure (Ajayi et al., 2016; Ribière et al., 2016). B[a]P has
465 also been shown to potentiate murine intestinal inflammation caused by a high-fat diet (Khalil
466 et al., 2010). Chronic pollutant expositions may induce a progressive inflammatory
467 installation. To our knowledge, no data is available on inflammatory properties induced by
468 POPs on intestinal epithelial cells. However, aromatic chemicals have already been
469 characterized as triggering a pro-inflammatory response mediated by the aryl hydrocarbon
470 receptor (AhR) in different cell types (Henley et al., 2004; Pei et al., 2002; Tamaki et al.,
471 2004). The AhR is a cytosolic transcription factor activated by numerous environmental
472 hydrophobic chemicals leading to their metabolic clearance and detoxification. While the
473 AhR is often regarded as a xenobiotic receptor, it is becoming increasingly clear this receptor
474 exhibits activity influencing numerous endogenous functions, including immune function

475 (Schiering et al., 2017; Stockinger et al., 2014). As an example, Kobayashi and colleagues
476 have shown that environmental exposure to TCDD, through binding to AhR, exacerbates
477 rheumatoid arthritis pathophysiology *via* the stimulation of the NF- κ B and ERK signaling
478 pathways (Kobayashi et al., 2008). The rodent AhR homolog is known to bind TCDD and
479 PAHs with ~10-fold higher affinity than the human AhR (Ramadoss and Perdew, 2004).
480 These results highlight the functional disparities that may exist in rodent model systems
481 failing to accurately predict human AhR function in response to given ligands.

482 The intestinal epithelial cells are simultaneously exposed to, (i) gut microbiota-
483 generated metabolites, (ii) gut microbiota-generated metabolites issued from the presence of
484 the chemicals and (iii) the pollutant along with its potential degradation compound(s). This
485 result indicates that pollutant exposure risks, based primarily on human biotransformation
486 enzymes, may also take into account gut microbial processes leading to potential more or less
487 toxic compounds and/or microbial pro-inflammatory molecules. Depending of the pollutants,
488 intensity and contact frequency, microbiota could protect or contribute to the toxicity and
489 inflammation response of host cells. Each microbiota being unique its responses could also be
490 different face to contaminants and host susceptibility.

491 Finally, TNF α and IL-10 cytokines were not detected in any of the culture cell
492 supernatants. These two cytokines have already been detected in Caco-2 experiments,
493 however, immune cells (Hyun et al., 2015; Panja et al., 1995) and/or bacteria cells (Bahrami
494 et al., 2011; Jung et al., 1995; Parlesak et al., 2004) seem to be obligate partner to induce their
495 expression and release. Other experimental parameters such as cell differentiation and
496 incubation time must be taken into account as cytokine expression varies throughout these
497 parameters. As an example, general inflammatory response is higher in proliferating cells
498 compared to fully differentiated cells (Van De Walle et al., 2010; Zeller et al., 2015).

499

500 **CONCLUSION**

501 The present work highlights for the first time the impact of a panel of POPs and
502 foodborne chemical families on the human gut microbiota functions. Potential protective or
503 inflammatory effects of this gut microbiota-pollutant interaction on the host gut environment
504 have been shown. We identified microbial volatiles and metabolic pathways that shifted after
505 chemical exposure leading to an imbalance of the microbial activity. We finally showed that
506 this gut microbiota-pollutant interplay may potentially lead to the establishment of a pro-
507 inflammatory state in the gut. Therefore, chemical exposure risk assessment, based primarily
508 on human biotransformation enzymes, might be underestimated.

509 **Competing financial interests:** The authors declare that they have no actual or potential
510 competing financial interests.

511

512 **Acknowledgments:** CD received a graduate grant from the “Ministère de l’Enseignement
513 Supérieur et de la Recherche” of France.

514

515 **Accession codes:** All sequence data produced *via* RNA sequencing will be available in the
516 NCBI Sequence Read Archive. (*Ongoing*)

517

518 **Abbreviations:**

519 POP persistent organic pollutant

520 PAH polycyclic aromatic hydrocarbon

521 PCB polychlorobiphenyl

522 BFR brominated flame retardant

523 PCDD polychlorinated dibenzo-p-dioxin

524 HCA heterocyclic amine

525 TCDF 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran

526 TCDD 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

527 B[a]P benzo[*a*]pyrene

528 DTT dichlorodiphenyltrichloroethane

529 DDD dichlorodiphenyl-dichlorophenylethane

530 PhIP 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine

531 PhIP-M1 7-hydroxy-5-methyl-3-phenyl-6,7,8,9-tetrahydropyrido[3',2':4,5]imidazo[1,2-
532 a]pyrimidin-5-ium chloride

533 α -HBCD α -hexabromocyclododecane

534 γ -HBCD γ -hexabromocyclododecane

535 SPME-GC-MS solid phase micro extraction coupled to gas chromatography and mass
536 spectrometry

537 SRN systematic ratio normalization

538 FDS fermentation-derived supernatants

539 GO gene ontology

540 CPM copies per million units

541 HUMAnN2 HMP unified metabolic analysis network2

542 DMSO dimethyl sulfoxide

543 IL interleukin

544 TNF α tumor necrosis factor alpha

545 DE differentially expressed

546 Rdx rubredoxin

547 AhR aryl hydrocarbon receptor

548

549 REFERENCES

- 550 Abdullah, A. A., Altaf-Ul-Amin, M., Ono, N., Sato, T., Sugiura, T., Morita, A. H., et al. (2015).
551 Development and Mining of a Volatile Organic Compound Database. *Biomed Res. Int.* 2015,
552 139254.
- 553 Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., Schubert, A. M., Izard, J., Cantarel, B. L., et al. (2012). Metabolic
554 Reconstruction for Metagenomic Data and Its Application to the Human Microbiome. *PLoS*
555 *Comput. Biol.* 8, e1002358.
- 556 Agarwal, S. M., Sharma, M., and Fatima, S. (2016). VOCC: a database of volatile organic compounds
557 in cancer. *RSC Adv.* 6, 114783–114789.
- 558 Ahlgren, C. (2014). Future Challenges to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- 559 Ajayi, B. O., Adedara, I. A., and Farombi, E. O. (2016). Benzo(a)pyrene induces oxidative stress, pro-
560 inflammatory cytokines, expression of nuclear factor-kappa B and deregulation of wnt/beta-
561 catenin signaling in colons of BALB/c mice. *Food Chem. Toxicol.* 95, 42–51.
- 562 Arasaradnam, R. P., Covington, J. A., Harmston, C., and Nwokolo, C. U. (2014). Review article: Next
563 generation diagnostic modalities in gastroenterology - Gas phase volatile compound biomarker
564 detection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39, 780–789.
- 565 Aronesty, E. (2013). Comparison of Sequencing Utility Programs. *Open Bioinforma. J.* 7, 1–8.

- 566 Bahrami, B., Child, M. W., Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2011). Adherence and Cytokine
567 Induction in Caco-2 Cells by Bacterial Populations from a Three-Stage Continuous-Culture
568 Model of the Large Intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2934–2942.
- 569 Bai, B., Yamamoto, K., Sato, H., Sugiura, H., and Tanaka, T. (2005). Combined effect of 25-
570 hydroxycholesterol and IL-1 β on IL-8 production in human colon carcinoma cell line (Caco-2).
571 *Inflammation* 29, 141–146.
- 572 Ben Slima, A., Chtourou, Y., Barkallah, M., Fetoui, H., Boudawara, T., and Gdoura, R. (2017).
573 Endocrine disrupting potential and reproductive dysfunction in male mice exposed to
574 deltamethrin. *Hum. Exp. Toxicol.* 36, 218–226.
- 575 Bernhard, A., Berntssen, M. H. G., Lundebye, A.-K., Alvheim, A. R., Myrmel, L. S., Fjaere, E., et al.
576 (2016). Marine fatty acids aggravate hepatotoxicity of alpha-HBCD in juvenile female BALB/c
577 mice. *Food Chem. Toxicol.* 97, 411–423.
- 578 Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina
579 sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- 580 Boots, A. W., Bos, L. D., van der Schee, M. P., van Schooten, F. J., and Sterk, P. J. (2015). Exhaled
581 Molecular Fingerprinting in Diagnosis and Monitoring: Validating Volatile Promises. *Trends*
582 *Mol. Med.* 21, 633–644.
- 583 Bouhlef, J., Ratel, J., Abouelkaram, S., Mercier, F., Travel, A., Baéza, E., et al. (2017). Solid-phase
584 microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to
585 micropollutants. *J. Chromatogr. A* 1497, 9–18. doi:10.1016/j.chroma.2017.03.008.
- 586 Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. El, Benbrahim-tallaa, L., et al.
587 (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.* S1470-2045,
588 1–2. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1).
- 589 Caldwell, R. (1989). Effects of methanol on the growth of gastrointestinal anaerobes. *Can. J.*
590 *Microbiol.* 35, 313–317.
- 591 Choi, J. J., Eum, S. Y., Rampersaud, E., Daunert, S., Abreu, M. T., and Toborek, M. (2013). Exercise
592 Attenuates PCB-Induced Changes in the Mouse Gut Microbiome. 121, 725–730.
- 593 Claus, S. P., Guillou, H., and Ellero-Simatos, S. (2016). The gut microbiota : a major player in the
594 toxicity of environmental pollutants ? *Nat. Publ. Gr. Biofilms Microbiomes* 2, 16003. Available
595 at: <http://dx.doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.3>.
- 596 Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J. C., and Arnaud, P. (2002).
597 Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor
598 cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1600–1603.
- 599 De Preter, V., Machiels, K., Joossens, M., Arijs, I., Matthys, C., Vermeire, S., et al. (2015). Faecal
600 metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD.
601 *Gut* 64, 447–458.
- 602 Defois, C., Ratel, J., Denis, S., Batut, B., Beugnot, R., Peyretailade, E., et al. (2017). Environmental
603 Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human
604 Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* 8, 1562.
- 605 Fekry, M. I., Engels, C., Zhang, J., Schwab, C., Lacroix, C., Sturla, S. J., et al. (2016). The strict
606 anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine
607 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP). *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 201–
608 209.
- 609 Hagelueken, G., Wiehlmann, L., Adams, T. M., Kolmar, H., Heinz, D. W., Tummler, B., et al. (2007).
610 Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin–rubredoxin reductase of

- 611 *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 104, 12276–12281.
- 612 Henley, D. V, Bellone, C. J., Williams, D. A., Ruh, T. S., and Ruh, M. F. (2004). Aryl hydrocarbon
613 receptor-mediated posttranscriptional regulation of IL-1 b. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 42–51.
- 614 Hong, W., Zeng, J., and Xie, J. (2014). Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharm. Sin. B*
615 4, 258–265. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2014.06.012>.
- 616 Hyun, J., Romero, L., Riveron, R., Flores, C., Kanagavelu, S., Chung, K. D., et al. (2015). Immunity
617 Human Intestinal Epithelial Cells Express Interleukin-10 through Toll-Like Receptor 4-Mediated
618 Epithelial-Macrophage Crosstalk. *J. Innate Immun.* 7, 87–101.
- 619 Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., and Bartlam, M. (2013). Structural insights into diversity and n-alkane
620 biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Front. Microbiol.* 4, 1–13.
- 621 Jin, Y., Wu, S., Zeng, Z., and Fu, Z. (2017). Effects of environmental pollutants on gut microbiota.
622 *Environ. Pollut.* 222, 1–9.
- 623 Jones, K. C., and de Voogt, P. (1999). Persistent Organic Pollutants (POPs): State of the Science.
624 *Environ. Pollut.* 100, 209–221.
- 625 Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-wroblewska, E., et al. (1995). A
626 distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in
627 response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 95, 55–65.
- 628 Kahng, H., Byrne, A. M., Olsen, R. H., and Kukor, J. J. (2000). Characterization and Role of *tbuX* in
629 Utilization of Toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* 182, 1232–1242.
- 630 Khalil, A., Villard, P., Dao, M. A., Burcelin, R., Champion, S., Fouchier, F., et al. (2010). Polycyclic
631 aromatic hydrocarbons potentiate high-fat diet effects on intestinal inflammation. *Toxicol. Lett.*
632 196, 161–167.
- 633 Khomtchouk, B. B., Hennessy, J. R., and Wahlestedt, C. (2017). Shinyheatmap : Ultra fast low
634 memory heatmap web interface for big data genomics. *PLoS One* 12, e0176334.
- 635 Kinoshita, H., Abe, J., Akadegawa, K., Yurino, H., Uchida, T., Ikeda, S., et al. (2006). Breakdown of
636 Mucosal Immunity in Gut by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environ. Heal. Prev.*
637 *Med.* 11, 256–263.
- 638 Kobayashi, S., Okamoto, H., Iwamoto, T., Toyama, Y., Tomatsu, T., Yamanaka, H., et al. (2008). A
639 role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis.
640 *Rheumatology* 47, 1317–1322.
- 641 Kopylova, E., Noe, L., and Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal
642 RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217.
- 643 Labaronne, E., Pinteur, C., Vega, N., Pesenti, S., Julien, B., Meugnier-fouilloux, E., et al. (2017).
644 Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common
645 and specific features as compared to a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 45, 83–93.
- 646 Lee, W.-J., and Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease.
647 *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424.
- 648 Lefever, D. E., Xu, J., Chen, Y., Huang, G., Tamas, N., and Guo, T. L. (2016). TCDD modulation of
649 gut microbiome correlated with liver and immune toxicity in streptozotocin (STZ)-induced
650 hyperglycemic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 304, 48–58.
- 651 Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R., and Piechulla, B. (2014). MVOC: A database of
652 microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* 42, 744–748.
- 653 Liamin, M., Boutet-Robinet, E., Jamin, E. L., Fernier, M., Khoury, L., Kopp, B., et al. (2017).

- 654 Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated
655 T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*
- 656 Long, A. S., Lemieux, C. L., Gagné, R., Lambert, I. B., and White, P. A. (2017). Genetic Toxicity of
657 Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluating Dose-Additivity in a
658 Transgenic Mouse Model. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8138–8148.
- 659 Maurice, C. F., Haiser, H. J., and Turnbaugh, P. J. (2013). Xenobiotics shape the physiology and gene
660 expression of the active human gut microbiome. *Cell* 152, 39–50.
- 661 Mendel, J. L., and Walton, M. S. (1966). Conversion of p,p'-DDT to p,p'-DDD by Intestinal Flora of
662 the Rat. *Science (80-.)*. 151, 1527–1528.
- 663 Meng, Q., Cooney, M., Yepuri, N., and Cooney, R. N. (2017). L-arginine attenuates Interleukin-1 β
664 (IL-1 β) induced Nuclear Factor Kappa-Beta (NF- κ B) activation in Caco-2 cells. *PLoS One* 12,
665 e0174441.
- 666 Murínová, S., and Dercová, K. (2014). Response mechanisms of bacterial degraders to environmental
667 contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.*, 873081.
- 668 Nie, Y., Chi, C., Fang, H., Liang, J., Lu, S., Lai, G., et al. (2014). Diverse alkane hydroxylase genes in
669 microorganisms and environments. *Sci. Rep.* 4, 4968.
- 670 Panja, A., Siden, E., and Mayer, L. (1995). Synthesis and regulation of accessory/proinflammatory
671 cytokines by intestinal epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 100, 298–305.
- 672 Parlesak, A., Haller, D., Brinz, S., Baeuerlein, A., and Bode, C. (2004). Modulation of Cytokine
673 Release by Differentiated CACO-2 Cells in a Compartmentalized Coculture Model with
674 Mononuclear Leucocytes and Nonpathogenic Bacteria. *Scand. J. Immunol.* 60, 477–485.
- 675 Patterson, J. A., and Ricke, S. C. (2015). Effect of ethanol and methanol on growth of ruminal bacteria
676 *Selenomonas ruminantium* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Environ. Sci. Heal.* 50, 62–67.
- 677 Pei, X., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F., and Hara, N. (2002). Polycyclic aromatic
678 hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor κ B activation in A549 cell line.
679 *Cytokine* 19, 236–241.
- 680 Ramadoss, P., and Perdew, G. H. (2004). Use of 2-Azido-3-[125I]iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxin
681 as a Probe to Determine the Relative Ligand Affinity of Human versus Mouse Aryl Hydrocarbon
682 Receptor in Cultured Cells. *Mol. Pharmacol.* 66, 129–136.
- 683 Rehman, M. Y. A., Kamal, A., Taqi, M. M., and Malik, R. N. (2017). Tracing biomarker of PAH-
684 exposure and susceptibility factor (GSTM-polymorphism) among cancer patients in Pakistan.
685 *Chemosphere* 178, 384–390. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.017>.
- 686 Ribière, C., Peyret, P., Parisot, N., Darcha, C., and Déchelotte, P. J. (2016). Oral exposure to
687 environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut
688 microbial shifts in murine model. *Sci. Rep.* 6, 31027.
- 689 Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabril, V., Miranda, J. M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C.
690 M., et al. (2017). Food additives, contaminants and other minor components : effects on human
691 gut microbiota — a review. *J. Physiol. Biochem.*, 1–15.
- 692 Rohrmann, S., Hermann, S., and Linseisen, J. (2009). Heterocyclic aromatic amine intake increases
693 colorectal adenoma risk : findings from a prospective European cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*
694 89, 1418–1424.
- 695 Ruiz, P., Perlina, A., Mumtaz, M., and Fowler, B. A. (2016). A Systems Biology Approach Reveals
696 Converging Molecular Mechanisms that Link Different POPs to Common Metabolic Diseases.
697 *Environ. Health Perspect.* 124, 1034–1041.

- 698 Schenkel, D., Lemfack, M. C., Piechulla, B., and Splivallo, R. (2015). A meta-analysis approach for
699 assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. *Front. Plant*
700 *Sci.* 6, 707.
- 701 Schiering, C., Wincent, E., Metidji, A., Iseppon, A., Li, Y., Potocnik, A. J., et al. (2017). Feedback
702 control of AHR signalling regulates intestinal immunity. *Nature* 542, 242–245.
- 703 Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets.
704 *Bioinformatics* 27, 863–864.
- 705 Sévère, S., Marchand, P., Guiffard, I., Morio, F., Venisseau, A., Veyrand, B., et al. (2015). Pollutants
706 in pet dogs : a model for environmental links to breast cancer. *Springerplus* 4, 1–11.
- 707 Shanklin, J., and Whittle, E. (2003). Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane g-
708 hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. *FEBS*
709 *Lett.* 545, 188–192.
- 710 Shen, J., Liao, Y., Hopper, J. L., Goldberg, M., Santella, R. M., and Terry, M. B. (2017). Dependence
711 of cancer risk from environmental exposures on underlying genetic susceptibility : an illustration
712 with polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer. *Br. J. Cancer* 116, 1229–1233.
- 713 Sikkema, J., De Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with
714 biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022–8028.
- 715 Spanogiannopoulos, P., Bess, E. N., Carmody, R. N., and Turnbaugh, P. J. (2016). The microbial
716 pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 14,
717 273–287.
- 718 Stedtfeld, R. D., Stedtfeld, T. M., Fader, K. A., Williams, M. R., Bhaduri, P., Quensen, J., et al.
719 (2017). TCDD influences reservoir of antibiotic resistance genes in murine gut microbiome.
720 *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–8.
- 721 Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., and Duarte, J. H. (2014). The Aryl Hydrocarbon
722 Receptor : Multitasking in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 403–432.
- 723 Szabo, D. T., Pathmasiri, W., Sumner, S., and Birnbaum, L. S. (2017). Serum Metabolomic Profiles in
724 Neonatal Mice following Oral Brominated Flame Retardant Exposures to HBCD Alpha, Gamma
725 and Commercial Mixture. *Environ. Health Perspect.* 125, 651–659.
- 726 Tamaki, A., Hayashi, H., Nakajima, H., Takii, T., Katagiri, D., Miyazawa, K., et al. (2004). Polycyclic
727 Aromatic Hydrocarbon Increases mRNA Level for Interleukin 1 Beta in Human Fibroblast-Like
728 Synoviocyte Line via Aryl Hydrocarbon Receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 407–410.
- 729 Tralau, T., Sowada, J., and Luch, A. (2014). Insights on the human microbiome and its xenobiotic
730 metabolism : what is known about its effects on human physiology ? *Expert Opin. Drug Metab.*
731 *Toxicol.* 11, 1–15.
- 732 UNEP (2009). Stockholm convention on POPs.
- 733 van Beilen, J. B., Neuenschwander, M., Smits, T. H. M., Roth, C., Balada, S. B., and Witholt, B.
734 (2002). Rubredoxins Involved in Alkane Oxidation. *J. Bacteriol.* 184, 1722–1732.
- 735 Van De Walle, J., Hendrickx, A., Romier, B., Larondelle, Y., and Schneider, Y. (2010). Inflammatory
736 parameters in Caco-2 cells : Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell
737 differentiation. *Toxicol. Vitro.* 24, 1441–1449.
- 738 Van de Wiele, T., Vanhaecke, L., Boeckaert, C., Peru, K., Headley, J., Verstraete, W., et al. (2005).
739 Human Colon Microbiota Transform Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Estrogenic
740 Metabolites. *Environ. Health Perspect.* 113, 6–10. doi:10.1289/ehp.7259.
- 741 Vanhaecke, L., Van Hoof, N., Van Brabant, W., Soenen, B., Heyerick, A., De Kimpe, N., et al.

742 (2006). Metabolism of the Food-Associated Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-
743 phenylimidazo[4,5-b]pyridine by Human Intestinal Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3454–
744 3461.

745 Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., Joshi, P., et al. (2008). Effect of various
746 solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet J.*
747 *Microbiolgy* 7, 1–6.

748 Wang, Y., Rawlings, M., Gibson, D. T., Labbé, D., Bergeron, H., Roland, B., et al. (1995).
749 Identification of a membrane protein and a truncated LysR-type regulator associated with the
750 toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* F1. *Mol. Gen. Genet.* 246, 570–579.

751 Wei, Y., Zhao, L., He, W., Yang, J., Geng, C., Chen, Y., et al. (2016). Benzo[a]pyrene promotes
752 gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and
753 ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. *Int. J. Oncol.* 49, 2055–2063.

754 WHO, and IARC (1993). Some Naturally occurring substances: food items and constituents,
755 heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.

756 Wilson, D. N. (2009). The A – Z of bacterial translation inhibitors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44,
757 393–433.

758 Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat.*
759 *Publ. Gr.* 12, 35–48.

760 Wilson, I. D., and Nicholson, J. K. (2016). Gut microbiome interactions with drug metabolism,
761 efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* 179, 204–222.

762 Yang, P., Wang, Y., Sun, L., Chen, Y., Liu, C., Huang, L., et al. (2017). Urinary metabolites of
763 polycyclic aromatic hydrocarbons, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis. *J. Hazard.*
764 *Mater.* 329, 241–248.

765 Yim, Y.-J., Seo, J., Kang, S.-I., Ahn, J.-H., and Hur, H.-G. (2008). Reductive Dechlorination of
766 Methoxychlor and DDT by Human Intestinal Bacterium *Eubacterium limosum* Under Anaerobic
767 Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 406–411.

768 Zeller, P., Bricks, T., Vidal, G., Jacques, S., Anton, P. M., and Leclerc, E. (2015). Multiparametric
769 temporal analysis of the Caco-2/TC7 demonstrated functional and differentiated monolayers as
770 early as 14 days of culture. *Eur. J. Pharm. Sci.* 72, 1–11.

771 Zhang, L., Nichols, R. G., Correll, J., Murray, I. A., Tanaka, N., Smith, P. B., et al. (2015). Persistent
772 Organic Pollutants Modify Gut Microbiota – Host Metabolic Homeostasis in Mice Through Aryl
773 Hydrocarbon Receptor Activation. *Environ. Health Perspect.* 123, 679–688.

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813

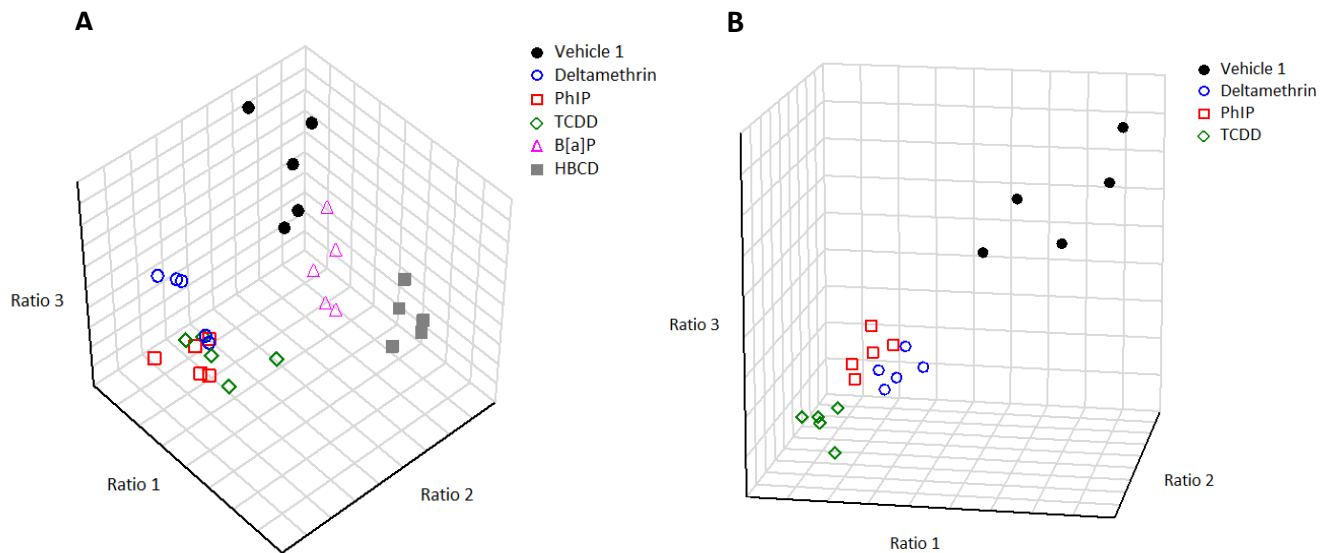


Figure 1: 3D projections of microbial volatolome patterns following pollutant exposures. The projections were realized according to the 3 best ratios of volatile compounds selected by linear discriminant analysis. The five replicates for each condition are shown. (A). Projection of deltamethrin, PhIP, TCDD, B[a]P and HBCD volatolomes. Ratio 1: Disulfide, dimethyl- / Heptane, 4-methyl-; Ratio 2: Cyanoacetic acid methyl ester / Unknown; Ratio 3: Ethyl Acetate / Dimethyl trisulfide. (B). Projection of deltamethrin, PhIP and TCDD volatolomes. Ratio 1: Butanoic acid, 3-methyl-, propyl ester / Dimethyl trisulfide; Ratio 2: Butanethioic acid, S-methyl ester / 3-Pentanone, 2,2,4,4-tetramethyl-; Ratio 3: Pentanoic acid, 1-methylethyl ester / Tetrasulfide, dimethyl-.

814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844

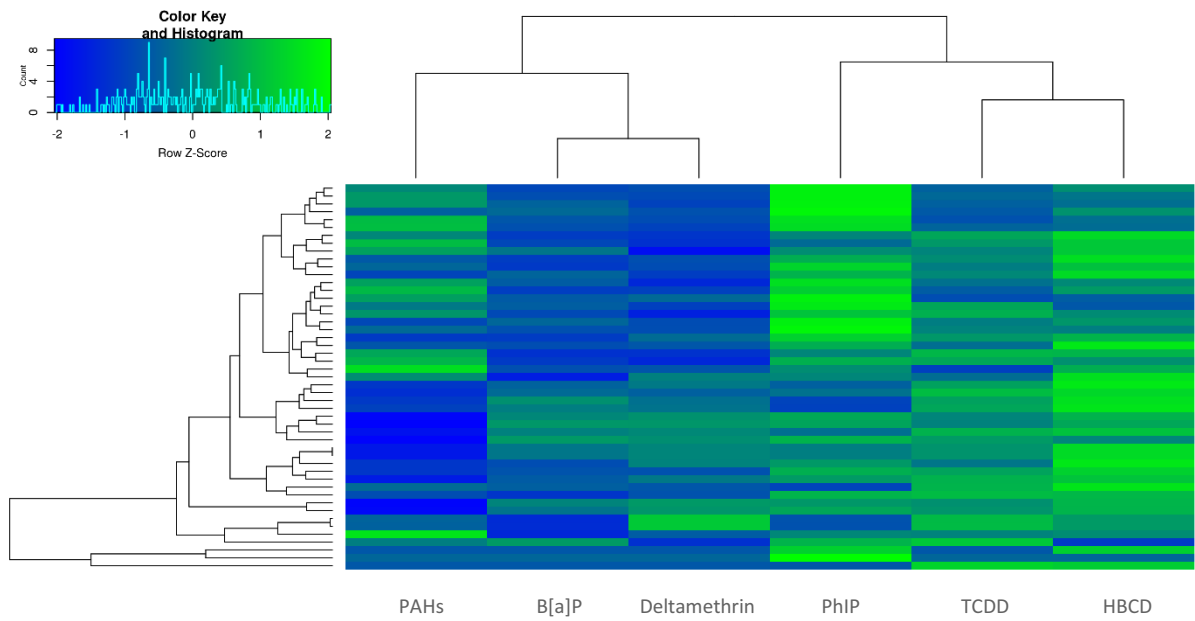
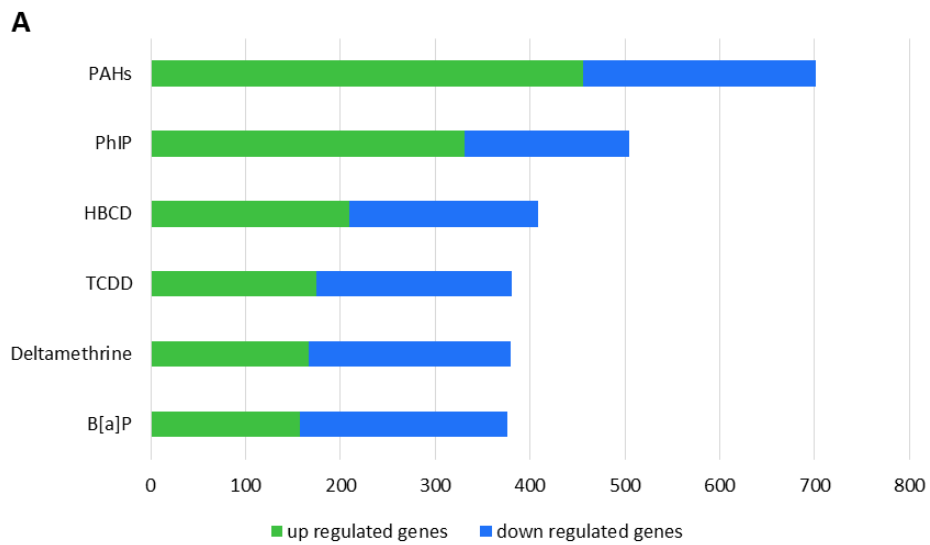


Figure 2: Transcript levels related to microbial GO slim terms that are up and down regulated after the 24 hr of pollutant exposure. Variations are expressed as the row Z-Score. Lines represent GO slim terms, columns represent pollutant samples.

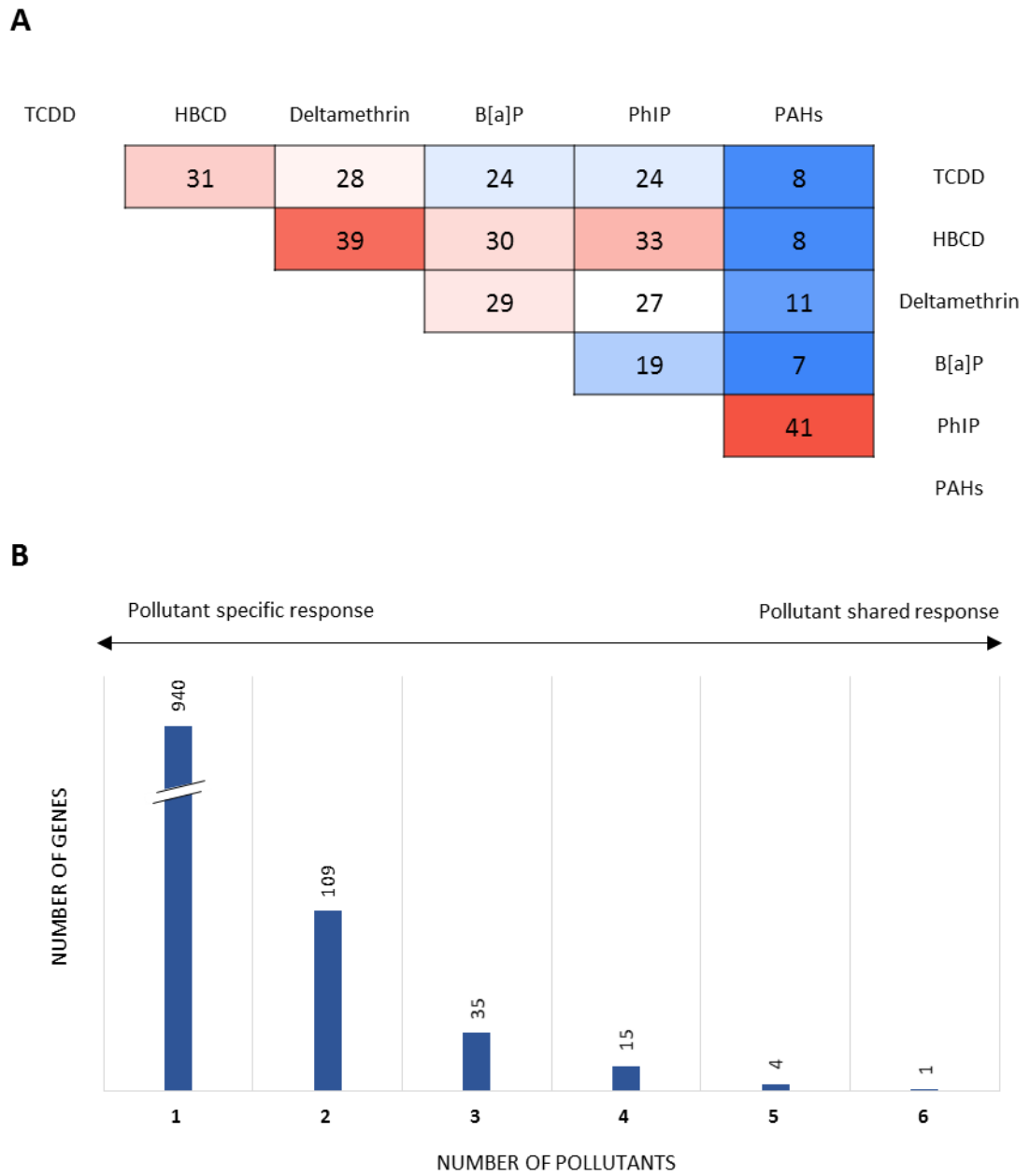
845
846
847



848
849
850
851
852
853
854
855
856

Figure 3: Differentially expressed microbial genes after the 24 hr of pollutant exposure. (A) Number of genes differentially expressed. (B) Mean abundances in CPM of the differentially expressed genes. Only genes with at least a 3-fold change are represented and values arise from the comparison between the pollutant and the vehicle condition.

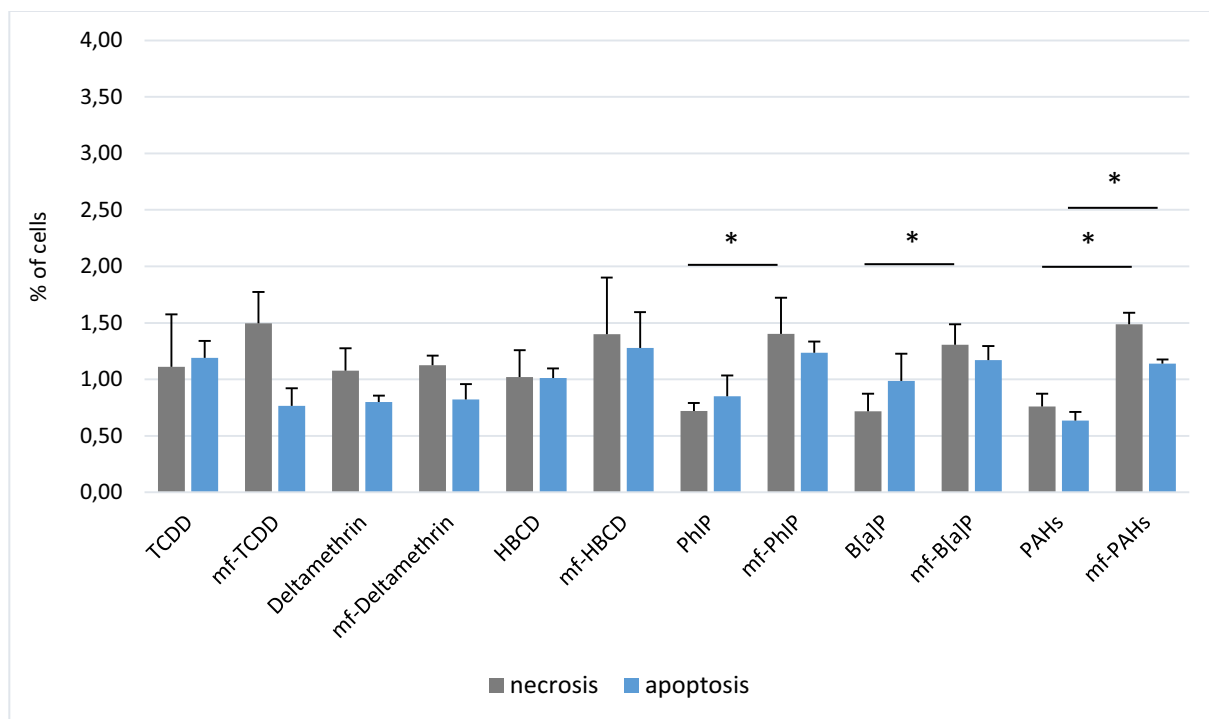
857
858
859



860
861
862
863
864
865
866

Figure 4: Microbial genes specifically induced by pollutants after the 24 hr of exposure. (A) Number of pollutant-specific genes that are shared between each couple of pollutants. (B) Representation of the core pollutant-specific genes.

867
868
869
870
871

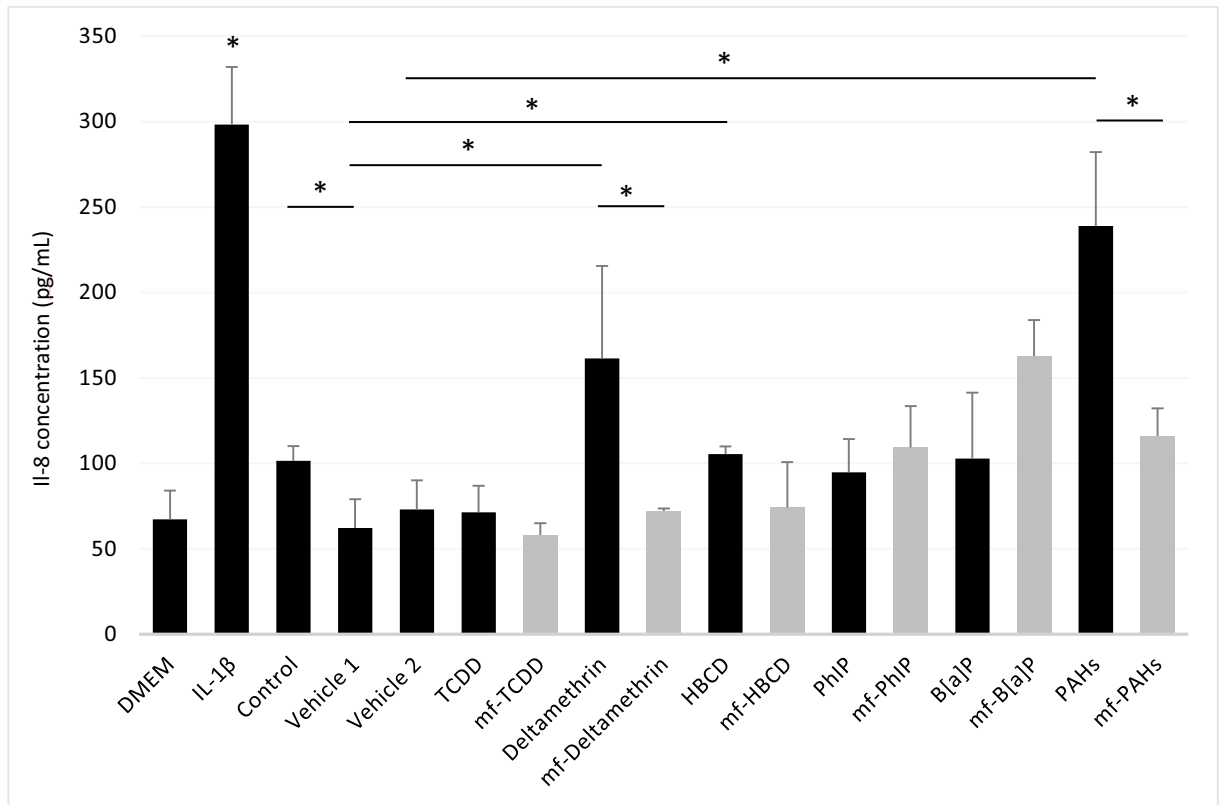


872
873

874 **Figure 5:** Percentage of necrotic and apoptotic TC7 cells after 4 hr of FDS and microbiota-
875 free medium exposure. Values are shown as the mean of the three replicates \pm SEM.
876 Significant variations were assessed using the Mann-Whitney test (p -value < 0.05). mf:
877 microbiota-free.

878
879
880
881
882
883
884
885
886

887
888
889
890



891
892
893
894 **Figure 6:** IL-8 release in the TC7 cell culture supernatants. TC7 cells were exposed to FDS
895 and microbiota-free medium for 4 hr. Values are shown as the mean of the three replicates ±
896 SEM. Significant variations were assessed using the Mann-Whitney test (p-value < 0.05).
897 DMEM is a negative control for toxicity and inflammation to TC7 cells whereas DMSO 10%
898 and IL-1β are positive controls for toxicity and inflammation to TC7 cells, respectively.
899 Vehicle 1: methanol; Vehicle 2: methanol:dichloromethane 1:1; mf: microbiota-free.

Supplementary Material

PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS AND FOODBORNE CHEMICALS INDUCE CHANGES OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA ACTIVITY WITH POTENTIAL IMPACT ON THE GUT HOMEOSTASIS

Clémence Defois¹, Jérémy Ratel², Ghislain Garrat¹, Sylvain Denis¹, Olivier LeGoff¹, Jérémie Talvas^{3,4}, Pascale Mosoni¹, Erwan Engel², Pierre Peyret^{1*}

¹MEDIS, Université Clermont Auvergne, INRA, Clermont-Ferrand, France

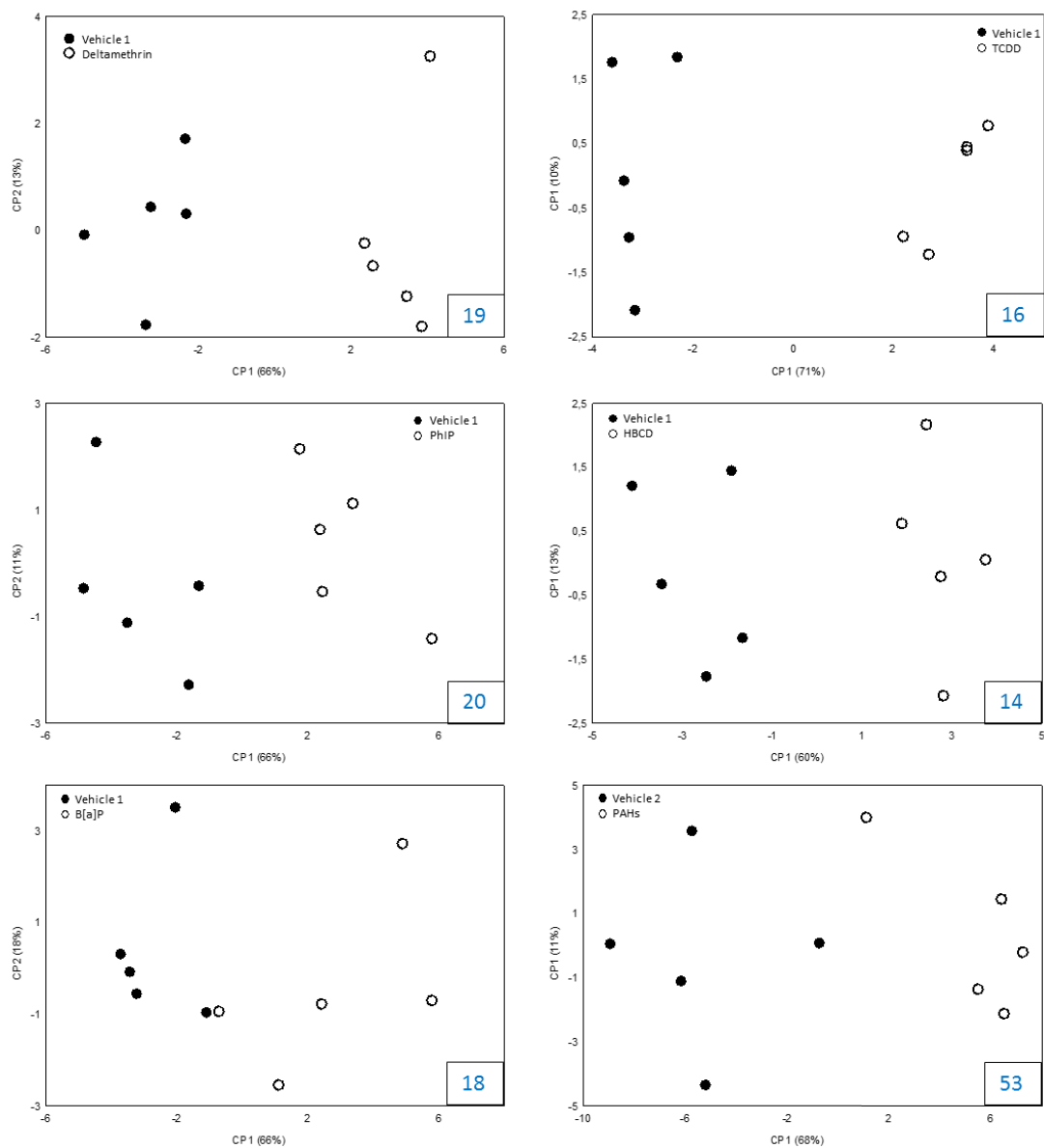
²UR370 QuaPA, MASS Group, INRA, Saint-Genès-Champanelle, France

³UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, Equipe ECREIN, CLARA, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

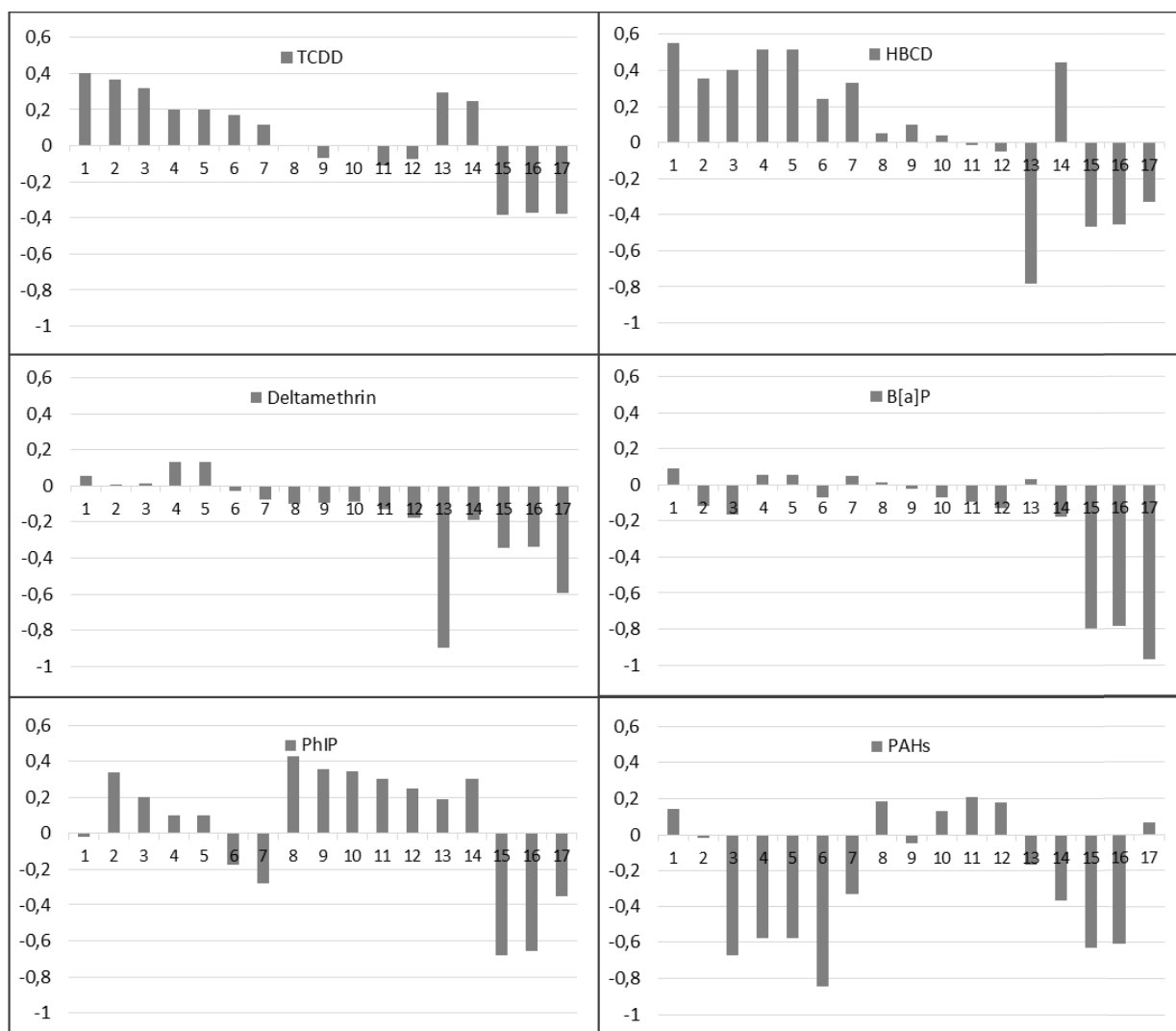
⁴UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, INRA, Clermont-Ferrand, France

* **Corresponding author:** Pierre Peyret

Tel: +33 (0)473178308; E-mail: pierre.peyret@uca.fr

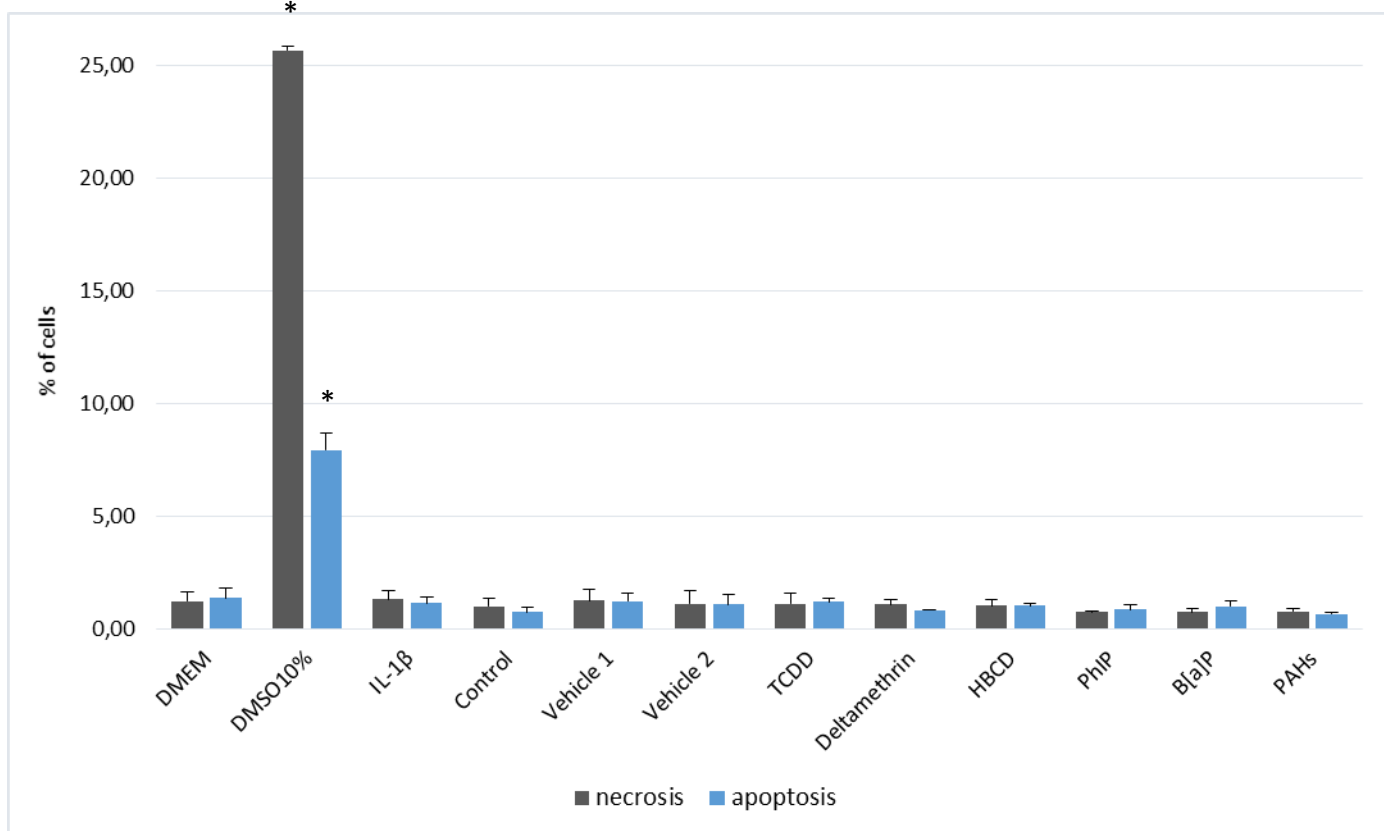


Supplementary Figure 1: Microbial volatolome patterns following pollutant exposure. Principal component analysis (PCA) were carried out according to the potential markers (volatile organic compounds) of each pollutant exposure selected by ANOVA ($p < 0.05$). The five replicates for each condition are shown. Blue numbers in squares are the number of discriminant VOCs following the pollutant exposure.



1 lipid metabolic process
 2 plasma membrane
 3 periplasmic space
 4 protein kinase activity
 5 receptor activity
 6 transcription activity
 7 cell division
 8 cofactor metabolic activity, protein binding
 9 catabolic process
 10 nucleotide metabolic process
 11 generation of precursor metabolites and energy
 12 ATP metabolic process
 13 RNA metabolic process
 14 transport
 15 ribosome
 16 translation
 17 nucleic acid binding

Supplementary Figure 2: Transcript levels related to microbial GO slim terms that are up and down regulated after the 24 hr of pollutant exposure. Variations are expressed as the log2 of the pollutant and the vehicle CPM abundances ratio (y-axis). GO slim terms are represented on the x-axis.



Supplementary Figure 3: Percentage of necrotic and apoptotic TC7 cells after 4 hr of FDS exposure. Values are shown as the mean of the three replicates \pm SEM. Significant variations were assessed using the Mann-Whitney test (p -value < 0.05). DMEM is a negative control for toxicity and inflammation to TC7 cells whereas DMSO 10% and IL-1 β are positive controls for toxicity and inflammation to TC7 cells, respectively. Vehicle 1: methanol; Vehicle 2: methanol:dichloromethane 1:1.

Supplementary Table 1. Composition of the PAH mix 3 solution, proportion and PAH characteristics.

PAHs	proportion (%)	aromatic rings	molecular weight (g/mol)
Anthracene	1,3	3	178,23
Phenanthrene	1,3	3	178,23
Benz[<i>a</i>]anthracene	1,3	4	228,29
Chrysene	1,3	4	228,29
Fluoranthene	1,3	4	202,25
Pyrene	1,3	4	202,25
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	1,3	5	252,31
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	1,3	5	252,31
Benzo[<i>a</i>]pyrene	1,3	5	252,31
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	1,3	6	276,34
Fluorene	2,6	3	166,22
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	2,6	5	278,35
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	2,6	6	276,33
1-Methylnaphthalene	13,2	2	142,20
2-Methylnaphthalene	13,2	2	142,20
Naphthalene	13,2	2	128,17
Acenaphthene	13,2	3	154,21
Acenaphthylene	26,3	3	152,20

Volatile metabolite	m/z ¹	LRI ²	ID ³	Ratio (Pollutant/Vehicle)						
				Deltamethrin	PhIP	TCDD	HBCD	B[a]P	PAHs	
Alcohols										
1-Butanol	56	660	a,b							0,86
Aromatic compounds										
Benzene	78	661	a,b							0,83
Furan, 2-pentyl-	81	992	a,b	0,5		0,42	0,53			
Cymene isomere	119	1033	a,b	0,52						
Limonene	68	1038	a,b	0,37	0,47					
Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethenyl)-	117	1099	a,b	0,51						
indole	117	1308	a,b							1,97
2-(3-Methylbutyl)-3,5-dimethylpyrazine	122	1318	a							1,52
3-methylindole	130	1405	a,b							1,53
Acids										
Propanoic acid, 2-methyl-	73	752	a,b							0,64
butanoic acid	60	815	a,b							0,83
Butanoic acid, 2-methyl-	74	861	a,b							0,68
Pentanoic acid	60	887	a,b							0,87
4-Methylhexanoic acid	71	1036	a							0,83
Hydrocarbons										
2-butene	41	<500	a							0,63
1,3-Pentadiene	67	<600	a							0,74
Heptane, 4-methyl-	114	765	a,b				0,16			0,37
1,3-Octadiene	110	829	a,b	0,73			0,76			
2,4-Dimethyl-1-heptene	83	841	a,b							0,46
Ethers										
Propane, 2-ethoxy-2-methyl-	87	617	a,b							0,24
Unknown										
Unknown	57	<600								0,28
Unknown	73	<600								0,37
Unknown	59	610								0,61
Unknown	73	639								0,23
Unknown	58	664								0,71
Unknown	55	749								0,71
Unknown	113	764								0,51
Unknown	83	831								0,33
Unknown	60	854								0,69
Unknown	91	875		0,38	0,38		0,36			
Unknown	93	942		0,33						
Unknown	103	945						0,67		
Unknown	121	1008			0,56		0,64			
Unknown	71	1014		0,83						
Unknown	85	1027				0,7	0,75			
Unknown	111	1044								0,8
Unknown	85	1103			0,63					
Unknown	149	1160						0,64		
Unknown	57	1200			0,63					
Unknown	122	1204						0,76		
Unknown	93	1208			0,76					1,22
Unknown	73	1452		0,1	0,07	0,11				
Unknown	129	1479								1,24
Total				19	20	16	14	18		53

¹ Mass fragment used for peak area determination

² Linear retention index on a RTX-5MS capillary column

³ Tentative identification based on (a) mass spectrum, (b) linear retention index from the literature

Supplementary Table 3 : Fold-change of the 30 most up-regulated genes by the pollutant exposures. Rubredoxin coding genes are in bold and underline in light blue.

TCDD				Deltamethrin				HBCD			
ID	Function	fold-change	ID	Function	fold-change	ID	Function	fold-change	ID	Function	fold-change
UniRef50_R6DLM6	0	59.10	UniRef50_R7NN69	0	33.52	UniRef50_Q2SDW0	Nucleoside diphosphate kinase	57.12			
UniRef50_U1DQ93	0	35.28	UniRef50_Q8R9C3	50S ribosomal protein L35	33.24	UniRef50_Q8A6I1	0	52.29			
UniRef50_A0A024DGV5	0	33.37	UniRef50_R6DLM6	0	29.02	UniRef50_R6DLM6	0	47.07			
UniRef50_W5LIT1	0	33.32	UniRef50_Q64TK3	0	27.06	UniRef50_A7UYU1	0	43.84			
UniRef50_Q2SDW0	Nucleoside diphosphate kinase	31.06	UniRef50_C9L2U5	0	14.57	UniRef50_W4PRK6	0	23.91			
UniRef50_N3KXV4	Internal scaffolding protein B	30.20	UniRef50_W4PRK6	0	13.29	UniRef50_Q8A6G4	0	21.28			
UniRef50_R9M878	0	24.44	UniRef50_R6JJU2	0	12.07	UniRef50_R5K7Z2	0	20.78			
UniRef50_T3UWL5	0	24.31	UniRef50_A9BSI9	Peptidase S9 prolyl oligopeptidase active site domain protein	11.14	UniRef50_A6I632	0	20.58			
UniRef50_A0A01ITIP0	0	20.41	UniRef50_A7UYU1	0	11.11	UniRef50_R6JJU2	0	17.89			
UniRef50_R7KJU0	0	19.10	UniRef50_R6BAN8	0	10.86	UniRef50_B8FV73	0	14.64			
UniRef50_R6DF65	0	17.01	UniRef50_FOR4U3	0	10.33	UniRef50_Q8A9N6	0	14.47			
UniRef50_W0Z7D8	0	14.83	UniRef50_A0A037Z5W3	0	10.32	UniRef50_R6K7E3	0	14.27			
UniRef50_L2T4X8	0	14.78	UniRef50_G8UIZ6	LemA family protein	9.74	UniRef50_Q89ZK2	0	14.03			
UniRef50_C3QND1	0	13.54	UniRef50_R7KJU0	0	9.52	UniRef50_R7KJB8	Toxin antitoxin system toxin component RelE family	13.01			
UniRef50_UPI000466F9B3	hypothetical protein	13.38	UniRef50_N3KXV4	Internal scaffolding protein B	8.95	UniRef50_Q8A983	0	12.74			
UniRef50_R6WQNS	0	12.64	UniRef50_S3XIH5	0	8.36	UniRef50_R5UQA5	0	12.40			
UniRef50_T4XIZ3	0	12.37	UniRef50_A7UYH5	0	8.14	UniRef50_D6CX32	0	11.72			
UniRef50_Q8A6I1	0	11.79	UniRef50_R5ND35	0	7.97	UniRef50_R9HRX6	0	11.63			
UniRef50_T3IKE1	0	11.47	UniRef50_R7KSW5	0	7.90	UniRef50_R7EFI9	AraC family Bacterial regulatory helix turn helix protein	10.86			
UniRef50_M7P657	0	11.45	UniRef50_O34I33	Putative regulator AldR	7.75	UniRef50_Q8AAV5	0	10.20			
UniRef50_Q89YT3	0	11.40	UniRef50_B2RH08	Biotin synthase	7.37	UniRef50_W6ECI6	Ribonuclease Y	9.86			
UniRef50_F0QZK6	0	11.16	UniRef50_R6DBM1	0	7.27	UniRef50_B1SGA5	0	9.66			
UniRef50_R6KCR3	0	10.30	UniRef50_R6KUE0	0	7.15	UniRef50_Q89Z99	0	9.41			
UniRef50_A6I020	0	9.85	UniRef50_R5C9N4	0	7.14	UniRef50_E6ST97	RNP 1 like RNA binding protein	9.34			
UniRef50_T4XLS2	Minor spike protein H	9.40	UniRef50_R7EUG9	0	6.98	UniRef50_R5CH50	0	9.02			
UniRef50_T3IRN4	0	9.26	UniRef50_D1K6F9	0	6.93	UniRef50_G8UN66	Transcriptional regulator, MarR family	8.99			
UniRef50_I0P4M2	0	9.02	UniRef50_R6IN64	0	6.91	UniRef50_R7LKI4	ABC transporter ATP binding protein	8.98			
UniRef50_W6ECI6	Ribonuclease Y	8.79	UniRef50_R6K7E3	0	6.84	UniRef50_D4IQN7	Uncharacterised ArCR, COG2043	8.76			
UniRef50_C3Q007	0	8.64	UniRef50_R6BTF6	0	6.67	UniRef50_G9S1V7	0	8.64			
UniRef50_P03632	A protein	8.21	UniRef50_E6ST97	RNP 1 like RNA binding protein	6.65	UniRef50_Q64Z12	0	8.47			

PHIP			B[a]P			PAHs		
ID	Function	fold-change	ID	Function	fold-change	ID	Function	fold-change
UniRef50_C3QXE0	0	215,15	UniRef50_Q5LFB3	0	42,07	UniRef50_Q9HTK8	Rubredoxin 2	436,89
UniRef50_Q8A6I1	0	121,73	UniRef50_A6Q1P7	0	33,44	UniRef50_RS5XX0	0	158,11
UniRef50_Q9AL94	Rubredoxin	89,69	UniRef50_C3QZK7	0	30,61	UniRef50_C3QXE0	0	100,48
UniRef50_Q9HTK8	Rubredoxin 2	82,23	UniRef50_D9SU00	0	17,46	UniRef50_C3QWJ9	0	86,24
UniRef50_R5MH79	0	61,46	UniRef50_A0A015U505	0	15,76	UniRef50_R9HFL7	0	71,91
UniRef50_Q64TK3	0	60,88	UniRef50_R6DLM6	0	14,97	UniRef50_R5TXY5	Preprotein translocase YajC subunit	70,78
UniRef50_R5NUL1	0	60,31	UniRef50_D1K5M6	HTH type transcriptional activator HXR family protein	13,59	UniRef50_J9DAQ5	0	58,94
UniRef50_R5K7Z2	0	54,42	UniRef50_I9QGG3	0	11,87	UniRef50_UP10004737F0F	50S ribosomal protein L4, partial	55,19
UniRef50_J9FFB9	0	52,01	UniRef50_FOR2W6	Transcriptional regulator, HXR family	11,25	UniRef50_R7NQL7	0	51,15
UniRef50_A7TAD5	Predicted protein	51,58	UniRef50_I9HKC8	0	11,17	UniRef50_UP1000364274E	hypothetical protein, partial	47,22
UniRef50_Q0VKZ2	Rubredoxin 2	48,76	UniRef50_C3QND1	0	10,72	UniRef50_UP100037D155C	hypothetical protein	45,80
UniRef50_W4PRK6	0	48,43	UniRef50_R5C9N4	0	10,43	UniRef50_UP10003634E02	ribosome recycling factor	41,44
UniRef50_A0A016CCL4	0	47,90	UniRef50_F7KB79	0	10,33	UniRef50_R5MH79	0	37,28
UniRef50_UP1000473AA7A	50S ribosomal protein L19, partial	38,01	UniRef50_B6W4D8	0	9,04	UniRef50_R5JSN8	0	33,72
UniRef50_C9L2U5	0	37,93	UniRef50_R6IF45	0	9,02	UniRef50_RSNU11	0	33,67
UniRef50_M4ZT37	0	36,53	UniRef50_D6CX32	0	8,98	UniRef50_E2N710	0	33,08
UniRef50_W4PAD7	0	36,51	UniRef50_R6JUJ2	0	8,69	UniRef50_I9S877	0	31,77
UniRef50_UP1000371BD4B	hypothetical protein	35,28	UniRef50_A7ALB6	0	8,48	UniRef50_UP1000473C8D5	hypothetical protein, partial	30,62
UniRef50_UP10003FE87B5	RNA binding protein	33,37	UniRef50_W4V8W2	0	8,40	UniRef50_UP100047E52F5	RNA binding protein	30,41
UniRef50_R9K9U0	0	30,15	UniRef50_W1XAM0	GTP binding protein YchF	8,04	UniRef50_UP1000255AEF1	30S ribosomal protein S3, partial	27,81
UniRef50_W4PSI4	Survival protein SurA	27,75	UniRef50_C3R8B8	0	8,02	UniRef50_Q9AL94	Rubredoxin	27,44
UniRef50_L1MCG2	0	26,78	UniRef50_C3Q129	0	8,01	UniRef50_W4USF1	0	25,96
UniRef50_D1XX49	0	25,95	UniRef50_R5ND35	0	7,92	UniRef50_W3Y9G2	0	22,86
UniRef50_R6ESK1	Pyruvate	25,48	UniRef50_R7KSW5	0	7,73	UniRef50_UP10004699BF7	RNA polymerase sigma factor, partial	21,83
UniRef50_UP100038F372E	hypothetical protein	24,02	UniRef50_A7A9T0	0	7,60	UniRef50_R5C541	0	21,56
UniRef50_UP100046599BF7	RNA polymerase sigma factor, partial	23,52	UniRef50_G1UMR4	0	7,44	UniRef50_UP1000474A3E0	transcriptional regulator	18,51
UniRef50_R6T2B9	0	21,92	UniRef50_Q6MDN1	Translation initiation factor IF 1	7,12	UniRef50_Q553X7	UDP glucose 4 epimerase	18,51
UniRef50_W2CCQ7	0	20,38	UniRef50_R6JN64	0	7,08	UniRef50_C3ZG19	0	17,61
UniRef50_R6V0T5	0	19,04	UniRef50_B6YQ01	50S ribosomal protein L11	6,66	UniRef50_G5GC49	0	17,06
UniRef50_C9L2N1	0	17,31	UniRef50_Q8A7K7	0	6,65	UniRef50_R6LUE1	0	16,21

Supplementary Table 4 : Relative abundances (CPM) of the genes specifically induced by the pollutants (not expressed in the vehicle samples), Only genes shared by at least two pollutants ($n > 2$) are represented in the table.

Gene ID	TCDD	Deltamethrin	HBCD	PhIP	B[a]P	PAHs	n	Function
UniRef50_R7EHV5	39,35	23,78	50,16	46,65	27,25	152,51	6	0
UniRef50_R6DEK6	10,43	12,25	17,53	25,82	13,22	0,00	5	0
UniRef50_UPI0003B516BB	11,87	12,72	0,00	53,60	11,34	44,86	5	ATPase AAA
UniRef50_E1WR09	26,77	29,77	34,82	46,67	43,59	0,00	5	0
UniRef50_A6L772	21,39	22,18	28,22	28,62	10,11	0,00	5	0
UniRef50_D1K7M6	0,00	12,39	215,15	112,75	174,48	0,00	4	0
UniRef50_A7V9C4	0,00	71,06	17,51	90,86	84,78	0,00	4	0
UniRef50_J9G429	74,09	0,00	41,12	48,92	51,80	0,00	4	0
UniRef50_R6XCLO	13,36	53,11	28,36	0,00	10,84	0,00	4	ATP synthase delta epsilon subunit beta sandwich domain protein
UniRef50_A7V6N1	39,02	27,93	51,48	330,33	0,00	0,00	4	0
UniRef50_R6R584	20,19	23,20	17,50	52,56	0,00	0,00	4	0
UniRef50_J9QBU0	34,51	68,65	10,85	30,45	0,00	0,00	4	0
UniRef50_Q8A9V0	95,07	14,11	13,67	10,32	0,00	0,00	4	ATP synthase subunit c
UniRef50_A7V0X1	47,82	58,54	0,00	0,00	915,01	267,44	4	0
UniRef50_Q8A690	0,00	10,13	11,56	20,53	0,00	19,92	4	0
UniRef50_R6DP28	0,00	10,89	12,49	38,44	0,00	13,29	4	0
UniRef50_A7M192	74,14	64,04	41,57	0,00	38,11	0,00	4	0
UniRef50_R7EJP6	16,20	21,67	21,76	0,00	28,89	0,00	4	0
UniRef50_Q8A8N1	16,98	20,42	14,29	0,00	12,11	0,00	4	0
UniRef50_D1B006	20,83	11,00	17,60	28,40	0,00	0,00	4	Response regulator receiver
UniRef50_A7V4H1	0,00	30,44	17,35	0,00	0,00	111,43	3	0
UniRef50_R5U9G9	0,00	29,68	11,17	0,00	0,00	31,79	3	6 carboxy 5,6,7,8 tetrahydropterin synthase
UniRef50_R6JL68	39,26	0,00	0,00	0,00	34,14	15,60	3	0
UniRef50_A7VA37	0,00	0,00	63,10	150,33	100,04	0,00	3	0
UniRef50_R7ERJ2	38,79	190,26	0,00	0,00	31,43	0,00	3	0
UniRef50_S3YK21	0,00	27,18	18,03	0,00	28,46	0,00	3	0
UniRef50_D6D403	21,40	0,00	18,74	0,00	25,33	0,00	3	Predicted ATPase
UniRef50_E5VEA9	0,00	0,00	10,33	14,87	17,21	0,00	3	0
UniRef50_R6KNV0	12,68	61,34	0,00	0,00	12,62	0,00	3	Thioredoxin
UniRef50_R7JOE4	20,04	10,34	0,00	0,00	11,56	0,00	3	0
UniRef50_I9T6H3	0,00	67,50	0,00	26,94	10,83	0,00	3	0
UniRef50_R7NR20	0,00	10,19	25,55	0,00	10,64	0,00	3	0
UniRef50_R7DK08	0,00	15,08	11,69	38,39	0,00	0,00	3	0
UniRef50_I8WIF5	0,00	11,53	19,98	30,75	0,00	0,00	3	0
UniRef50_A6LB18	14,09	0,00	34,79	28,74	0,00	0,00	3	0
UniRef50_E4VDP5	0,00	12,00	12,15	10,65	0,00	0,00	3	0
UniRef50_E6SVF3	11,56	44,66	49,22	0,00	0,00	0,00	3	0
UniRef50_R6C381	18,54	10,07	25,94	0,00	0,00	0,00	3	Protease prtH
UniRef50_D2F0M4	14,61	12,84	14,87	0,00	0,00	0,00	3	0
UniRef50_A7UY33	0,00	0,00	16,93	0,00	19,82	60,78	3	0
UniRef50_U2CQ03	10,44	0,00	0,00	13,80	0,00	26,25	3	0
UniRef50_K1SS20	0,00	0,00	0,00	42,25	14,43	13,59	3	Protein containing Clp ATPase
UniRef50_R6T4A9	36,33	17,26	0,00	0,00	86,85	0,00	3	0
UniRef50_R9HFL7	0,00	10,76	0,00	314,07	28,10	0,00	3	0
UniRef50_C3Q3W7	17,46	0,00	10,06	0,00	27,98	0,00	3	0
UniRef50_G1UKN1	0,00	31,71	48,89	0,00	25,48	0,00	3	0
UniRef50_C3Q503	33,16	0,00	15,01	0,00	24,66	0,00	3	0
UniRef50_U2R7C3	0,00	0,00	26,88	40,02	17,25	0,00	3	0
UniRef50_C3QNK7	0,00	20,16	24,68	0,00	15,80	0,00	3	0
UniRef50_I8Z3T0	14,27	0,00	0,00	12,33	11,71	0,00	3	0
UniRef50_A7I3K1	0,00	18,56	15,68	0,00	10,44	0,00	3	Transformation system protein
UniRef50_S3XFD1	0,00	11,89	21,00	19,61	0,00	0,00	3	0
UniRef50_UPI000361638B	0,00	13,94	11,97	14,55	0,00	0,00	3	hypothetical protein
UniRef50_R6J9L3	0,00	11,42	16,32	13,19	0,00	0,00	3	0
UniRef50_R9HWK2	11,77	12,48	11,38	0,00	0,00	0,00	3	0
UniRef50_A8FKN5	0,00	0,00	21,69	0,00	0,00	433,68	2	50S ribosomal protein L28
UniRef50_R7ENG3	0,00	28,19	0,00	0,00	0,00	81,47	2	0
UniRef50_C3QNF5	0,00	16,29	0,00	0,00	0,00	27,71	2	0
UniRef50_R6XRK4	40,08	0,00	0,00	0,00	0,00	25,91	2	0
UniRef50_A7UZP3	72,34	0,00	0,00	0,00	50,01	0,00	2	0
UniRef50_C3Q0T0	0,00	0,00	15,46	0,00	47,59	0,00	2	0
UniRef50_C3QMR9	0,00	0,00	57,84	0,00	25,90	0,00	2	0
UniRef50_A7LXE8	0,00	14,64	0,00	0,00	22,09	0,00	2	0
UniRef50_R6RYX7	0,00	0,00	10,56	0,00	21,95	0,00	2	0
UniRef50_R7N8L8	19,47	0,00	0,00	0,00	19,82	0,00	2	0
UniRef50_D1JYA5	0,00	31,06	0,00	0,00	18,55	0,00	2	0
UniRef50_C3PYT0	21,70	0,00	0,00	0,00	17,29	0,00	2	0
UniRef50_U5QAC3	0,00	0,00	0,00	26,27	13,84	0,00	2	XRE Family Transcriptional Regulator
UniRef50_I9QQ11	0,00	27,61	0,00	17,13	0,00	0,00	2	0
UniRef50_C6Z9T9	13,59	0,00	0,00	10,67	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R7EP71	194,66	0,00	138,83	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A7LQNO	17,93	0,00	50,48	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_Q8ABX4	11,25	47,20	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A7V476	16,28	12,68	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_W6NMGO	0,00	0,00	0,00	352,27	0,00	393,00	2	0
UniRef50_UPI00046AB6B9	0,00	0,00	0,00	515,62	0,00	338,23	2	hypothetical protein
UniRef50_R5K1C5	0,00	0,00	0,00	16,13	0,00	94,48	2	0
UniRef50_J9GEZ5	0,00	0,00	0,00	111,14	0,00	56,92	2	0
UniRef50_I8VVB9	0,00	0,00	0,00	26,90	0,00	54,57	2	0
UniRef50_UPI0003A8B9B4	0,00	0,00	0,00	13,20	0,00	44,20	2	transcriptional regulator
UniRef50_R6DEL5	0,00	0,00	0,00	97,64	0,00	42,85	2	0

UniRef50_R6RY56	0,00	0,00	0,00	51,04	0,00	37,85	2	0
UniRef50_K6BCU8	0,00	0,00	0,00	20,00	0,00	36,04	2	0
UniRef50_W4PFZ8	0,00	0,00	0,00	27,84	0,00	34,90	2	Similar to glycogen synthase
UniRef50_E4VRP1	0,00	0,00	0,00	10,92	0,00	33,56	2	Toxin antitoxin system, antitoxin component, Xre domain protein
UniRef50_U2B9L2	14,50	0,00	0,00	0,00	0,00	30,71	2	0
UniRef50_J9F6U4	0,00	0,00	0,00	36,44	0,00	30,67	2	Transposase
UniRef50_U2DIO8	0,00	16,82	0,00	0,00	0,00	29,04	2	0
UniRef50_B3JI39	0,00	0,00	0,00	26,25	0,00	28,08	2	0
UniRef50_W6P356	0,00	0,00	0,00	27,95	0,00	27,65	2	0
UniRef50_A7LQE7	0,00	0,00	0,00	26,56	0,00	25,14	2	0
UniRef50_UPI000474161C	43,03	0,00	0,00	0,00	0,00	24,99	2	lysis protein E, partial
UniRef50_A7LYL1	0,00	0,00	0,00	16,32	0,00	23,24	2	0
UniRef50_E2NIX9	0,00	0,00	0,00	20,93	0,00	22,76	2	0
UniRef50_A0A015V969	0,00	13,55	0,00	0,00	0,00	21,23	2	0
UniRef50_A0A016HZG3	0,00	0,00	0,00	29,01	0,00	21,14	2	0
UniRef50_UPI00046A3D72	0,00	0,00	0,00	51,27	0,00	20,18	2	toxin
UniRef50_A1ZPL8	0,00	0,00	0,00	21,35	0,00	18,38	2	0
UniRef50_S3XPY6	0,00	0,00	0,00	12,66	0,00	16,98	2	0
UniRef50_D6CWC7	0,00	0,00	13,71	0,00	0,00	16,93	2	0
UniRef50_W4P636	0,00	0,00	0,00	17,41	0,00	16,72	2	Fructose 1,6 bisphosphatase
UniRef50_R5MK88	0,00	0,00	0,00	11,06	0,00	16,72	2	0
UniRef50_UPI000476247B	0,00	0,00	0,00	13,14	0,00	16,36	2	RNA binding protein
UniRef50_A7LTD2	0,00	0,00	0,00	11,13	0,00	16,17	2	0
UniRef50_R5JGM1	0,00	0,00	0,00	14,19	0,00	16,16	2	0
UniRef50_K9E5U9	0,00	0,00	0,00	26,91	0,00	15,83	2	0
UniRef50_C3QTB7	0,00	0,00	0,00	15,16	0,00	15,02	2	Virulence associated protein D conserved region (Fragment)
UniRef50_Q8A268	0,00	0,00	0,00	19,23	0,00	14,62	2	0
UniRef50_A7I284	0,00	0,00	0,00	0,00	12,59	14,15	2	0
UniRef50_J9D3T0	0,00	0,00	0,00	10,41	0,00	13,03	2	0
UniRef50_K1TBM1	0,00	0,00	0,00	27,91	0,00	12,97	2	Protein containing DUF140
UniRef50_R5KSU4	0,00	0,00	0,00	33,17	0,00	12,51	2	0
UniRef50_R6K4B4	0,00	0,00	0,00	10,17	0,00	11,73	2	0
UniRef50_W0T974	0,00	0,00	0,00	10,97	0,00	11,19	2	0
UniRef50_W4PM36	0,00	0,00	0,00	45,60	0,00	10,78	2	ADP heptose
UniRef50_A9KD32	0,00	0,00	0,00	13,69	35,70	0,00	2	30S ribosomal protein S10
UniRef50_A7M5J5	0,00	0,00	29,82	0,00	30,88	0,00	2	0
UniRef50_R6HZ23	0,00	0,00	10,06	0,00	29,16	0,00	2	0
UniRef50_D1K453	0,00	0,00	0,00	36,57	28,13	0,00	2	0
UniRef50_R5TTZ5	0,00	15,06	0,00	0,00	19,86	0,00	2	Phosphocarrier protein HPr
UniRef50_W6PD11	16,93	0,00	0,00	0,00	18,96	0,00	2	Probable truncated transposase
UniRef50_U5Y126	0,00	25,01	0,00	0,00	15,75	0,00	2	0
UniRef50_Q7VJ75	0,00	0,00	19,83	0,00	15,57	0,00	2	50S ribosomal protein L33
UniRef50_A7V0A1	0,00	0,00	14,17	0,00	15,57	0,00	2	0
UniRef50_A7ZfZ1	0,00	44,77	0,00	0,00	11,78	0,00	2	Translation initiation factor IF 1
UniRef50_K4ZID4	0,00	10,28	0,00	0,00	10,46	0,00	2	0
UniRef50_BONB82	0,00	0,00	0,00	16,11	10,26	0,00	2	0
UniRef50_I9R8F8	22,39	0,00	0,00	96,22	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A5ZEX7	0,00	0,00	35,09	76,59	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A0A015PF56	0,00	12,08	0,00	56,91	0,00	0,00	2	NigD like family protein
UniRef50_A7V0H4	24,33	0,00	0,00	48,32	0,00	0,00	2	0
UniRef50_C3QTH1	0,00	0,00	138,83	43,62	0,00	0,00	2	0
UniRef50_Q5L8B7	96,96	0,00	0,00	43,57	0,00	0,00	2	50S ribosomal protein L29
UniRef50_W4PJA0	0,00	18,34	0,00	32,21	0,00	0,00	2	Ferritin like protein 2
UniRef50_R5USR2	0,00	0,00	13,03	30,08	0,00	0,00	2	0
UniRef50_I9TWR6	0,00	0,00	13,52	25,53	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A7H0B6	19,13	0,00	0,00	23,33	0,00	0,00	2	Conserved domain protein
UniRef50_I8VI90	0,00	0,00	14,38	20,82	0,00	0,00	2	0
UniRef50_Q8A4D8	0,00	0,00	25,80	18,16	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R7NXX0	10,32	0,00	0,00	17,80	0,00	0,00	2	0
UniRef50_B9KFW0	0,00	12,49	0,00	17,13	0,00	0,00	2	DNA directed RNA polymerase subunit omega
UniRef50_R7KP04	0,00	0,00	13,94	16,49	0,00	0,00	2	0
UniRef50_C3Q3D7	28,17	0,00	0,00	14,55	0,00	0,00	2	0
UniRef50_B5U1Z0	0,00	10,97	0,00	14,31	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A0A016AXU6	0,00	0,00	13,95	13,95	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R7NW82	23,49	0,00	0,00	13,95	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A7UY13	0,00	0,00	47,99	12,88	0,00	0,00	2	0
UniRef50_B7AI26	12,64	0,00	0,00	11,56	0,00	0,00	2	0
UniRef50_C3PZW7	11,56	0,00	0,00	10,17	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R9HTY4	30,97	0,00	40,83	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_Q30NU1	0,00	11,91	33,49	0,00	0,00	0,00	2	Protein translocase subunit secG
UniRef50_D7J8F7	0,00	31,71	33,05	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A7V4D5	48,67	0,00	32,66	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_D1K9F1	0,00	95,13	28,86	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R7HPH6	18,17	0,00	24,79	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_D6D7R2	30,98	0,00	15,37	0,00	0,00	0,00	2	Helix turn helix
UniRef50_C3QPL3	13,90	0,00	14,77	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_C9LML2	0,00	10,60	14,15	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_UPI0003755F11	10,32	0,00	13,57	0,00	0,00	0,00	2	hypothetical protein
UniRef50_D1K220	13,10	0,00	12,62	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R6JFM2	0,00	11,53	11,77	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_A7LUI9	10,11	19,88	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_W6PIJ9	10,99	14,04	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0
UniRef50_R6TGQ5	12,46	10,28	0,00	0,00	0,00	0,00	2	0

2.4. Conclusion et perspectives

Ces travaux ont mis en évidence une modification de l'activité du microbiote intestinal humain par diverses familles de polluants chimiques alimentaires. Les changements induits, observés au niveau de la régulation des gènes et de la production de composés volatils microbiens, ont été mis en évidence dès 24h après l'exposition. Là encore, des études d'exposition chronique en système de fermenteur continu, permettraient de mettre en évidence une évolution de l'activité microbienne allant potentiellement vers une accentuation des changements de l'activité ou vers une résilience fonctionnelle du microbiote intestinal.

L'étude volatolomique a mis en évidence une augmentation des composés soufrés suite à l'exposition du microbiote intestinal aux polluants. La réponse de l'hôte, induite par la présence de ces composés soufrés, pourrait notamment être évaluée en modèle animal pour comprendre leurs rôles dans le métabolisme et la physiologie de l'organisme. Les modèles animaux permettraient également de confirmer ou non les effets pro-inflammatoires des métabolites issus de l'interaction polluant-microbiote mis en évidence dans nos conditions *in vitro* de culture cellulaire. Les travaux réalisés par Ribière *et al.*, ont notamment montré qu'une exposition au B[a]P en modèle murin pendant 28 jours, conduisait à l'établissement d'une inflammation modérée de la muqueuse iléale et colique (Ribière *et al.*, 2016). L'utilisation de modèles murins axéniques serait également pertinente pour appréhender le rôle de l'interaction polluant-microbiote sur l'homéostasie de l'hôte.

En modèle *in vitro*, les tests de cytotoxicité et d'inflammation développés dans notre étude, pourraient être réalisés sur d'autres lignées cellulaires intestinales, sur un temps plus long d'exposition ou encore en co-culture avec des cellules de l'immunité pour se rapprocher au plus près des conditions physiologiques rencontrées chez l'hôte.

Enfin, les polluants (excepté les HAPs) ont été utilisés séparément afin de discriminer les mécanismes d'action de chaque famille. Cependant, l'Homme est exposé continuellement à de nombreuses familles de composés, et ce de manière simultanée. Ainsi l'étude d'un mélange de polluants permettrait de mettre en évidence de potentiels effets synergiques ou antagonistes sur les fonctions du microbiote intestinal.

CONCLUSION GENERALE

L'Homme est exposé à une myriade de molécules chimiques issues d'activités anthropiques (*e.g.* industrie, transports, agriculture, transformation des aliments) et naturelles (*e.g.* feu de forêt, volcanisme). L'industrialisation de notre société, qui s'est accélérée au cours du XX^{ème} siècle, a notamment conduit à la production d'une grande diversité de molécules chimiques potentiellement toxiques pouvant être déversées accidentellement ou non dans l'environnement. Depuis les années 70-80, la production des molécules chimiques résultant de ces activités industrielles a fortement été réduite par l'interdiction de certains produits ainsi que par la modification de certains procédés technologiques. Pourtant, de par leurs propriétés physico-chimiques, ces molécules polluantes persistent dans l'environnement et peuvent encore y être distribuées entre autre par le mauvais entretien des décharges, le déversement illégal ou inapproprié des déchets. Ces molécules polluantes contaminent tous les écosystèmes (eau, terre, air), s'accumulent dans les tissus vivants au cours de la production végétale et animale, et se retrouvent, à terme, transférées dans les produits alimentaires.

Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux POPs puisqu'ils sont un des nombreux facteurs pouvant participer à la hausse des cas d'obésité, de diabète et de certaines maladies auto-immunes et troubles neurologiques dans le monde (Jin et al., 2014; Neel and Sargis, 2011). Par ailleurs, des études épidémiologiques ont notamment montré que l'incidence de pathologies digestives, comme les MICI ou les CCR, apparaît plus élevée dans les zones urbaines où l'exposition aux polluants est plus importante (Bishehsari et al., 2014; Kaplan et al., 2010).

Étant donné que l'exposition aux POPs et aux produits chimiques d'origine alimentaire se produit principalement *via* l'alimentation, le TGI et le microbiote intestinal sont perpétuellement exposés à ces composés. Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie du TGI, en réalisant des fonctions métaboliques, immunologiques et structurales, essentielles à la physiologie de son hôte. Il possède un répertoire métabolique extensif, spécifique mais complémentaire des activités enzymatiques de l'hôte. Près de 40% des petites molécules retrouvées dans le sang sont issues du métabolisme microbien (Saad et al., 2012). Ces molécules sont donc assimilables par l'hôte et peuvent ainsi être utilisées pour son propre métabolisme. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des altérations de la structure du microbiote intestinal associées à un état pathologique chronique de l'hôte (Lynch and Pedersen, 2016). Ces pathologies ne se limitent pas à l'environnement digestif mais touchent l'ensemble de l'organisme. Le rôle de l'alimentation et d'autres facteurs environnementaux tels que la prise de molécules pharmacologiques dans la modulation de la

composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal est reconnu (Conlon and Bird, 2015; Heinritz et al., 2016; Koropatkin and Martens, 2017; Maurice et al., 2013). Plus récemment, l'exposition du microbiote intestinal à des contaminants alimentaires (*e.g.* métaux lourds, nanoparticules, additifs alimentaires, POPs) a également montré induire des perturbations du microbiote pouvant conduire à une altération de l'homéostasie intestinale (Jin et al., 2017).

Les travaux menés au cours de cette thèse ont eu pour objectif d'étudier l'impact de POPs et de contaminants néoformés dans les aliments sur le microbiote intestinal humain en modèle *in vitro*. Les contaminants inclus dans ce travail sont représentatifs des principales familles retrouvées dans l'alimentation : les dioxines, les RFBs, les pesticides (pyréthriinoïdes), les AHs et les HAPs. Pour la première fois, une exposition aigüe de B[a]P sur le microbiote fécal humain a été initiée. Dans nos conditions expérimentales, bien que le polluant n'ait pas induit de changement significatif de la structure du microbiote, l'activité microbienne a été modifiée indiquant une rapide déviation du métabolisme microbien en réponse à la présence du polluant. Ainsi, l'étude de l'impact de six classes de contaminants chimiques sur l'activité du microbiote fécal humain a été initiée et les propriétés inflammatoires des métabolites issus de l'interaction polluant-microbiote ont été évaluées sur une lignée cellulaire intestinale. Là encore, une altération de l'activité microbienne a été observée dans le niveau d'expression des gènes ainsi que dans le profil du volatolome microbien. Des composés volatils marqueurs de l'exposition aux polluants ont pu être identifiés. Enfin, nous avons montré que les métabolites issus de l'interaction polluant-microbiote mènent potentiellement à l'établissement d'un état pro-inflammatoire au niveau du tractus digestif.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les résultats obtenus tout au long de cette thèse ouvrent de nombreuses perspectives de travail dans l'étude de l'interaction des contaminants chimiques alimentaires avec le microbiote intestinal. Cette partie de la rédaction permet donc de discuter des modèles d'études ainsi que des axes de recherche qui peuvent faire suite à ce travail de thèse.

1. Modèles d'étude de l'interaction polluant-microbiote intestinal

1.1. Les modèles *in vitro*

Le choix du modèle d'étude du microbiote intestinal est lié aux questions scientifiques posées et doit prendre en compte les avantages et les inconvénients inhérents à chaque système. Pour des raisons éthiques évidentes, les études menées sur l'interaction de polluants chimiques avec le microbiote intestinal sont impossibles chez l'Homme. A ce jour, les seules études *in vitro* disponibles ont étudié la biodisponibilité des HAPs pour le métabolisme microbien (Laird et al., 2007; Van de Wiele et al., 2004b) et ont démontré les capacités de dégradation des HAPs du microbiote intestinal humain, sans mettre en évidence l'impact des polluants sur la communauté microbienne (Van de Wiele et al., 2004a, 2005). Ainsi, nos travaux ont été conduits en modèles *in vitro*, en système batch, afin de cribler l'impact de diverses familles de polluants sur la structure et les fonctions du microbiote intestinal de l'Homme. Les modèles *in vitro* sont une alternative aux modèles animaux et représentent une plateforme technologique innovante essayant de mimer au plus près le tractus digestif humain. La complexité des modèles s'étend de systèmes de type batch (système fermé, statique) à des systèmes en flux continu (système dynamique) à plusieurs compartiments (Payne et al., 2012). L'utilisation de systèmes *in vitro* de fermentation, développés au sein du laboratoire, permettent d'examiner les effets directs d'une exposition aux polluants sur les structures et fonctions du microbiote intestinal humain.

Du fait de l'appauvrissement en nutriments, de l'accumulation des métabolites microbiens ainsi que de l'acidification non contrôlée du milieu, le système batch est utilisé sur une courte période (24-48h). Cependant, son faible coût, son haut débit ainsi que sa simplicité d'exécution font de ce système un modèle d'étude privilégié précédant l'utilisation de modèles plus complexes. Les modèles de fermentation continue, à un ou plusieurs compartiments, permettent quant à eux, d'effectuer des études sur le long terme par l'entrée et la sortie des substrats et métabolites (Berner et al., 2013; Feria-Gervasio et al., 2014; Mäkiyuokko et al., 2006). Ces systèmes offrent un environnement plus proche des conditions physico-chimiques coliques que les systèmes fermés (efflux constant des nutriments, des

déchets métaboliques et des gaz, contrôle du pH, du potentiel d'oxydoréduction). Ces modèles de fermentation ont notamment été utilisés pour l'étude du métabolisme des archées méthanogènes au sein du microbiote fécal humain ou encore pour le criblage de différentes méthodes de préservations du microbiote fécal (Gaci et al., 2017; Tottey et al., 2015). Dans ce cadre, des travaux ont été initiés au sein du laboratoire en modèle de fermentation continu (Mini Bioreactor Applikon®) pour étudier les effets d'une exposition chronique du B[a]P sur le microbiote fécal de l'Homme. Parallèlement à cette exposition chronique, une exposition en système batch de 24h est réalisée à partir de la même suspension fécale afin de comparer les potentielles perturbations de la communauté microbienne dans les deux systèmes.

Les expositions chroniques en modèles continus ouvrent de nouvelles perspectives d'études dans l'interaction des xénobiotiques avec le microbiote intestinal. Notamment, des cinétiques de fermentation pourraient être effectuées pour le dosage de potentiels produits de dégradation des contaminants (Koppel et al., 2017) ou encore pour mettre en évidence la mise en place de mécanismes d'adaptation pouvant aboutir à une résilience fonctionnelle ou structurale des communautés microbiennes après exposition (Sommer et al., 2017). L'utilisation de systèmes dynamiques à plusieurs compartiments permettrait de se rapprocher un peu plus des conditions physiologiques coliques notamment par la prise en compte de la présence de mucus comme retrouvé dans le modèle M-SHIME (Van den Abbeele et al., 2012). Ce modèle présente des microsphères enrobées de mucine permettant le maintien et la croissance des bactéries adhérentes au mucus. En utilisant les propriétés de ce système, nous pourrions ainsi évaluer l'impact de la présence de mucus sur le microbiote fécal après exposition aux polluants. Enfin, l'Homme est exposé à diverses familles de polluants, ainsi, les microbiotes pourraient également être exposés à des mélanges de contaminants pour mettre en évidence de potentiels effets synergiques, additifs ou antagonistes (Liess et al., 2016; Mauderly and Samet, 2009; Piggott et al., 2015).

1.2. Les modèles *in vivo*

Les modèles animaux monogastriques se rapprochent du système digestif humain puisqu'ils prennent en compte l'organisme en entier, incluant les processus endocriniens, immunologiques, le rôle des cellules de l'hôte et du microbiote (Venema and van den Abbeele, 2013). Ces modèles comportent de nombreux avantages comme (i) le contrôle de l'environnement (*e.g.* stress, nutrition, exercices physiques), (ii) le contrôle du fond génétique de la population, (iii) accès aux microorganismes commensaux non encore cultivables et (iv)

accès aux contenus intestinaux, tissus et organes après sacrifice des animaux (Boureau et al., 2000). Les travaux de Ribière *et al.*, ont souligné une modification de l'abondance relative de certains taxa du microbiote fécal murin après exposition au B[a]P, pouvant suggérer que les effets du polluants peuvent être dépendants de la physiologie et du métabolisme de l'hôte (Ribière et al., 2016). Pour compléter cette hypothèse, des études en modèle murin ont notamment montré que l'induction d'une perturbation du microbiote intestinal par des xénobiotiques était dépendante du récepteur AhR (Korecka et al., 2016; Zhang et al., 2015b). Les travaux de Ribière *et al.*, ont également mis en évidence la mise en place d'une inflammation modérée au niveau iléal et colique, cependant il est impossible de déterminer si l'inflammation est due au métabolisme du polluant par l'hôte ou si une modification du microbiote par le polluant a induit un état pro-inflammatoire de l'environnement intestinal. Ainsi, l'utilisation de modèles murins axéniques permettrait de déterminer l'implication du microbiote intestinal dans la toxicité des contaminants chimiques alimentaires. Si les souris axéniques exposées aux polluants développent de l'inflammation, l'effet des polluants est donc indépendant du microbiote, bien qu'il puisse être exacerbé par ce dernier. En revanche, si aucune inflammation intestinale n'est observée chez les souris axéniques en comparaison à des souris conventionnelles, alors le microbiote est requis. Enfin, le transfert d'un microbiote intestinal altéré par un polluant à des souris axéniques permettrait de savoir si seule la dysbiose du microbiote est nécessaire pour induire l'état inflammatoire. Néanmoins, il existe des différences génétiques, physiologiques, métaboliques et microbiennes entre les modèles animaux et l'Homme qui doivent être considérées lors de l'extrapolation des résultats (Nguyen et al., 2015).

1.3. Quels microbiotes intestinaux ?

De par les nombreuses fonctions physiologiques qu'il remplit, le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans l'homéostasie du TGI et plus globalement dans celle de l'hôte. Ainsi, les dysbioses du microbiote intestinal sont très fréquemment associées à des pathologies digestives telles que les MICI ou le SII. Il pourrait ainsi être intéressant d'évaluer, si l'exposition aux polluants peut exacerber la dysbiose pré-établie du microbiote intestinal dans ce type de pathologie, voire exacerber l'état physio-pathologique de l'hôte. L'impact du microbiote intestinal ne se limitant pas à l'environnement digestif, ce type d'étude pourrait également être mené sur le microbiote de patients atteints de dysfonctionnements

immunitaires, métaboliques ou neurologique (Schroeder and Bäckhed, 2016). L'utilisation de modèles murins de colite induite pourrait également être envisagée (Antoniou et al., 2016; Chassaing et al., 2014; Keubler et al., 2015).

Les travaux de Ribière *et al.*, ont montré le développement d'une inflammation du tube digestif par le B[a]P avec des lésions plus prononcées au niveau iléal que colique. De plus une exposition au TCDF (famille des furanes) montre une forte déplétion des bactéries filamenteuses segmentées du microbiote iléal murin, déplétion non observée chez des souris mutées pour le gène du récepteur AhR (AhR^{-/-}) (Zhang et al., 2015b). Les bactéries filamenteuses segmentées stimulent les réponses du SI et protègent l'hôte des pathogènes, en partie par leur capacité à induire la production des Th17 dans la muqueuse intestinale (Schnupf et al., 2015, 2017). De plus, le métabolisme des xénobiotiques par les enzymes de l'hôte ayant principalement lieu au niveau du foie et de l'intestin grêle (Lu and Xie, 2017), des modifications importantes du microbiote iléal pourraient être induites par l'exposition aux polluants. Chez l'Homme, la principale limite à cette approche expérimentale serait la difficulté d'obtention d'échantillons iléaux impliquant une procédure invasive pour les patients.

Enfin, le microbiote intestinal de l'enfant peut être soumis à de fortes doses de contaminants chimiques par l'ingestion de sol contaminé (Calabrese et al., 1997; Lin et al., 2017; Neri et al., 2006). L'acquisition des communautés bactériennes a principalement lieu au cours de la naissance mais également durant l'enfance, en particulier durant les trois à cinq premières années de la vie (Cheng et al., 2015; Koenig et al., 2011; Rodríguez et al., 2015). Cette colonisation est influencée par plusieurs facteurs tels que le mode de délivrance, l'alimentation, l'administration d'antibiotiques ou encore potentiellement l'ingestion de polluants environnementaux. Dans ce cadre, des études d'exposition de polluants environnementaux retrouvés dans les sols chez l'enfant (HAPs, pesticides) permettraient de mettre en évidence des modifications structurales et fonctionnelles du microbiote d'une population sensible. D'autres populations à risque dans l'exposition aux contaminants environnementaux, tels que les pompiers, les agriculteurs, les opérateurs en industrie chimique et pétrochimique, ainsi que les fumeurs, pourraient notamment être incluses dans des études de cohortes pour l'exploration du microbiote intestinal. Parallèlement à l'étude structurale et fonctionnelle du microbiote fécal, des marqueurs sanguins de l'inflammation (*e.g.* protéine C réactive, cytokines pro-inflammatoires, hyperleucocytose et thrombocytose) et fécaux (*e.g.* calprotectine, lactoferrine), des marqueurs sanguins hépatiques (aspartate-

aminotransférase (ASAT), alanine-aminotransférase (ALAT)) et des marqueurs de la métabolisation des contaminants (métabolites urinaires hydroxylés) pourraient être analysés.

2. Outils pour l'étude de l'interaction polluant-microbiote intestinal

2.1. Etude de la structure des communautés microbiennes

Nos travaux n'ont pas pu mettre en évidence de perturbations de la structure du microbiote intestinal après une exposition aigüe au B[a]P. Ces résultats peuvent être dus à nos conditions expérimentales, comme évoqué précédemment dans la discussion, mais peuvent également être dus aux limites de l'approche de séquençage du gène exprimant l'ARNr 16S. L'identification des populations microbiennes est établie le plus généralement sur l'étude d'une portion du gène exprimant l'ARNr 16S, limitant souvent l'affiliation des séquences au niveau du genre voire de la famille, sans compter les biais liés à la technique PCR limitant la détection des taxa rares (Brooks et al., 2015; Gonzalez et al., 2012; Kanagawa, 2003). Neufeld *et al.*, ont mis en évidence que même avec des amorces spécifiquement déterminées pour cibler les membres rares des communautés bactériennes du sol, l'amplification par PCR pouvait échouer montrant ainsi la difficulté d'explorer ces taxa *via* le séquençage des amplicons du gène exprimant l'ARNr 16S (Neufeld et al., 2008). De plus, lorsque ces taxa rares sont amplifiés, ils peuvent ne pas être conservés lors des traitements bioinformatiques permettant d'éliminer les séquences chimériques générées par l'amplification PCR (Poretsky et al., 2014). Cependant, si les taxa constituant la biosphère rare sont présents en faible abondance, ils peuvent jouer un rôle écologique très important, notamment lorsque les écosystèmes microbiens sont soumis à des perturbations (Jousset et al., 2017; Preisner et al., 2016). En Avril 2010, l'explosion de la plateforme pétrolière Deepwater Horizon est la cause d'un déversement massif d'hydrocarbures dans le golfe du Mexique. Une augmentation rapide de l'abondance de taxa rares affiliés aux genres *Cycloclasticus*, *Colwellia* et à la famille des *Oceanospirillaceae*, a pu être mise en évidence soulignant l'importance des sous-populations spécialisées lors des rejets massifs d'hydrocarbures en haute mer (Kleindienst et al., 2016). Egalement, l'importance des capacités métaboliques de la biosphère rare a été mise en évidence dans la dégradation de contaminants organiques comme l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (substance active dans la composition d'herbicides) (Wang et al., 2017). Ce contaminant, normalement absent du microcosme et ajouté intentionnellement, a induit le développement d'organismes capables de le dégrader. Ces communautés, initialement non détectées par des approches de qPCR et de séquençage métagénomique (sous

le seuil limite de détection), ont présenté un pic d'abondance après la perturbation. Ceci souligne que certains taxa rares peuvent devenir abondants lorsque la ressource pour laquelle ils sont spécialisés devient disponible.

Récemment, une approche développée au sein du laboratoire, basée sur une méthode de capture de gènes en solution, permet l'enrichissement sélectif d'une région génomique spécifique (biomarqueur phylogénétique ou fonctionnel) tout en s'affranchissant des biais liés à l'utilisation de l'amplification PCR. Appliquée aux gènes exprimant les ARNr 16 et 18S, cette technique a montré un taux d'enrichissement supérieur à 90% (Gasc et al., 2016). De par cet enrichissement, cette approche permet ainsi l'identification des populations rares de l'environnement étudié, mais permet également une affiliation des séquences précises par la reconstruction complète du biomarqueur d'intérêt voire également de ses régions flanquantes (Denonfoux et al., 2013; Gasc et al., 2016). Cette approche, appliquée au gène exprimant l'ARNr 16S, est en cours de réalisation sur des échantillons de microbiote intestinal exposés au B[a]P. Si cette approche permet de mettre en évidence certaines espèces voire certaines souches bactériennes dont l'abondance augmente en présence du polluant, il pourrait être intéressant de mettre ces organismes en culture pour les isoler et caractériser leurs potentielles capacités de dégradation du contaminant. Cette approche d'isolement par la culture sera dépendante de la croissance, du maintien et du métabolisme des organismes ciblés en dehors du consortium microbien. En effet, la coopération entre les taxa est considérée comme essentielle au fonctionnement des communautés microbiennes dans de nombreux contextes, dont la nutrition, la communication par quorum sensing, la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques ou encore la pathogénicité (Porter and Martens, 2016; Rakoff-Nahoum et al., 2016).

Les études de la diversité du microbiote intestinal, basées sur le séquençage à haut débit, se sont concentrées presque exclusivement sur les communautés bactériennes. Pourtant, le tractus intestinal des mammifères abrite aussi des archées, des eucaryotes (protozoaires, champignons) et des virus. Bien que ce sujet n'ait été que peu exploré à ce jour, il a été démontré que les champignons de la muqueuse intestinale sont capables de moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives (Iliev et al., 2012; Rizzetto et al., 2014; Romani, 2011; Underhill and Iliev, 2014; Wheeler et al., 2016). Récemment, Wheeler *et al.* ont montré, en modèle murin à colite induite, qu'une dysbiose des communautés fongiques, induite par un traitement antifongique, résulte en une réponse immunitaire exacerbée chez l'hôte suggérant le rôle potentiellement protecteur des champignons dans l'homéostasie

immunitaire (Wheeler et al., 2016). Des altérations du mycobiote intestinal ont été associées à différentes pathologies allant des troubles métaboliques (obésité) aux adénomes colorectaux et aux maladies inflammatoires de l'intestin (Luan et al., 2015; Mar Rodríguez et al., 2015; Sokol et al., 2017). Certaines études mettent en évidence que les communautés fongiques semblent plus sensibles aux facteurs environnementaux et donc que leur population sont amenées à varier plus rapidement que les populations bactériennes (Dollive et al., 2013; Strati et al., 2016; Underhill and Iliev, 2014). Le rôle du mycobiote intestinal dans la santé est encore loin d'être appréhendé puisque les études menées jusqu'ici se sont principalement concentrées sur les taxa pathogènes. Néanmoins, le mycobiote des mammifères possède un large réservoir d'enzymes dégradant les polymères complexes et certaines levures ont été caractérisées comme ayant des propriétés probiotiques potentielles, ce qui suggère un rôle bénéfique de certains champignons pour la santé de l'hôte (Hatoum et al., 2012; Solomon et al., 2016).

Il a été montré que les champignons endogènes aux environnements pollués sont capables de dégrader un large panel de polluants dont des composés polyaromatiques souvent halogénés. Ces capacités de dégradation sont observées dans des environnements complexes tels que les sols, les sédiments, les boues et les eaux polluées (Ali et al., 2017; Godoy et al., 2016; Pacia et al., 2016; Zafra et al., 2017; Zafra and Cortés-Espinosa, 2015). Ainsi, de par la reconnaissance grandissante du rôle des communautés fongiques dans l'homéostasie intestinale et leurs capacités à dégrader des composés de nature très variée, il serait intéressant dans de futurs travaux de suivre l'impact de contaminants chimiques sur cette sous-population intestinale.

2.2. Etude des fonctions des communautés microbiennes

Les capacités fonctionnelles du microbiote sont principalement établies sur des approches à haut débit afin de comprendre les interactions métaboliques microbiennes établies au sein du microbiote ainsi que les interactions microbiote-hôte. La métagénomique est, à l'heure actuelle, l'approche majoritairement employée pour mettre en évidence les capacités métaboliques du microbiote intestinal (abondance relative des espèces et de leurs gènes) (Igai et al., 2016; Lloyd-Price et al., 2016; Montella et al., 2017; Zhernakova et al., 2016). Cependant, ces approches sont encore coûteuses et les analyses complexes, sans pouvoir pour

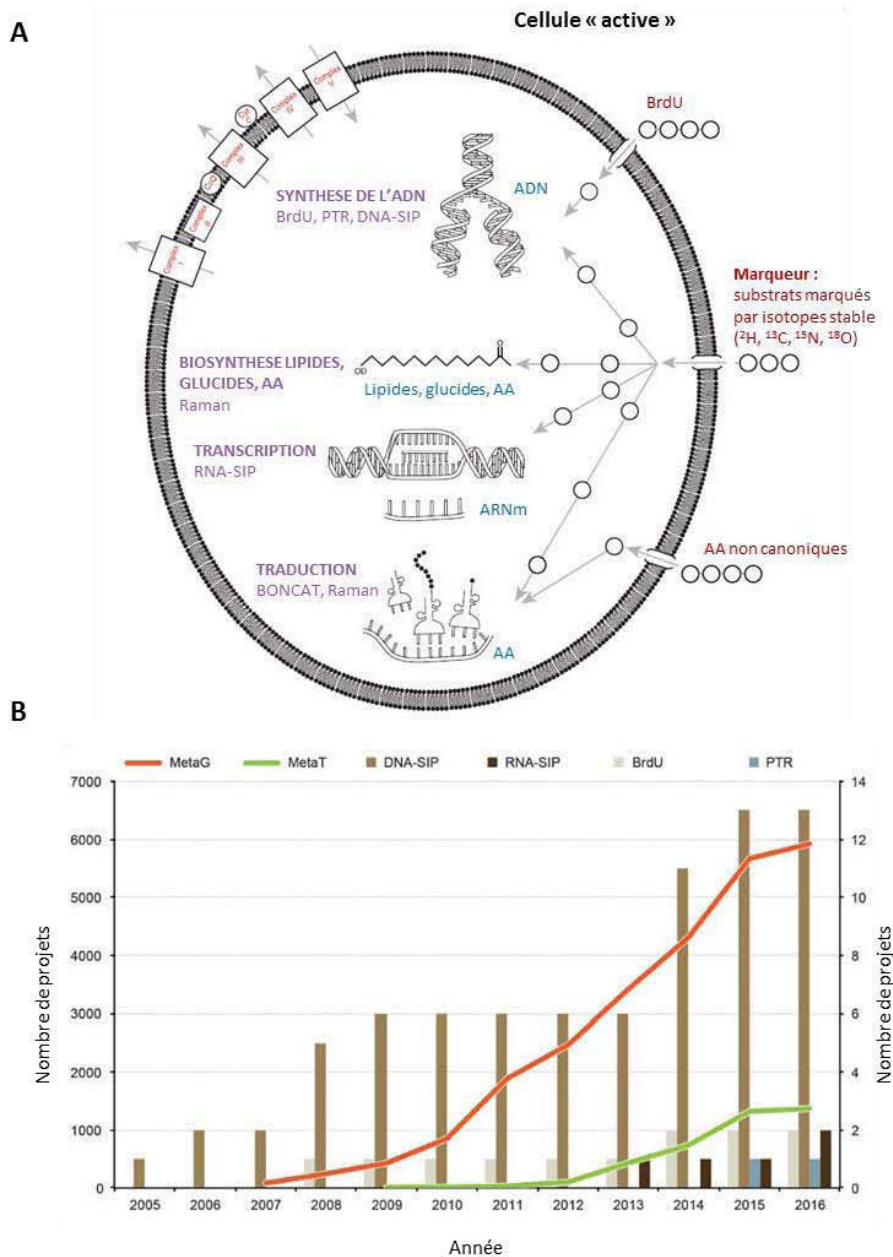


Figure 23 : A. Méthodes ciblant les processus cellulaires de cellules microbiennes « actives ». Substrats marqués (rouge), composants cellulaires (bleu), processus cellulaires (vert). BrdU : bromodésoxyuridine (nucléoside synthétique analogue structurel de la thymidine) ; AA : acide aminé ; PTR : peak-to-trough ratio (mesure quantitative du taux de croissance d'une espèce sous différentes conditions de croissance) ; BONCAT : bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (incorporation d'AA artificiels dans des protéines nouvellement synthétisées). B. Nombre de projets répertoriés par méthode d'analyse dans la dernière décennie. Les projets de métagénomique (MetaG) et métatranscriptomique (MetaT) sont représentés par des lignes (axe y primaire). Les projets impliquant des approches BrdU, DNA-SIP, RNA-SIP et PTR sont représentés par des histogrammes (axe y secondaire). Adaptée de Singer *et al.*, 2017.

autant accéder à la totalité des informations notamment pour les populations sous dominantes. Pour comprendre et prévoir les processus environnementaux ainsi que les organismes acteurs de ces processus, la distinction entre les cellules microbiennes actives, inactives et mortes est essentielle (Singer et al., 2017). Les approches de métatranscriptomique et de métabolomique deviennent de plus en plus accessibles et populaires dans l'étude du microbiote intestinal (Franzosa et al., 2014; Heinken and Thiele, 2015; Morgan and Huttenhower, 2014; Schaubeck et al., 2016; Yen et al., 2015). Ces dernières approches, d'un niveau hiérarchique plus élevé que les gènes présents dans les génomes, donnent une image hautement résolutive des interactions microbiote-hôte nécessaire à la compréhension du rôle du microbiote dans le métabolisme de l'hôte et des pathologies (Franzosa et al., 2015). D'autres approches, intégrant le marquage des composés cellulaires ont été conçues pour étudier l'activité microbienne *in situ* afin de capturer spécifiquement les membres actifs du microbiote dans l'environnement. Les méthodes de détection de l'activité microbienne *in situ* visent une variété de processus physiologiques pour déterminer l'état d'activité d'une cellule (**Figure 23**). Les approches de marquage isotopique dites stables « stable isotope probing » (SIP) permettent de cibler spécifiquement les microorganismes dégradant un composé d'intérêt. Après l'incubation d'un échantillon environnemental avec le substrat d'intérêt marqué, les acides nucléiques (ADN ou ARN) extraits sont soumis à une ultracentrifugation sur gradient de densité afin de les séparer. La purification des acides nucléiques marqués (plus lourds) permettra par la suite une caractérisation moléculaire de ces acides nucléiques cibles enrichis (*e.g.* biopuces, séquençage haut débit) (Fortunato and Huber, 2016; Pepe-Rannek et al., 2016) (**Figure 24**). Dans ce contexte, cette approche pourrait être développée en système *in vitro* pour mettre en évidence les taxa microbiens dégradant des contaminants chimiques marqués. La technique SIP a notamment été reportée pour l'étude des communautés microbiennes dégradant le B[a]P dans des sols de forêt. Les genres *Terrimonas* (Sphingobacteria) et *Burkholderia* (β -Proteobacteria) ont été identifiés comme les organismes clés de la dégradation de ce composé (Song et al., 2015). La mise en place de cinétiques de fermentation couplées au marquage isotopique permettrait de mettre en évidence les organismes primo-dégradants, des organismes bénéficiaires de cette dégradation utilisant les métabolites secondaires produits.

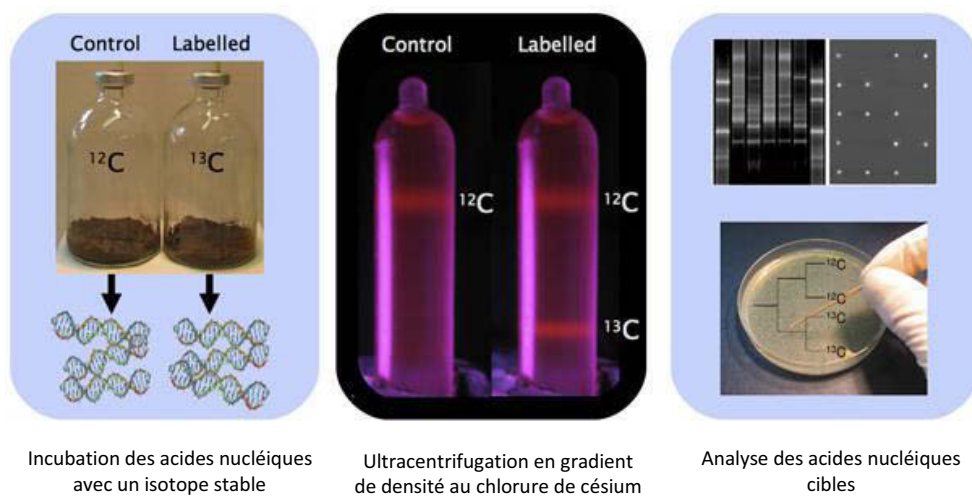


Figure 24 : Principe général de la méthode de marquage isotopique (SIP). Adaptée de Dunford and Neufeld, 2010.

3. Approches thérapeutiques

La toxicité des contaminants alimentaires est étroitement liée à leur biodisponibilité chez l'hôte et à leur interaction avec le microbiote intestinal. Ainsi, une élimination rapide des formes natives des polluants *via* les selles et les urines est une approche thérapeutique de détoxification à explorer. La nature de la matrice alimentaire par laquelle les contaminants sont ingérés peut jouer un rôle non négligeable sur la bioaccessibilité et ainsi la biodisponibilité de ces molécules. Notamment, plusieurs travaux ont mis en évidence le potentiel de séquestration des fibres alimentaires sur les polluants environnementaux réduisant leur absorption au niveau du tube digestif (Boki et al., 2007; Stavric and Klassen, 1994). En effet, la cellulose a montré réduire l'absorption intestinale du B[a]P chez le rat et des fibres solubles (pectine) et insolubles (cellulose) diminuent l'excrétion urinaire d'un métabolite du pyrène (HAP) indiquant une diminution du métabolisme du polluant par les enzymes de l'hôte (Boki et al., 2007; Viau et al., 2004). L'action potentiellement détoxifiante des fibres est également couplée à leur métabolisme par le microbiote intestinal qui résulte en la production de produits finaux de fermentation aux propriétés anti-oxydantes et/ou anti-inflammatoires.

Une autre approche thérapeutique à étudier pour la séquestration des composés chimiques sont les bactéries intestinales. En effet le genre *Lactobacillus* a déjà été reporté comme capable de séquestrer des métaux lourds (Kirillova et al., 2017; Monachese et al., 2012) mais également des contaminants chimiques organiques comme le B[a]P (Hongfei et al., 2013) ou certains pesticides (Trinder et al., 2016). Il est montré que cette séquestration est indépendante de l'activité bactérienne et il est proposé que les peptidoglycanes jouent un rôle important dans la liaison aux polluants (Hongfei et al., 2013; Trinder et al., 2016). Seuls les effets du genre *Lactobacillus* sur les contaminants alimentaires ont été reportés à ce jour dans la littérature. Il serait opportun de tester un panel de souches probiotiques afin de déterminer si cette séquestration est spécifique ou non à ce genre bactérien. Ainsi, les interactions fibre-polluant et *Lactobacillus* (probiotique)-polluant pourraient être étudiées en modèle murin afin de mettre en évidence les potentiels effets bénéfiques de ces deux approches de « détoxification thérapeutique » sur le microbiote intestinal et son hôte.

REFERENCES

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., and Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6, 237ra65.
- Abegunde, A. T., Muhammad, B. H., Bhatti, O., and Ali, T. (2016). Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World J. Gastroenterol.* 22, 6296–6317.
- Abram, F. (2015). Systems-based approaches to unravel multi-species microbial community functioning. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 24–32.
- Abramowicz, D. A. (1995). Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment. *Environ. Health Perspect.* 103, 97–99.
- Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., Schubert, A. M., Izard, J., Cantarel, B. L., et al. (2012). Metabolic Reconstruction for Metagenomic Data and Its Application to the Human Microbiome. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002358.
- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., and Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism – comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 11, 22.
- Adlerberth, I., Lindberg, E., Åberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I. L., et al. (2006). Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatr. Res.* 59, 96–101.
- Adnan, S., Nelson, J. W., Ajami, N. J., Venna, V. R., Petrosino, J. F., Bryan, R. M., et al. (2017). Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. *Physiol. Genomics* 49, 96–104.
- AFSSA (2005). Dioxines, furanes et PCB de type dioxine: Evaluation de l'exposition de la population française.
- AFSSA (2007). Avis relatif à l'établissement de teneurs maximales pertinentes en polychlorobiphényles qui ne sont pas de type dioxine (PCB «non dioxin-like», PCB-NDL) dans divers aliments.
- AGN (1930). Pollution of the air. *Can. Med. Assoc. J.* 22, 553–554.
- Ahlgren, C. (2014). Future Challenges to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- Ahn, M. Y., Filley, T. R., Jafvert, C. T., Nies, L., Hua, I., and Bezares-Cruz, J. (2006). Photodegradation of decabromodiphenyl ether adsorbed onto clay minerals, metal oxides, and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 215–220.
- Ainsworth, T. D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.-B., Zakrzewski, M., et al. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *ISME J.* 9, 2261–2274.
- Alaejos, M. S., and Afonso, A. M. (2011). Factors That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 52–108.
- Alam, M. A., Al-Jenoobi, F. I., and Al-Mohizea, A. M. (2012). Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 326–336.
- Ali, M. I., Khatoun, N., and Jamal, A. (2017). Polymeric pollutant biodegradation through microbial oxidoreductase; a better strategy to safe environment. *Int. J. Biol. Macromol.* S0141-8130, 30829–2.
- Allais, L., Kerckhof, F., Verschuere, S., Bracke, K. R., Smet, R. De, Laukens, D., et al. (2015). Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environ. Microbiol.* 18, 1352–1363.
- ANSES (2011a). Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1-Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines et phyto-estrogènes.
- ANSES (2011b). Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 2-Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- ANSES (2011c). Recherche d'insecticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle.

- ANSES (2012). Avis relatif aux analyses de retardateurs de flamme bromés (RFB) à mettre en oeuvre dans le cadre des prochains plans de surveillance.
- ANSES (2016). Avis relatif à l'actualisation de substances actives et produits biocides potentiellement intéressants pour une utilisation en lutte anti-vectorielle.
- Antoniou, E., Margonis, G. A., Angelou, A., Pikouli, A., Argiri, P., Karavokyros, I., et al. (2016). The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann. Med. Surg.* 11, 9–15.
- Arnich, N., Tard, A., Leblanc, J. C., Le Bizec, B., Narbonne, J. F., and Maximilien, R. (2009). Dietary intake of non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs) in France, impact of maximum levels in some foodstuffs. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54, 287–293.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683–691.
- Arrieta, M., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., and Finlay, B. (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front. Immunol.* 5, 427.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180.
- Astudillo-Garcia, C., Bell, J. J., Webster, N. S., Glasl, B., Jompa, J., Montoya, J. M., et al. (2017). Evaluating the core microbiota in complex communities: a systematic investigation. *Environ. Microbiol.* 19, 1450–1462.
- ATSDR (2014). Case studies in environmental medicine_Polychlorinated biphenyls (PCBs) toxicity.
- Ba, Q., Li, J., Huang, C., Qiu, H., Li, J., Chu, R., et al. (2015). Effects of Benzo[a]pyrene Exposure on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Angiogenesis, Metastasis, and NF- κ B Signaling. *Environ. Health Perspect.* 123, 246–254.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science (80-)*. 307, 1915–1920.
- Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *PNAS* 104, 979–984.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., et al. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 17, 690–703.
- Bahrami, B., Child, M. W., Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2011). Adherence and Cytokine Induction in Caco-2 Cells by Bacterial Populations from a Three-Stage Continuous-Culture Model of the Large Intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2934–2942.
- Baird, W. M., Hooven, L. a, and Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–14. doi:10.1002/em.20095.
- Balvočiūtė, M., and Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics* 18, 114.
- Bao, G., Wang, M., Doak, T. G., and Ye, Y. (2015). Strand-specific community RNA-seq reveals prevalent and dynamic antisense transcription in human gut microbiota. *Front. Microbiol.* 6, 896.
- Barghi, M., Shin, E.-S., Son, M.-H., Choi, S.-D., Pyo, H., and Chang, Y.-S. (2016). Hexabromocyclododecane (HBCD) in the Korean food basket and estimation of dietary exposure. *Environ. Pollut.* 213, 268–277.
- Bartfeld, S. (2016). Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev. Biol.* 420, 262–270.
- Bäumler, A. J., and Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 535, 85–93.

- Bekkering, P., Jafri, I., van Overveld, F. J., and Rijkers, G. T. (2013). The intricate association between gut microbiota and development of type 1, type 2 and type 3 diabetes. *Expert Rev Clin Immunol* 9, 1031–1041.
- Belzer, C., Chia, L. W., Aalvink, S., Chamlagain, B., Piironen, V., Knol, J., et al. (2017). Microbial Metabolic Networks at the Mucus Layer Lead to Diet-Independent Butyrate and Vitamin B 12 Production by Intestinal Symbionts. *MBio* 8, e00770-17.
- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z. A., Boziki, M., Johner, C., et al. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541.
- Bernalier-Donadille, A. (2010). Activités métaboliques du microbiote intestinal humain. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34, 17–23.
- Berner, A. Z., Fuentes, S., Dostal, A., Payne, A. N., Gutierrez, P. V., Chassard, C., et al. (2013). Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for Controlled Ecological Studies: Validation and Effect of pH. *PLoS One* 8, e77772.
- Bernhard, A., Berntssen, M. H. G., Lundebye, A.-K., Alvheim, A. R., Myrmet, L. S., Fjaere, E., et al. (2016). Marine fatty acids aggravate hepatotoxicity of alpha-HBCD in juvenile female BALB/c mice. *Food Chem. Toxicol.* 97, 411–423.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., and Welling, G. W. (2011). Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe* 17, 478–482.
- Bhatt, P., Kumar, M. S., Mudliar, S., and Chakrabarti, T. (2007). Biodegradation of Chlorinated Compounds—A Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 165–198.
- Biedermann, L., and Rogler, G. (2015). The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur. J. Pediatr.* 174, 151–167.
- Bishehsari, F., Mahdavinia, M., Vacca, M., Malekzadeh, R., and Mariani-Costantini, R. (2014). Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World J. Gastroenterol.* 20, 6055–6072.
- Blanquet, S., Marol-Bonin, S., Beyssac, E., Pompon, D., Renaud, M., and Alric, M. (2001). The “biodrug” concept: An innovative approach to therapy. *Trends Biotechnol.* 19, 393–400.
- Blaser, M., Bork, P., Fraser, C., Knight, R., and Wang, J. (2013). The microbiome explored: recent insights and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 213–7. doi:10.1038/nrmicro2973.
- Blazewicz, S. J., Barnard, R. L., Daly, R. A., and Firestone, M. K. (2013). Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J.* 7, 2061–2068.
- Bodilis, J., Nsigue-Meilo, S., Besaury, L., and Quillet, L. (2012). Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS One* 7, e35647.
- Boki, K., Kadota, S., Takahashi, M., and Kitakouji, M. (2007). Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Insoluble Dietary Fiber. *J. Heal. Sci.* 53, 99–106.
- Bonfili, L., Cecarini, V., Berardi, S., Scarpona, S., Suchodolski, J. S., Nasuti, C., et al. (2017). Microbiota modulation counteracts Alzheimer’s disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. *Sci. Rep.* 7, 2426.
- Boogaard, P. J. (2008). Urinary biomarkers in the risk assessment of PAHs. *Occup. Environ. Med.* 65, 221–222. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349155>.
- Boots, A. W., Bos, L. D., van der Schee, M. P., van Schooten, F. J., and Sterk, P. J. (2015). Exhaled Molecular Fingerprinting in Diagnosis and Monitoring: Validating Volatile Promises. *Trends Mol. Med.* 21, 633–644.
- Borja, J., Taleon, D. M., Auresenia, J., and Gallardo, S. (2005). Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochem.* 40, 1999–2013.

- Borrel, G., McCann, A., Deane, J., Neto, M. C., Lynch, D. B., Brugère, J.-F., et al. (2017). Genomics and metagenomics of trimethylamine-utilizing Archaea in the human gut microbiome. *ISME J.* 11, 2059–2074.
- Boureau, H., Hartmann, L., Karjalainen, T., Rowland, I., and Wilkinson, M. H. F. (2000). Models to Study Colonisation and Colonisation Resistance. *Microbiol. Ecol. Heal. Dis.* 12, 247–258.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., et al. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.* 6, 263ra158.
- Breton, J., Massart, S., Vandamme, P., De Brandt, E., Pot, B., and Foligné, B. (2013). Ecotoxicology inside the gut: impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 14, 62.
- Brim, H., Yooseph, S., Zoetendal, E. G., Lee, E., Torralbo, M., Laiyemo, A. O., et al. (2013). Microbiome analysis of stool samples from African Americans with colon polyps. *PLoS One* 8, e81352.
- Brooks, J. P., Edwards, D. J., Harwich, M. D., Rivera, M. C., Fettweis, J. M., Serrano, M. G., et al. (2015). The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol.* 15, 66.
- Brugère, J.-F., Borrel, G., Gaci, N., Tottey, W., O'Toole, P. W., and Malpuech-Brugère, C. (2014). Archaeobiotics: Proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes* 5, 5–10.
- Buekens, A., Stieglitz, L., Hell, K., Huang, H., and Segers, P. (2001). Dioxins from thermal and metallurgical processes: Recent studies for the iron and steel industry. *Chemosphere* 42, 729–735.
- Bunge, M., Ballerstedt, H., and Lechner, U. (2001). Regiospecific dechlorination of spiked tetra- and trichlorodibenzo- p -dioxins by anaerobic bacteria from PCDD/F-contaminated Spittelwasser sediments. *Chemosphere* 43, 675–681.
- Buttó, L. F., and Haller, D. (2017). Functional relevance of microbiome signatures: The correlation era requires tools for consolidation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1092–1098.
- Calabrese, E. J., Stanek, E. J., Pekow, P., and Barnes, R. M. (1997). Soil Ingestion Estimates for Children Residing on a Superfund Site. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 258–268.
- Candela, M., Turrone, S., Biagi, E., Carbonero, F., Rampelli, S., Fiorentini, C., et al. (2014). Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. *World J. Gastroenterol.* 20, 908–922.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., and Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26191.
- Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., and Ringel, Y. (2012). Alterations in Composition and Diversity of the Intestinal Microbiota in Patients with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 6, 521-e248.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., and Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol* 104, 1199–1216.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., et al. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519, 92–96.
- Chauhan, A. J., and Johnston, S. L. (2003). Air pollution and infection in respiratory illness. *Br. Med. Bull.* 68, 95–112.
- Chen, J., Chia, N., Kalari, K. R., Yao, J. Z., Novotna, M., Soldan, M. M. P., et al. (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 6, 28484.
- Chen, S., Lai, K., Li, Y., Hu, M., Zhang, Y., and Zeng, Y. (2011). Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1471–1483.

- Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., and Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 7, e39743.
- Chen, Y.-L., Fang, J.-H., Lai, M.-D., and Shan, Y.-S. (2008). Depletion of CD4 + CD25 + regulatory T cells can promote local immunity to suppress tumor growth in benzo[a]pyrene-induced forestomach carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 14, 5797. doi:10.3748/wjg.14.5797.
- Cheng, J., Ringel-Kulka, T., Heikamp-de Jong, I., Ringel, Y., Carroll, I., de Vos, W. M., et al. (2015). Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME J.* 10, 1002–1014.
- Cheng, J., Ringel-Kulka, T., Heikamp-de Jong, I., Ringel, Y., Carroll, I., de Vos, W. M., et al. (2016). Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME J.* 10, 1002–1014.
- Chiavarini, M., Bertarelli, G., Minelli, L., and Fabiani, R. (2017). Dietary Intake of Meat Cooking-Related Mutagens (HCAs) and Risk of Colorectal Adenoma and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 9, E514.
- Chiu, Y.-H., Lu, Y.-C., Ou, C.-C., Lin, S.-L., Tsai, C.-C., Huang, C.-T., et al. (2013). Lactobacillus plantarum MYL26 induces endotoxin tolerance phenotype in Caco-2 cells. *BMC Microbiol.* 13, 190.
- Chmill, S., Kadow, S., Winter, M., Weighardt, H., and Esser, C. (2010). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin Impairs Stable Establishment of Oral Tolerance in Mice. *Toxicol. Sci.* 118, 98–107.
- Choi, J. J., Eum, S. Y., Rampersaud, E., Daunert, S., Abreu, M. T., and Toborek, M. (2013). Exercise Attenuates PCB-Induced Changes in the Mouse Gut Microbiome. 121, 725–730.
- Choudhary, S., Sood, S., Donnell, R. L., and Wang, H. C. R. (2012). Intervention of human breast cell carcinogenesis chronically induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 33, 876–885.
- Chow, J., Tang, H., and Mazmanian, S. K. (2011). Pathobionts of the Gastrointestinal Microbiota and Inflammatory Disease. *Curr Opin Immunol* 23, 473–480.
- Chung, H., Pamp, S. J., Hill, J. A., Surana, N. K., Sanna, M., Troy, E. B., et al. (2012). Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *Cell* 149, 1578–1593.
- Chung, W. S. F., Walker, A. W., Louis, P., Parkhill, J., Vermeiren, J., Bosscher, D., et al. (2016). Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* 14, 3.
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'Connor, E. M., Cusack, S., et al. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488, 178–184.
- Claesson, M. J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., et al. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 4, e6669.
- Clarke, L. L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1151–G1166.
- Claus, S. P., Guillou, H., and Ellero-Simatos, S. (2016). The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *Nat. Publ. Gr. Biofilms Microbiomes* 2, 16003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.3>.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* 148, 1258–1270.
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., and 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.
- Collins, C. D., Craggs, M., Garcia-Alcega, S., Kademoglou, K., and Lowe, S. (2015). Towards a unified approach for the determination of the bioaccessibility of organic pollutants. *Environ. Int.* 78, 24–31.

- Colpitts, S. L., Kasper, E. J., Keever, A., Liljenberg, C., Kirby, T., Magori, K., et al. (2017). A bidirectional association between the gut microbiota and CNS disease in a biphasic murine model of multiple sclerosis. *Gut Microbes* 976, 1–13.
- Conlon, M. A., and Bird, A. R. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* 7, 17–44.
- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J. M., and Relman, D. A. (2012). The application of ecological theory towards an understanding of the human microbiome. *Science (80-.)*. 336, 1255–1262.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *PNAS* 107, 11537–11542.
- Culp, S. J., Gaylor, D. W., Sheldon, W. G., Goldstein, L. S., and Beland, F. a (1998). A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis* 19, 117–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472702>.
- Darfeuille-Michaud, A. (2002). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 185–193.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563.
- De Angelis, M., Francavilla, R., Piccolo, M., De Giacomo, A., and Gobetti, M. (2015). Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* 6, 207–213.
- de Goffau, M. C., Fuentes, S., Van Den Bogert, B., Honkanen, H., De Vos, W. M., Welling, G. W., et al. (2014). Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia* 57, 1569–1577.
- De Preter, V., Joossens, M., Ballet, V., Shkedy, Z., and Rutgeerts, P. (2013). Metabolic Profiling of the Impact of Oligofructose- Enriched Inulin in Crohn's Disease Patients: A Double-Blinded Randomized Controlled Trial. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 4, e30. doi:10.1038/ctg.2012.24.
- De Preter, V., Machiels, K., Joossens, M., Arijis, I., Matthys, C., Vermeire, S., et al. (2015). Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut* 64, 447–458.
- Déat, E., Blanquet-Diot, S., Jarrige, J.-F., Denis, S., Beyssac, E., and Alric, M. (2009). Combining the dynamic TNO-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model: application to the assessment of lycopene and alpha-tocopherol bioavailability from a whole food. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11314–11320.
- De Weirdt, R., and Van de Wiele, T. (2015). Micromanagement in the gut: microenvironmental factors govern colon mucosal biofilm structure and functionality. *Biofilms and Microbiomes* 1, 15026.
- Defois, C., Ratel, J., Denis, S., Batut, B., Beugnot, R., Peyretailade, E., et al. (2017). Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Volatile Metabolome and Transcriptome of the Human Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* 8, 1562.
- Dejea, C. M., Wick, E. C., Hechenbleikner, E. M., White, J. R., Mark Welch, J. L., Rossetti, B. J., et al. (2014). Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *PNAS* 111, 18321–18326.
- Denis, S., Sayd, T., Georges, A., Chambon, C., Chalancon, S., Santé-Lhoutellier, V., et al. (2016). Digestion of cooked meat proteins is slightly affected by age as assessed using the dynamic gastrointestinal TIM model and mass spectrometry. *Food Funct.* 7, 2682–2691.
- Denison, M. S., and Nagy, S. R. (2003). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M., and Pfeifer, G. P. (1996). Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53. *Science (80-.)*. 274, 430–432.

- Denonfoux, J., Parisot, N., Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Boucher, D., Morgavi, D. P., et al. (2013). Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA Res.* 20, 185–196.
- DiGiulio, D. B. (2012). Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 17, 2–11.
- Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2013). Melancholic microbes: A link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 713–719.
- DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., et al. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci.* 115, 89–97.
- Dollive, S., Chen, Y.-Y., Grunberg, S., Bittinger, K., Hoffmann, C., Vandivier, L., et al. (2013). Fungi of the Murine Gut: Episodic Variation and Proliferation during Antibiotic Treatment. *PLoS One* 8, e71806.
- Domingo, J. L. (2017). Concentrations of environmental organic contaminants in meat and meat products and human dietary exposure: A review. *Food Chem. Toxicol.* 107, 20–26.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., et al. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS* 107, 11971–11975.
- Donaldson, G. P., Lee, M. S., and Mazmanian, S. K. (2015). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 20–32.
- Douben, P. E. . (2003). *PAHs: An Ecotoxicological Perspective.* , ed. John Wiley & Sons Ltd.
- Dragan, Y. P., and Schrenk, D. (2000). Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Addit. Contam.* 17, 289–302.
- Du, M., Fang, C., Qiu, L., Dong, S., Zhang, X., and Yan, C. (2015). Diastereoisomer-specific effects of hexabromocyclododecanes on hepatic aryl hydrocarbon receptors and cytochrome P450s in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 132, 24–31.
- Dugat-Bony, E., Peyretailade, E., Parisot, N., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., Hill, D., et al. (2012). Detecting unknown sequences with DNA microarrays: Explorative probe design strategies. *Environ. Microbiol.* 14, 356–371.
- Dunford, E. A., and Neufeld, J. D. (2010). DNA stable-isotope probing. *J. Vis. Exp.* 2, 2027.
- Durbán, A., Abellán, J. J., Jiménez-Hernández, N., Artacho, A., Garrigues, V., Ortiz, V., et al. (2013). Instability of the faecal microbiota in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86, 581–589.
- Durbán, A., Abellán, J. J., Jiménez-Hernández, N., Latorre, A., and Moya, A. (2012). Daily follow-up of bacterial communities in the human gut reveals stable composition and host-specific patterns of interaction. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 427–437.
- Eain, M. M. G., Baginska, J., Greenhalgh, K., Fritz, J. V., Zenhausern, F., and Wilmes, P. (2017). Engineering Solutions for Representative Models of the Gastrointestinal Human-Microbe Interface. *Engineering* 3, 60–65.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Sargent, M., Gill, S. R., et al. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (80-)*. 308, 1635–1638.
- EFSA (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *EFSA J.* 724, 1–114.
- EFSA (2009). Potential developmental neurotoxicity of deltamethrin. *EFSA J.* 921, 1–34.
- EFSA (2010). Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA J.* 8, 1701.
- EFSA (2011). Scientific Opinion on Hexabromocyclododecanes (HBCDDs) in Food. *EFSA J.* 9, 2296.

- EFSA (2012a). Risk assessment of contaminants in food and feed. *EFSA J.* 10, s1004.
- EFSA (2012b). Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. *EFSA J.* 10, 2832–2914.
- EFSA (2015). Scientific statement on the health-based guidance values for dioxins and dioxin-like PCBs. *EFSA J.* 13, 4124. doi:10.2903/j.efsa.2015.4124.
- EFSA (2017). The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 15, 4791.
- El-Kattan, A., and Varma, M. (2012). “Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability,” in *Topics on Drug Metabolism*.
- Ema, M., Fujii, S., Hirata-Koizumi, M., and Matsumoto, M. (2008). Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod. Toxicol.* 25, 335–351.
- Emwas, A. (2015). *The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research*.
- Engel, E., Meurillon, M., Planche, C., and Peyret, P. (2014). Devenir des contaminants toxiques des aliments dans l’environnement digestif. *Innov. Agron.* 36, 135–149.
- Esser, C., and Rannug, A. (2015). The Aryl Hydrocarbon Receptor in Barrier Organ Physiology, Immunology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* 67, 259–279.
- Ewa, B., and Danuta, M.-Š. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.* doi:10.1007/s13353-016-0380-3.
- Faith, J. J., McNulty, N. P., Rey, F. E., and Gordon, J. I. (2011). Predicting a human gut microbiota’s response to diet in gnotobiotic mice. *Science (80-.)*. 333, 101–104.
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., et al. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science (80-.)*. 352, 560–564.
- Fang, H., Kang, J., and Zhang, D. (2017). Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microb. Cell Fact.* 16, 15.
- FAO, and WHO (2002). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43258/1/WHO_TRS_930_eng.pdf.
- Faroon, O., and Ruiz, P. (2015). Polychlorinated biphenyls: New evidence from the last decade. *Toxicol Ind Heal.* 2, pii: 0748233715587849.
- Farup, P. G., Rudi, K., and Hestad, K. (2016). Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome? *BMC Gastroenterol.* 16, 51.
- Fekry, M. I., Engels, C., Zhang, J., Schwab, C., Lacroix, C., Sturla, S. J., et al. (2016). The strict anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP). *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 201–209.
- Feldbauer, R., Schulz, F., Horn, M., and Rattei, T. (2015). Prediction of microbial phenotypes based on comparative genomics. *BMC Bioinformatics* 16, S1.
- Feria-Gervasio, D., Denis, S., Alric, M., and Brugère, J. F. (2011). In vitro maintenance of a human proximal colon microbiota using the continuous fermentation system P-ECSIM. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1425–1433.
- Feria-Gervasio, D., Tottey, W., Gaci, N., Alric, M., Cardot, J.-M., Peyret, P., et al. (2014). Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobiosis to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *J. Microbiol. Methods* 96, 111–118.
- Ferreira, C. M., Vieira, A. T., Vinolo, M. A. R., Oliveira, F. A., Curi, R., and Dos Santos Martins, F. (2014). The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases. *J. Immunol. Res.* 2014, 689492.

- Ferreira, J. A., Wu, K. J., Hryckowian, A. J., Bouley, D. M., Weimer, B. C., and Sonnenburg, J. L. (2014). Gut Microbiota-Produced Succinate Promotes *C. difficile* Infection after Antibiotic Treatment or Motility Disturbance. *Cell Host Microbe* 16, 770–777.
- Finegold, S. M., Dowd, S. E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K. E., Wolcott, R. D., et al. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16, 444–453.
- Flaveny, C. A., and Perdew, G. H. (2009). Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Mol. Cell. Pharmacol.* 1, 119–123.
- Flemer, B., Lynch, D. B., Brown, J. M. R., Jeffery, I. B., Ryan, F. J., Claesson, M. J., et al. (2016). Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut* 66, 633–643.
- Fleury, S., Rivière, G., Allès, B., Kesse-Guyot, E., Méjean, C., Hercberg, S., et al. (2017). Exposure to contaminants and nutritional intakes in a French vegetarian population. *Food Chem. Toxicol.*, pii: S0278-6915(17)30430-1.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 3, 289–306.
- Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., et al. (2015). Disentangling the effects of type 2 diabetes and metformin on the human gut microbiota. *Nature* 528, 262–266.
- Fortunato, C. S., and Huber, J. A. (2016). Coupled RNA-SIP and metatranscriptomics of active chemolithoautotrophic communities at a deep-sea hydrothermal vent. *ISME J.* 10, 1925–1938.
- Fraher, M. H., O’Toole, P. W., and Quigley, E. M. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 312–322.
- Frank, D. N., Robertson, C. E., Hamm, C. M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., et al. (2011). Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 179–184.
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., and Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *PNAS* 104, 13780–13785.
- Franzosa, E. A., Hsu, T., Sirota-madi, A., Shafquat, A., Abu-, G., Morgan, X. C., et al. (2015). Sequencing and beyond: integrating molecular ‘omics for microbial community profiling. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 360–372.
- Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., et al. (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *PNAS* 111, E2329-38.
- Fritz, J. V., Desai, M. S., Shah, P., Schneider, J. G., and Wilmes, P. (2013). From meta-omics to causality: experimental models for human microbiome research. *Microbiome* 1, 1–15.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732.
- Fujimura, K. E., and Lynch, S. V (2015). Microbiota in Allergy and Asthma and the Emerging Relationship with the Gut Microbiome. *Cell Host Microbe* 17, 592–602.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., et al. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543–547.
- Funkhouser, L. J., and Bordenstein, S. R. (2013). Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biol.* 11, e1001631.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. a, Nakato, G., Takahashi, D., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450.

- Gaci, N., Chaudhary, P. P., Tottey, W., Alric, M., and Brugère, J.-F. (2017). Functional amplification and preservation of human gut microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* 28, 1308070. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28572754><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5443092>.
- Gähns, M., Roos, R., Andersson, P. L., and Schrenk, D. (2013). Role of the nuclear xenobiotic receptors CAR and PXR in induction of cytochromes P450 by non-dioxinlike polychlorinated biphenyls in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 77–85.
- Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallée, A., Maura, D., Neut, C., et al. (2017). Bacteriophages targeting adherent invasive Escherichia coli strains as a promising new treatment for Crohn's disease. *J. Crohns. Colitis* jvw224, 840–847.
- Garrait, G., Jarrige, J.-F., Blanquet, S., Beyssac, E., Cardot, J.-M., and Alric, M. (2006). Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and p-coumaric acids in rats. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2944–2950.
- Gasc, C., Peyretailade, E., and Peyret, P. (2016). Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms. *Nucleic Acids Res.* 44, 4504–4518.
- Gasc, C., Ribièrè, C., Parisot, N., Beugnot, R., Defois, C., Petit-Biderre, C., et al. (2015). Capturing prokaryotic dark matter genomes. *Res. Microbiol.* 166, 814–830.
- Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M., Boussekine, S., Salmi, A., Toualbia, N., et al. (2017). Effects of Deltamethrin on striatum and hippocampus mitochondrial integrity and the protective role of Quercetin in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 16440–16457.
- Gazouli, M., Wouters, M. M., Kapur-Pojnskić, L., Bengtson, M.-B., Friedman, E., Nikčević, G., et al. (2016). Lessons learned — resolving the enigma of genetic factors in IBS. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 77–87.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., and Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* (80-.). 352, 539–544.
- Germer, S., Piersma, A. H., van Der Ven, L., Kamyschnikow, A., Fery, Y., Schmitz, H. J., et al. (2006). Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome P450 levels in rats. *Toxicology* 218, 229–236.
- Gevers, D., Knight, R., Petrosino, J. F., Huang, K., McGuire, A. L., Birren, B. W., et al. (2012). The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome. *PLoS Biol.* 10, e1001377.
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., et al. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 15, 382–392.
- Giancchetti, E., and Fierabracci, A. (2017). On the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus: the role of microbiota. *Immunol. Res.* 65, 242–256.
- Giannoukos, G., Ciulla, D. M., Huang, K., Haas, B. J., Izard, J., Levin, J. Z., et al. (2012). Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol.* 13, R23.
- Gibis, M. (2016). Heterocyclic Aromatic Amines in Cooked Meat Products: Causes, Formation, Occurrence, and Risk Assessment. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 269–302.
- Gibson, P. R., Varney, J., Malakar, S., and Muir, J. G. (2015). Food Components and Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 148, 1158–1174.
- Godoy, P., Reina, R., Calderón, A., Wittich, R. M., García-Romera, I., and Aranda, E. (2016). Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 20985–20996.

- Gomez-Guzman, M., Toral, M., Romero, M., Jimenez, R., Galindo, P., Sanchez, M., et al. (2015). Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Nutr. Food Res* 59, 2326–2336.
- Gong, D., Gong, X., Wang, L., Yu, X., and Dong, Q. (2016). Involvement of Reduced Microbial Diversity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2016, 6951091.
- González-Barbosa, E., Mejía-García, A., Bautista, E., Gonzalez, F. J., Segovia, J., and Elizondo, G. (2017). TCDD induces UbcH7 expression and synphilin-1 protein degradation in the mouse ventral midbrain. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, e21947.
- Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Belda-Ferre, P., and Mira, A. (2012). Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One* 7, e29973.
- Goodman, A. L., Kallstrom, G., Faith, J. J., Reyes, A., Moore, A., Dantas, G., et al. (2011). Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *PNAS* 108, 6252–6257.
- Goodrich, J., Waters, J., Poole, A., Sutter, J., Koren, O., Blekhman, R., et al. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159, 789–799.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., and McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* 17, 333–351.
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P., and Huse, S. M. (2016). Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome* 4, 15.
- Gosalbes, M. J., Durbán, A., Pignatelli, M., Abellan, J. J., Jiménez-Hernández, N., Pérez-Cobas, A. E., et al. (2011). Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS One* 6, e17447.
- Gradmann, C. (2014). A spirit of scientific rigour: Koch's postulates in twentieth-century medicine. *Microbes Infect.* 16, 885–892.
- Grant, A. J., Woodward, J., and Maskell, D. J. (2006). Development of an ex vivo organ culture model using human gastro-intestinal tissue and *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 240–243.
- Griggs, A. M., Agim, Z. S., Mishra, V. R., Tambe, M. A., Director-Myska, A. E., Turteltaub, K. W., et al. (2014). 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) is selectively toxic to primary dopaminergic neurons In Vitro. *Toxicol. Sci.* 140, 179–189.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., and Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol.* 30, 591–600.
- Guo, J., Xu, Y., Ji, W., Song, L., Dai, C., and Zhan, L. (2015). Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling. *Toxicol. Lett.* 234, 201–210.
- Hall, A. B., Tolonen, A. C., and Xavier, R. J. (2017). Human genetic variation and the gut microbiome in disease. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg.2017.63.
- Han, M., Liu, X., Liu, S., Su, G., Fan, X., Chen, J., et al. (2017). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis in C57BL6 mouse via activating Akt and NF-κB signaling pathways. *Toxicol. Lett.* 273, 10–19.
- Hansen, R., Scott, K. P., Khan, S., Martin, J. C., Berry, S. H., Stevenson, M., et al. (2015). First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLoS One* 10, e0133320.
- Hapfelmeier, S., Lawson, M. A. E., Slack, E., Kirundi, J. K., Stoel, M., Heikenwalder, M., et al. (2010). Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science (80-.)*. 328, 1705–1709.

- Harper, P. A., Golas, C. L., and Okey, A. B. (1988). Characterization of the Ah Receptor and Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Benz(a)anthracene in the Human A431 Squamous Cell Carcinoma Line. *Cancer Res.* 48, 2388–2395.
- Hatanaka, M., Nakamura, Y., Maathuis, A. J. H., Venema, K., Murota, I., and Yamamoto, N. (2012). Influence of *Bacillus subtilis* C-3102 on microbiota in a dynamic in vitro model of the gastrointestinal tract simulating human conditions. *Benef. Microbes* 3, 229–236.
- Hatoum, R., Labrie, S., and Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Front. Microbiol.* 3, 421.
- He, S., Wurtzel, O., Singh, K., Froula, J. L., Yilmaz, S., Tringe, S. G., et al. (2010). Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. *Nat. Methods* 7, 807–812.
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., et al. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *PNAS* 108, 3047–3052.
- Heikkilä, M. P., and Saris, P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* 95, 471–478.
- Heinken, A., and Thiele, I. (2015). Anoxic conditions promote species-specific mutualism between gut microbes In Silico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4049–4061.
- Heinritz, S. N., Weiss, E., Eklund, M., Aumiller, T., Heyer, C. M. E., Messner, S., et al. (2016). Impact of a high-fat or high-fiber diet on intestinal microbiota and metabolic markers in a pig model. *Nutrients* 8, E317.
- Hill, D. A., Siracusa, M. C., Abt, M. C., Kim, B. S., Kobuley, D., Kubo, M., et al. (2012). Commensal bacterial-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nat Med* 18, 538–546.
- HMP (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–14. Available at: abstract [Accessed May 23, 2014].
- Hoban, A. E., Stilling, R. M., Ryan, F. J., Shanahan, F., Dinan, T. G., Claesson, M. J., et al. (2016). Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Transl Psychiatry* 6, e774.
- Hodkinson, B. P., and Grice, E. A. (2015). Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Adv. wound care* 4, 50–58.
- Holman, D. B., Brunelle, B. W., Trachsel, J., and Allen, H. K. (2017). Meta-analysis To Define a Core Microbiota in the Swine Gut. *mSystems* 2, e00004-17.
- Hongfei, Z., Fang, Z., Yejiang, Q., Dziugan, P., Fengling, B., Walczak, P., et al. (2013). Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to bind Benzo(a)pyrene and the mechanism of the process. *FOOD Chem. Toxicol.* 59, 67–71.
- Hornig, M. (2013). The role of microbes and autoimmunity in the pathogenesis of neuropsychiatric illness. *Curr. Opin. Rheumatol.* 25, 488–795.
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., Mccue, T., et al. (2013). The microbiota modulates gut physiology and behavioural abnormalities associated with autism. *Cell* 155, 1451–1463.
- Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., et al. (2013). Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat. Commun.* 4, 2151.
- Huang, X., Chen, C., Shang, Y., Zhong, Y., Ren, G., Yu, Z., et al. (2016). In vitro study on the biotransformation and cytotoxicity of three hexabromocyclododecane diastereoisomers in liver cells. *Chemosphere* 161, 251–258.
- Huang, Y. L., Chassard, C., Hausmann, M., von Itzstein, M., and Hennet, T. (2015). Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. *Nat. Commun.* 6, 8141.

- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Lahoti, T. S., Gowda, K., Amin, S. G., et al. (2015). Adaptation of the human aryl hydrocarbon receptor to sense microbiota-derived indoles. *Sci. Rep.* 5, 12689.
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., Bisson, W. H., Sullivan, A. P., Perry, G. H., Jablonski, N. G., et al. (2016). Divergent Ah receptor ligand selectivity during hominin evolution. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2648–2658.
- Hudson, A. C., Myers, J. N., Niaz, M. S., Washington, M. K., and Ramesh, A. (2013). Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced colon polyps in ApcMin mice by resveratrol. *J. Nutr. Biochem.* 24, 713–724.
- Huson, D. H., Beier, S., Flade, I., Gorska, A., El-Hadidi, M., Mitra, S., et al. (2016). MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Comput. Biol.* 12, e1004957.
- Huson, D. H., and Weber, N. (2013). *Microbial community analysis using MEGAN*. 1st ed. Elsevier Inc.
- IARC (2012a). BENZO[a]PYRENE.
- IARC (2012b). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Volume 100F-27.
- Igai, K., Itakura, M., Nishijima, S., Tsurumaru, H., Suda, W., Tsutaya, T., et al. (2016). Nitrogen fixation and nifH diversity in human gut microbiota. *Sci. Rep.* 6, 31942.
- Iliev, I. D., Funari, V. A., Taylor, K. D., Nguyen, Q., Reyes, C. N., Strom, S. P., et al. (2012). Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science (80-)*. 336, 1314–1317.
- INERIS (2006). Dioxines-Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- INRS (2007). Deltaméthrine_Fiche toxicologique. Available at: www.inrs.fr/fichetox/02/2016.
- Jacob, A., Tomkiewicz-Raulet, C., Jamet, C., Bendayan, R., Massicot, F., Coumoul, X., et al. (2017). Aryl hydrocarbon receptor upregulates IL-1B expression in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells after TCDD exposure. *Toxicol. Vitro.* 41, 200–204.
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., et al. (2013). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 63, 559–566.
- Jalanka-Tuovinen, J., Salojärvi, J., Salonen, A., Immonen, O., Garsed, K., Kelly, F. M., et al. (2014). Faecal microbiota composition and host–microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome. *Gut* 63, 1737–1745.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 154, 103–116.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8787–8803.
- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., von Glehn, F., Yan, R., et al. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* 7, 12015.
- Javurek, A. B., Spollen, W. G., Johnson, S. A., Bivens, N. J., Bromert, K. H., Givan, S. A., et al. (2016). Effects of exposure to bisphenol A and ethinyl estradiol on the gut microbiota of parents and their offspring in a rodent model. *Gut Microbes* 7, 471–485.
- Jeffery, I. B., Claesson, M. J., O'Toole, P. W., and Shanahan, F. (2012a). Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 591–592.
- Jeffery, I. B., O'Toole, P. W., Ohman, L., Claesson, M. J., Deane, J., Quigley, E. M. M., et al. (2012b). An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 61, 997–1006.

- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J. K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J.* 1, 56–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043614>.
- Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., and Zhao, B. (2017a). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 58, 1–15.
- Jiang, L.-G., Cheng, L.-Y., Kong, S.-H., Yang, Y., Shen, Y.-J., Chen, C., et al. (2017b). Toxic effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on human sperm motility. *Asian J. Androl.* 19, 561–566. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27624986>.
- Jiang, Y., Xiong, X., Danska, J., and Parkinson, J. (2016). Metatranscriptomic analysis of diverse microbial communities reveals core metabolic pathways and microbiome-specific functionality. *Microbiome* 4, 2.
- Jimenez, E., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., et al. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 159, 187–193.
- Jin, D. C., Cao, H. L., Xu, M. Q., Wang, S. N., Wang, Y. M., Yan, F., et al. (2016). Regulation of the serotonin transporter in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 22, 8137–8148.
- Jin, Y., Miao, W., Lin, X., Wu, T., Shen, H., Chen, S., et al. (2014). Sub-chronically exposing mice to a polycyclic aromatic hydrocarbon increases lipid accumulation in their livers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 38, 353–363.
- Jin, Y., Wu, S., Zeng, Z., and Fu, Z. (2017). Effects of environmental pollutants on gut microbiota. *Environ. Pollut.* 222, 1–9.
- Jin, Y., Zeng, Z., Wu, Y., Zhang, S., and Fu, Z. (2015). Oral exposure of mice to carbendazim induces hepatic lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis. *Toxicol. Sci.* 147, 116–126.
- Johnson-Restrepo, B., and Kannan, K. (2009). An assessment of sources and pathways of human exposure to polybrominated diphenyl ethers in the United States. *Chemosphere* 76, 542–548.
- Jones, K. C., and de Voogt, P. (1999). Persistent Organic Pollutants (POPs): State of the Science. *Environ. Pollut.* 100, 209–221.
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., et al. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60, 631–637.
- Jousset, A., Bienhold, C., Chatzinotas, A., Gallien, L., Gobet, A., Kurm, V., et al. (2017). Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME J.* 11, 853–862.
- Kamada, N., Kim, Y.-G., Sham, H. P., Vallance, B. A., Puente, J. L., Martens, E. C., et al. (2012). Regulated Virulence Controls the Ability of a Pathogen to Compete with the Gut Microbiota. *Science (80-)*. 336, 1325–1329.
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y., and Nunez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 321–335.
- Kaminski, J., Gibson, M. K., Franzosa, E. A., Segata, N., Dantas, G., and Huttenhower, C. (2015). High-Specificity Targeted Functional Profiling in Microbial Communities with ShortBRED. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004557.
- Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J. Biosci. Bioeng.* 96, 317–323.
- Kang, D. W., Park, J. G., Ilhan, Z. E., Wallstrom, G., LaBaer, J., Adams, J. B., et al. (2013). Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. *PLoS One* 8, e68322.
- Kaplan, G. G., Hubbard, J., Korzenik, J., Sands, B. E., Panaccione, R., Ghosh, S., et al. (2010). The Inflammatory Bowel Diseases and Ambient Air Pollution: A Novel Association. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2412–2419.

- Karigar, C. S., and Rao, S. S. (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Res.* 2011. doi:10.4061/2011/805187.
- Karlsson, F. H., Fak, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., Petranovic, D., et al. (2012). Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 3, 1245.
- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J., and Backhed, F. (2013). Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 62, 3341–3349.
- Karve, S. S., Pradhan, S., Ward, D. V., and Weiss, A. A. (2017). Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *PLoS One* 12, e0178966.
- Keith, L. H. (2015). The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 147–160. doi:10.1080/10406638.2014.892886.
- Keubler, L. M., Buettner, M., Häger, C., and Bleich, A. (2015). A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1967–1975.
- Khalatbary, A. R., Ghaffari, E., and Mohammadnegad, B. (2015). Protective role of oleuropein against acute deltamethrin-induced neurotoxicity in rat brain. *Iran. Biomed. J.* 19, 247–253.
- Khalesi, S., Sun, J., Buys, N., and Jayasinghe, R. (2014). Effect of probiotics on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* 64, 897–903.
- Khanna, S., and Tosh, P. K. (2014). A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. *Mayo Clin. Proc.* 89, 107–114.
- Kim, H. J., Lee, J., Choi, J.-H., Bahinski, A., and Ingber, D. E. (2016a). Co-culture of Living Microbiome with Microengineered Human Intestinal Villi in a Gut-on-a-Chip Microfluidic Device. *J. Vis. Exp.* 114, e54344.
- Kim, S. H., Nam, K. H., Hwang, K. A., and Choi, K. C. (2016b). Influence of hexabromocyclododecane and 4-nonylphenol on the regulation of cell growth, apoptosis and migration in prostatic cancer cells. *Toxicol. Vitro.* 32, 240–247.
- Kinoshita, H., Abe, J., Akadegawa, K., Yurino, H., Uchida, T., Ikeda, S., et al. (2006). Breakdown of Mucosal Immunity in Gut by 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environ. Heal. Prev. Med.* 11, 256–263.
- Kirillova, A. V., Danilushkina, A. A., Irisov, D. S., Bruslik, N. L., Fakhrullin, R. F., Zakharov, Y. A., et al. (2017). Assessment of Resistance and Bioremediation Ability of *Lactobacillus* Strains to Lead and Cadmium. *Int. J. Microbiol.* 2017, 9869145.
- Kleindienst, S., Grim, S., Sogin, M., Bracco, A., Crespo-Medina, M., and Joye, S. B. (2016). Diverse, rare microbial taxa responded to the Deepwater Horizon deep-sea hydrocarbon plume. *ISME J.* 10, 400–415.
- Koch, R. (1890). An address on bacteriological research. *Br. Med. J.* 2, 380–383.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *PNAS* 108, 4578–4585.
- Kok, M. G., Ruijken, M. M., Swann, J. R., Wilson, I. D., Somsen, G. W., and de Jong, G. J. (2013). Anionic metabolic profiling of urine from antibiotic-treated rats by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2585–2594.
- Kolmeder, C. A., and de Vos, W. M. (2014). Metaproteomics of our microbiome - Developing insight in function and activity in man and model systems. *J. Proteomics* 97, 3–16.
- Koppel, N., Rekdal, V. M., and Balskus, E. P. (2017). Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science (80-.)*. 356, eaag2770.
- Korecka, A., Dona, A., Lahiri, S., Tett, A. J., Al-Asmakh, M., Braniste, V., et al. (2016). Bidirectional communication between the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and the microbiome tunes host metabolism. *Biofilms and Microbiomes* 2, 16014.

- Koropatkin, N. M., and Martens, E. C. (2017). Meds Modify Microbiome, Mediating Their Effects. *Cell Metab.* 26, 456–457.
- Korpela, K., and de Vos, W. M. (2016). Antibiotic use in childhood alters the gut microbiota and predisposes to overweight. *Microb. Cell* 3, 296–298.
- Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kekkonen, R. A., Forslund, K., Bork, P., et al. (2016). Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nat. Commun.* 7, 10410.
- Kostic, A. D., Gevers, D., Siljander, H., Vatanen, T., Peet, A., Tillmann, V., et al. (2015). The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression towards Type 1 Diabetes. *Cell Host Microbe* 17, 260–273.
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., and Gevers, D. (2014). The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* 146, 1489–1499.
- Kristiansson, E., Hugenholtz, P., and Dalevi, D. (2009). ShotgunFunctionalizeR: An R-package for functional comparison of metagenomes. *Bioinformatics* 25, 2737–2738.
- Kroese, E. D., Muller, J. J. A., Mohn, G. R., Dortant, P. M., and Wester, P. W. (2001). Report nr. 658603 010: Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[a]pyrene for two years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Kulp, K. S., Fortson, S. L., Knize, M. G., and Felton, J. S. (2003). An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1701–1710.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Lee, Y. B., and Naidu, R. (2016). Kinetics of PAH degradation by a new acid-metal-tolerant *Trabulsilla* isolated from the MGP site soil and identification of its potential to fix nitrogen and solubilize phosphorous. *J. Hazard. Mater.* 307, 99–107.
- Labaronne, E., Pinteur, C., Vega, N., Pesenti, S., Julien, B., Meugnier-fouilloux, E., et al. (2017). Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 45, 83–93.
- Labib, S., Guo, C. H., Williams, A., Yauk, C. L., White, P. A., and Halappanavar, S. (2013). Toxicogenomic outcomes predictive of forestomach carcinogenesis following exposure to benzo(a)pyrene: Relevance to human cancer risk. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273, 269–280.
- Lacy, B. E., Mearin, F., Chang, L., Chey, W. D., Lembo, A. J., Simren, M., et al. (2016). Bowel disorders. *Gastroenterology* 150, 1393–1407.
- Lagier, J.-C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., et al. (2012). Microbial culturomics: Paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 1185–1193.
- Lagkouravdos, I., Overmann, J., and Clavel, T. (2017). Cultured microbes represent a substantial fraction of the human and mouse gut microbiota. *Gut Microbes*, 1–11. doi:10.1080/19490976.2017.1320468.
- Laird, B. D., Van De Wiele, T. R., Corriveau, M. C., Jamieson, H. E., Parsons, M. B., Verstraete, W., et al. (2007). Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5542–5547.
- Langdon, A., Crook, N., and Dantas, G. (2016). The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.* 8, 39.
- Lau, K., Srivatsav, V., Rizwan, A., Nashed, A., Liu, R., Shen, R., et al. (2017). Bridging the Gap between Gut Microbial Dysbiosis and Cardiovascular Diseases. *Nutrients* 9, 859.
- Lauder, A. P., Roche, A. M., Sherrill-Mix, S., Bailey, A., Laughlin, A. L., Bittinger, K., et al. (2016). Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome* 4, 29.
- Layton, D. W., Bogen, K. T., Knize, M. G., Hatch, F. T., Johnson, V. M., and Felton, J. S. (1995). Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis* 16, 39–52.

- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., et al. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.
- LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., and Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 160–168.
- Lee, J.-G., Kim, S.-Y., Moon, J.-S., Kim, S.-H., Kang, D.-H., and Yoon, H.-J. (2016). Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. *Food Chem.* 199, 632–638.
- Lee, J. G., Kim, S. H., Kim, H. J., and Yoon, H. J. (2015). Total diet studies as a tool for ensuring food safety. *Toxicol. Res.* 31, 221–226.
- Lee, W.-J., and Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10, 416–424.
- Lee, Y. K., and Mazmanian, S. K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science (80-.)*. 330, 1768–1773.
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *PNAS* 108, 4615–4622.
- Lefever, D. E., Xu, J., Chen, Y., Huang, G., Tamas, N., and Guo, T. L. (2016). TCDD modulation of gut microbiome correlated with liver and immune toxicity in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 304, 48–58.
- Leidy, J. (1914). Morphology of the bacteria *Vibrio* and *Spirillum*, an early research_The intestinal flora. *Science (80-.)*. XL, 302–306.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., and Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci.* 22, 583–595.
- Lenz, E. M., and Wilson, I. D. (2007). Analytical strategies in metabonomics. *J. Proteome Res.* 6, 443–458.
- Lepage, P., Leclerc, M. C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H. M., Raes, J., et al. (2013). A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 62, 146–158.
- Lesmes, U., Beards, E. J., Gibson, G. R., Tuohy, K. M., and Shimoni, E. (2008). Effects of resistant starch type III polymorphs on human colon microbiota and short chain fatty acids in human gut models. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5415–5421.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* 102, 11070–11075.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. (2006). Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124, 837–848.
- Li, C. H., Wong, Y. S., Wang, H. Y., and Tam, N. F. Y. (2015). Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO₃. *J. Environ. Sci.* 30, 148–156.
- Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z., et al. (2017). Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract. *Sci. Rep.* 7, 45840.
- Li, G., Wang, H., Liu, A. B., Cheung, C., Reuhl, K. R., Bosland, M. C., et al. (2012). Dietary Carcinogen 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5- b]Pyridine Induced Prostate Carcinogenesis in CYP1A-humanized Mice. *Cancer Prev Res* 5, 963–972.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., et al. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* 32, 834–841.
- Liamin, M., Boutet-Robinet, E., Jamin, E. L., Fernier, M., Khoury, L., Kopp, B., et al. (2017). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage associated with mutagenesis in primary human activated T lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*

- Liess, M., Foit, K., Knillmann, S., Schäfer, R. B., and Liess, H.-D. (2016). Predicting the synergy of multiple stress effects. *Sci. Rep.* 6, 32965.
- Lin, C., Wang, B., Cui, X., Xu, D., Cheng, H., Wang, Q., et al. (2017). Estimates of Soil Ingestion in a Population of Chinese Children. *Environ. Health Perspect.* 125, 77002.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., and Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med.* 8, 51.
- Louis, P., Hold, G. L., and Flint, H. J. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 661–672.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., and Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.
- Lu, P., and Xie, W. (2017). Xenobiotic Receptors in the Crosstalk Between Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metab. Dis.* 11, 257–278.
- Luan, C., Xie, L., Yang, X., Miao, H., Lv, N., Zhang, R., et al. (2015). Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas. *Sci. Rep.* 5, 7980.
- Luczynski, P., Whelan, S. O., O’Sullivan, C., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., et al. (2016). Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 44, 2654–2666.
- Lynch, S. V., and Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 375, 2369–2379.
- Maalej, A., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Fki, I., Marrekchi, R., and Sayadi, S. (2017). Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* 106, 455–465.
- Maccaferri, S., Vitali, B., Klinder, A., Kolida, S., Ndagijimana, M., Laghi, L., et al. (2010). Rifaximin modulates the colonic microbiota of patients with Crohn’s disease: an in vitro approach using a continuous culture colonic model system. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2556–2565.
- Machiels, K., Joossens, M., Sabino, J., De Preter, V., Arijis, I., Eeckhaut, V., et al. (2014). A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 63, 1275–1283.
- Mackowiak, B., and Wang, H. (2016). Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 1130–1140.
- Macpherson, A. J., and Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 478–485.
- Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* 3, 1021–1035.
- Maes, M., Kubera, M., Leunis, J. C., and Berk, M. (2012). Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: Further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J. Affect. Disord.* 141, 55–62.
- Mahmood, L. (2014). The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *J. Heal. Res. Rev.* 1, 5–9.
- Maier, E., Anderson, R. C., and Roy, N. C. (2015). Understanding how commensal obligate anaerobic bacteria regulate immune functions in the large intestine. *Nutrients* 7, 45–73.
- Mäkivuokko, H. A., Saarinen, M. T., Ouwehand, A. C., and Rautonen, N. E. (2006). Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semi-continuous culture system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 2056–2063.

- Manabe, S., Suzuki, H., Wada, O., and Ueki, A. (1993). Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis* 14, 899–901.
- Maranghi, F., Tassinari, R., Moracci, G., Altieri, I., Rasinger, J. D., Carroll, T. S., et al. (2013). Dietary exposure of juvenile female mice to polyhalogenated seafood contaminants (HBCD, BDE-47, PCB-153, TCDD): Comparative assessment of effects in potential target tissues. *Food Chem. Toxicol.* 56, 443–449.
- Mar Rodríguez, M., Pérez, D., Javier Chaves, F., Esteve, E., Marin-Garcia, P., Xifra, G., et al. (2015). Obesity changes the human gut microbiome. *Sci. Rep.* 5, 14600.
- Marchesi, J. R. (2011). Human distal gut microbiome. *Environ. Microbiol.* 13, 3088–3102.
- Marcobal, A., Yusufaly, T., Higginbottom, S., Snyder, M., Sonnenburg, J. L., and Mias, G. I. (2015). Metabolome progression during early gut microbial colonization of gnotobiotic mice. *Sci. Rep.* 5, 11589.
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nat. Protoc.* 12, 213–218.
- Marettova, E., Mareta, M., and Legáth, J. (2017). Effect of pyrethroids on female genital system. Review. *Anim. Reprod. Sci.* 184, 132–138.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Doré, J., et al. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9, 123.
- Mariussen, E., and Fonnum, F. (2003). The effect of brominated flame retardants on neurotransmitter uptake into rat brain synaptosomes and vesicles. *Neurochem. Int.* 43, 533–542.
- Markowitz, V. M., Ivanova, N. N., Szeto, E., Palaniappan, K., Chu, K., Dalevi, D., et al. (2008). IMG/M: A data management and analysis system for metagenomes. *Nucleic Acids Res.* 36, 534–538.
- Marques, A., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Roseiro, C., Santos, C., Barranco, A., et al. (2011). New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Res. Int.* 44, 510–522.
- Marsh, T. L. (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 323–327.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143, 754–758.
- Martínez, I., Stegen, J. C., Greenhill, A. R., Walter, J., Martínez, I., Maldonado-Gómez, M. X., et al. (2015). The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes. *Cell Rep.* 11, 527–538.
- Martinez, X., Pozuelo, M., Pascal, V., Campos, D., Gut, I., Gut, M., et al. (2016). MetaTrans: an open-source pipeline for metatranscriptomics. *Sci. Rep.* 6, 26447.
- Martorell, I., Nieto, A., Nadal, M., Perelló, G., Marcé, R. M., and Domingo, J. L. (2012). Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using data from a duplicate diet study in Catalonia, Spain. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4103–4108.
- Marynowski, M., Likonska, A., Zatorski, H., and Fichna, J. (2015). Role of environmental pollution in irritable bowel syndrome. *World J. Gastroenterol.* 21, 11371–11378.
- Marzorati, M., Vanhoecke, B., De Ryck, T., Sadaghian Sadabad, M., Pinheiro, I., Possemiers, S., et al. (2014). The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro. *BMC Microbiol.* 14, 133.
- Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J., and Corthésy, B. (2014). Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes* 5, 688–695.
- Mathis, D., and Benoist, C. (2012). The influence of the microbiota on type-1 diabetes: On the threshold of a leap forward in our understanding. *Immunol. Rev.* 245, 239–249.

- Mauderly, J. L., and Samet, J. M. (2009). Is there evidence for synergy among Air pollutants in causing health effects? *Environ. Health Perspect.* 117, 1–6.
- Maulvault, A. L., Machado, R., Afonso, C., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Coelho, I., et al. (2011). Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2808–2815.
- Maurice, C. F., Haiser, H. J., and Turnbaugh, P. J. (2013). Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* 152, 39–50.
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107–118.
- McMillan, B. J., and Bradfield, C. a (2007). The aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *PNAS* 104, 1412–1417.
- Medellin-Peña, M. J., and Griffiths, M. W. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1165–1172.
- Mell, B., Jala, V. R., Mathew, A. V., Byun, J., Waghulde, H., Zhang, Y., et al. (2015). Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol. Genomics* 47, 187–197.
- Meller, H. B. (1930). The capnometer, an instrument for the measurement of air pollution. *Science (80-)*. 71, 344–345.
- Menard, C., Heraud, F., Nougadere, A., Volatier, J.-L., and Leblanc, J.-C. (2008). Relevance of integrating agricultural practices in pesticide dietary intake indicator. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3240–3253.
- Mendel, J. L., and Walton, M. S. (1966). Conversion of p,p'-DDT to p,p'-DDD by Intestinal Flora of the Rat. *Science (80-)*. 151, 1527–1528.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., and Fabre, G. (1995). The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* 11, 187–194.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E., Kubal, M., et al. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9, 386.
- Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., et al. (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes to cells* 2, 645–654.
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). *Impact Food Bioact. Heal. Vit. Ex Vivo Model.* 5, 37–46. doi:10.1007/978-3-319-16104-4.
- Mitra, S., Förster-Fromme, K., Damms-Machado, A., Scheurenbrand, T., Biskup, S., Huson, D. H., et al. (2013). Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD 16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics* 14, S16.
- Mohn, W. W., and Tiedje, J. M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56, 482–507.
- Moles, L., Gómez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., et al. (2013). Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. *PLoS One* 8.
- Molly, K., Woestyne, M. Vande, Smet, I. De, and Verstraete, W. (1994). Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microb. Ecol. Health Dis.* 7, 191–200.
- Monachese, M., Burton, J. P., and Reid, G. (2012). Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6397–6404.

- Montella, S., Ventorino, V., Lombard, V., Henrissat, B., Pepe, O., and Faraco, V. (2017). Discovery of genes coding for carbohydrate-active enzyme by metagenomic analysis of lignocellulosic biomasses. *Sci. Rep.* 7, 42623.
- Moore, W. E. C., and Holdeman, L. V. (1974). Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 1450–1455.
- Morelli, I. S., Saparrat, M. C. N., Del Panno, M. T., Coppotelli, B. M., and Arrambari, A. (2013). “Bioremediation of PAH-Contaminated Soil by Fungi,” in *Fungi as Bioremediators. Soil Biology*, ed. Springer, 159–179. doi:10.1007/978-3-642-33811-3.
- Morgan, X. C., and Huttenhower, C. (2014). Meta’omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology* 146, 1437–1448.
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., et al. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 13, R79.
- Moura-Alves, P., Faé, K., Houthuys, E., Dorhoi, A., Kreuchwig, A., Furkert, J., et al. (2014). AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature* 512, 387–392.
- Moya, A., and Ferrer, M. (2016). Functional Redundancy Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends Microbiol.* 24, 402–413.
- Mu, C., Yang, Y., and Zhu, W. (2016). Gut Microbiota : The Brain Peacekeeper. *Front. Microbiol.* 7, 1–11.
- Mu, Q., Zhang, H., and Luo, X. M. (2015). SLE: Another autoimmune disorder influenced by microbes and diet? *Front. Immunol.* 6, 608.
- Mukherjee, A., Biswas, A., and Das, S. K. (2016). Gut dysfunction in Parkinson’s disease. *World J. Gastroenterol.* 22, 5742–5752.
- Mumford, J. L., Lee, X., Lewtas, J., Young, T. L., and Santella, R. M. (1993). DNA Adducts As Biomarkers for Assessing Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tissues from Xuan Wei Women with High Exposure to Coal Combustion Emissions and High Lung Cancer Mortality. *Environ. Health Perspect.* 99, 83–87.
- Murínová, S., and Dercová, K. (2014). Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.*, 873081.
- Murkovic, M. (2004). Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J. Chromatogr. B* 802, 3–10.
- Naccari, C., Galceran, M. T., Moyano, E., Cristani, M., Siracusa, L., and Trombetta, D. (2009). Presence of heterocyclic aromatic amines (HAs) in smoked “Provola” cheese from Calabria (Italy). *Food Chem. Toxicol.* 47, 321–327. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.018>.
- Naseribafrouei, A., Hestad, K., Avershina, E., Sekelja, M., Linløkken, A., Wilson, R., et al. (2014). Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol. Motil.* 26, 1155–1162.
- National Toxicology Program (2016). Report on Carcinogens, Fourteenth Edition_Heterocyclic Amines.
- Natividad, J. M. M., and Verdu, E. F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42–51.
- Neel, B. A., and Sargis, R. M. (2011). The paradox of progress: Environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* 60, 1838–1848.
- Neri, M., Ugolini, D., Bonassi, S., Fucic, A., Holland, N., Knudsen, L. E., et al. (2006). Children’s exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage: II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat. Res.* 612, 14–39.
- Neufeld, J. D., Li, J., and Mohn, W. W. (2008). Scratching the surface of the rare biosphere with ribosomal sequence tag primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 283, 146–153.

- Ng, C. A., and von Goetz, N. (2017). The global food system as a transport pathway for hazardous chemicals: The missing link between emissions and exposure. *Environ. Health Perspect.* 125, 1–7.
- Ng, K. M., Ferreyra, J. a, Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., et al. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* 502, 96–99.
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model. Mech.* 8, 1–16.
- Ni, W., McNaughton, L., LeMaster, D. M., Sinha, R., and Turesky, R. J. (2008). Quantitation of 13 heterocyclic aromatic amines in cooked beef, pork, and chicken by liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56, 68–78.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–7. doi:10.1126/science.1223813.
- Nigro, G., Hanson, M., Fevre, C., Lecuit, M., and Sansonetti, P. J. (2016). Intestinal Organoids as a Novel Tool to Study Microbes–Epithelium Interactions. *Methods Mol. Biol.*, 257–284.
- Nistal, E., Fernández-Fernández, N., Vivas, S., and Olcoz, J. L. (2015). Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota. *Front. Oncol.* 5, 220.
- Noor, S. O., Ridgway, K., Scovell, L., Kemsley, E. K., Lund, E. K., Jamieson, C., et al. (2010). Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC Gastroenterol.* 10, 134.
- Noverr, M. C., and Huffnagle, G. B. (2005). The “microflora hypothesis” of allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy* 35, 1511–1520.
- O’Hara, A. M., O’Regan, P., Fanning, Á., O’Mahony, C., MacSharry, J., Lyons, A., et al. (2006). Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118, 202–215.
- O’Toole, P. W., and Jeffery, I. B. (2015). Gut microbiota and aging. *Science (80-.)*. 350, 1214–1216.
- Obregon-Tito, A. J., Tito, R. Y., Metcalf, J., Sankaranarayanan, K., Clemente, J. C., Ursell, L. K., et al. (2015). Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat. Commun.* 6, 6505.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., and Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299–304.
- Ogbonnaya, E. S., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F., and O’Leary, O. F. (2015). Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. *Biol. Psychiatry* 78, e7–e9.
- Ohland, C. L., and Jobin, C. (2015). Microbial Activities and Intestinal Homeostasis: A Delicate Balance Between Health and Disease. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 28–40.
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Shoeters, G., et al. (2002). Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3326–3334.
- Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., and Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 281–287.
- Orel, R., and Trop, T. K. (2014). Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 11505–11524.
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., et al. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685–693.

- Pacia, M. Z., Pukalski, J., Turnau, K., Baranska, M., and Kaczor, A. (2016). Lipids, hemoproteins and carotenoids in alive *Rhodotorula mucilaginosa* cells under pesticide decomposition – Raman imaging study. *Chemosphere* 164, 1–6.
- Pais, P., Salmon, C. P., Knize, M. G., and Felton, J. S. (1999). Formation of Mutagenic/Carcinogenic Heterocyclic Amines in Dry-Heated Model Systems, Meats, and Meat Drippings. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1098–1108.
- Park, A. J., Collins, J., Blennerhassett, P. A., Ghia, J. E., Verdu, E. F., Bercik, P., et al. (2013). Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. *Neurogastroenterol. Motil.* 25, 733-e575.
- Park, G. S., Park, M. H., Shin, W., Zhao, C., Sheikh, S., Oh, S. J., et al. (2017). Emulating Host-Microbiome Ecosystem of Human Gastrointestinal Tract in Vitro. *Stem Cell Rev. Reports* 13, 321–334.
- Parséus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R., Molinaro, A., Ståhlman, M., et al. (2017). Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut* 66, 429–437.
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., et al. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 66, 813–822.
- Paules, R. S., Cordeiro-Stone, M., Mass, M. J., Poirier, M. C., Yuspa, S. H., and Kaufman, D. G. (1988). Benzo[a]pyrene diol epoxide I binds to DNA at replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2176–2180.
- Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* 30, 17–25.
- Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyötyläinen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A. H., et al. (2016). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535, 376–381.
- Pepe-Ranney, C., Campbell, A. N., Koechli, C. N., Berthrong, S., and Buckley, D. H. (2016). Unearthing the ecology of soil microorganisms using a high resolution DNA-SIP approach to explore cellulose and xylose metabolism in soil. *Front. Microbiol.* 7, 703.
- Pereira, F. C., and Berry, D. (2017). Microbial nutrient niches in the gut. *Environ. Microbiol.* 19, 1366–1378.
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A. E., and Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* 5, 48.
- Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G. C., Gendler, S. J., Velcich, A., Lundberg, J. O., et al. (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G327–G333.
- Piggott, J. J., Townsend, C. R., and Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol. Evol.* 5, 1538–1547.
- Planer, J. D., Peng, Y., Kau, A. L., Blanton, L. V., Ndao, M. I., Tarr, P. I., et al. (2016). Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* 534, 263–266.
- Png, C. W., Linden, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., et al. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2420–2428.
- Poitras, E., and Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Biotechnol* 2, 2–11.
- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U. M., Matteuzzi, D., et al. (2008). In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe* 14, 280–286.
- Poretzky, R., Rodriguez-R, L. M., Luo, C., Tsementzi, D., and Konstantinidis, K. T. (2014). Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One* 9, e93827.

- Porter, N. T., and Martens, E. C. (2016). Love Thy Neighbor: Sharing and Cooperativity in the Gut Microbiota. *Cell Host Microbe* 19, 745–746.
- Pratt, M. M., John, K., MacLean, A. B., Afework, S., Phillips, D. H., and Poirier, M. C. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human tissues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2675–91. doi:10.3390/ijerph8072675.
- Prefet-Gironde (2015). PROJET D'ARRETE PREFECTORAL-relatif aux modalités de mise en œuvre en Gironde du plan anti-dissémination du chikungunya et de la dengue en métropole.
- Preisner, E. C., Fichot, E. B., and Norman, R. S. (2016). Microbial mat compositional and functional sensitivity to environmental disturbance. *Front. Microbiol.* 7, 1632.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–67.
- Qin, N., Yang, F., Li, A., Prifti, E., Chen, Y., Shao, L., et al. (2014). Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513, 59–64.
- Qiu, C., Shan, L., Yu, M., and Snyderwine, E. G. (2005). Steroid hormone receptor expression and proliferation in rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 26, 763–769.
- Rajilić-Stojanović, M. (2013). Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 5–16.
- Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., et al. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ. Microbiol.* 11, 1736–51.
- Rajilić-Stojanović, M., Jonkers, D. M., Salonen, A., Hanevik, K., Raes, J., Jalanka, J., et al. (2015). Intestinal microbiota and diet in IBS: causes, consequences, or epiphenomena? *Am. J. Gastroenterol.* 110, 278–287.
- Rakoff-Nahoum, S., Foster, K. R., and Comstock, L. E. (2016). The evolution of cooperation within the gut microbiota. *Nature* 533, 255–259.
- Ramadoss, P., and Perdew, G. H. (2004). Use of 2-Azido-3-[125I]iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxin as a Probe to Determine the Relative Ligand Affinity of Human versus Mouse Aryl Hydrocarbon Receptor in Cultured Cells. *Mol. Pharmacol.* 66, 129–136.
- Rasinger, J. D., Carroll, T. S., Lundebye, A. K., and Hogstrand, C. (2014). Cross-omics gene and protein expression profiling in juvenile female mice highlights disruption of calcium and zinc signalling in the brain following dietary exposure to CB-153, BDE-47, HBCD or TCDD. *Toxicology* 321, 1–12.
- Rath, S., Heidrich, B., Pieper, D. H., and Vital, M. (2017). Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota. *Microbiome* 5, 54.
- Rehman, A., Rausch, P., Wang, J., Skieceviciene, J., Kiudelis, G., Bhagalia, K., et al. (2016). Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut* 65, 238–248.
- Rehman, M. Y. A., Kamal, A., Taqi, M. M., and Malik, R. N. (2017). Tracing biomarker of PAH-exposure and susceptibility factor (GSTM-polymorphism) among cancer patients in Pakistan. *Chemosphere* 178, 384–390. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.017>.
- Reinhardt, C., Bergentall, M., Greiner, T. U., Schaffner, F., Östergren-Lundén, G., Petersen, L. C., et al. (2012). Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling. *Nature* 483, 627–631.
- Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., and Nishigaki, I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5, 182–189.

- Reuter, J. A., Spacek, D. V., and Snyder, M. P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol. Cell* 58, 586–597.
- Ribet, D., and Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 17, 173–183.
- Ribi re, C., Peyret, P., Parisot, N., Darcha, C., and Déchelotte, P. J. (2016). Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model. *Sci. Rep.* 6, 31027.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., et al. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science (80-.)*. 341, 1241214.
- Ridlon, J., Kang, D., Hylemon, P., and Bajaj, J. (2014). Bile acids and the Gut Microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30, 332–338.
- Rizzetto, L., De Filippo, C., and Cavalieri, D. (2014). Richness and diversity of mammalian fungal communities shape innate and adaptive immunity in health and disease. *Eur. J. Immunol.* 44, 3166–3181.
- Roberts, M. S., Magnusson, B. M., Burczynski, F. J., and Weiss, M. (2002). Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 751–790.
- Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabril, V., Miranda, J. M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C. M., et al. (2017). Food additives, contaminants and other minor components : effects on human gut microbiota — a review. *J. Physiol. Biochem.*, 1–15.
- Rodrigue, S., Materna, A. C., Timberlake, S. C., Blackburn, M. C., Malmstrom, R. R., Alm, E. J., et al. (2010). Unlocking short read sequencing for metagenomics. *PLoS One* 5, e11840.
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26050.
- Roeselers, G., Ponomarenko, M., Lukovac, S., and Wortelboer, H. M. (2013). Ex vivo systems to study host-microbiota interactions in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 101–113.
- Rohrmann, S., Zoller, D., Hermann, S., and Linseisen, J. (2007). Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort. *Br. J. Nutr.* 98, 1112–1115.
- Rojo, D., Mendez-Garcia, C., Raczkowska, B. A., Bargiela, R., Moya, A., Ferrer, M., et al. (2016). Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 453–478.
- Romani, L. (2011). Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 275–288.
- Romano, K. A., Vivas, E. I., Amador-Noguez, D., and Rey, F. E. (2015). Intestinal Microbiota Composition Modulates Choline Bioavailability from Diet and Accumulation of the Proatherogenic Metabolite Trimethylamine-N-Oxide. *MBio* 6, e02481-14.
- Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., et al. (2011). The Toll-like receptor pathway establishes commensal gut colonization. *Science (80-.)*. 332, 974–977.
- Roussel, C., Cordonnier, C., Galia, W., Le Goff, O., Th venot, J., Chalancon, S., et al. (2016). Increased EHEC survival and virulence gene expression indicate an enhanced pathogenicity upon simulated pediatric gastrointestinal conditions. *Pediatr. Res.* 80, 734–743.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., et al. (2017). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* doi:10.1007/s00394-017-1445-8.
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y. W. (2013). Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/Beta-Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host Microbe* 14, 195–206.

- Ruiz, P., Perlina, A., Mumtaz, M., and Fowler, B. A. (2016). A Systems Biology Approach Reveals Converging Molecular Mechanisms that Link Different POPs to Common Metabolic Diseases. *Environ. Health Perspect.* 124, 1034–1041.
- Russell, S. L., and Finlay, B. B. (2012). The impact of gut microbes in allergic diseases. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 28, 563–569.
- Saad, R., Rizkallah, M. R., and Aziz, R. K. (2012). Gut Pharmacomicrobiomics: the tip of an iceberg of complex interactions between drugs and gut-associated microbes. *Gut Pathog.* 4, 16.
- Sahar, A., Rahman, U. ur, Khan, M. I., and Khan, M. A. (2016). Heterocyclic Amines. *Food Saf.*, 89–111. doi:10.1007/978-3-319-39253-0.
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Janssen, S., Shastri, G. G., Ilhan, Z. E., et al. (2016). Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 167, 1469–1480.
- Samuel, B. S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F. E., Backhed, F., Manchester, J. K., et al. (2008). Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *PNAS* 105, 16767–16772.
- Sanapareddy, N., Legge, R. M., Jovov, B., McCoy, A., Burcal, L., Araujo-Perez, F., et al. (2012). Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J.* 6, 1858–1868.
- Sankar, S. A., Lagier, J., Pontarotti, P., Raoult, D., and Fournier, P. (2015). The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 276–286.
- Saoudi, M., Badraoui, R., Bouhajja, H., Ncir, M., and Rahmouni, F. (2017). Deltamethrin induced oxidative stress in kidney and brain of rats: Protective effect of Artemisia campestris essential oil. *Biomed. Pharmacother.* 94, 955–963.
- Sato, T., and Clevers, H. (2013). Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science (80-.)*. 340, 241–260.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., and Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101, 492–501.
- Sawulski, P., Clipson, N., and Doyle, E. (2014). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation* 25, 835–847.
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Riordan, M., et al. (2008). Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ. Microbiol.* 10, 789–798.
- SCF (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food.
- Schaubeck, M., Clavel, T., Calasan, J., Lagkouvardos, I., Haange, S. B., Jehmlich, N., et al. (2016). Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* 65, 225–237.
- Schechter, A., Szabo, D. T., Miller, J., Gent, T. L., Malik-Bass, N., Petersen, M., et al. (2012). Hexabromocyclododecane (HBCD) stereoisomers in U.S. food from Dallas, Texas. *Environ. Health Perspect.* 120, 1260–1264.
- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Gros, M., Friedman, R., Moya-Nilges, M., Nigro, G., et al. (2015). Growth and host interaction of mouse segmented filamentous bacteria in vitro. *Nature* 520, 99–103.

- Schnupf, P., Gaboriau-Routhiau, V., Sansonetti, P. J., and Cerf-Bensussan, N. (2017). Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. *Curr. Opin. Microbiol.* 35, 100–109.
- Schroeder, B. O., and Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 22, 1079–1089.
- Schroeder, J. C., DiNatale, B. C., Murray, I. A., Flaveny, C. A., Liu, Q., Laurenzana, E. M., et al. (2010). The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* 49, 393–400.
- Schwabe, R. F., and Jobin, C. (2013). The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 800–812.
- Schwarz, M. a, Lindtner, O., Blume, K., Heinemeyer, G., and Schneider, K. (2014). Dioxin and dl-PCB exposure from food: the German LExUKon project. *Food Addit. Contam. Part A* 31, 688–702.
- Sears, C. L., and Garrett, W. S. (2014). Microbes, Microbiota and Colon Cancer Cynthia. *Cell Host Microbe* 15, 317–328.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Caetano, L., Antunes, C. M., and Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- Sévère, S., Marchand, P., Guiffard, I., Morio, F., Venisseau, A., Veyrand, B., et al. (2015). Pollutants in pet dogs : a model for environmental links to breast cancer. *Springerplus* 4, 1–11.
- Shah, P., Fritz, J. V, Glaab, E., Desai, M. S., Greenhalgh, K., Frachet, A., et al. (2016). A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human–microbe interface. *Nat. Commun.* 7, 11535.
- Shan, L., Yu, M., Schut, H. A. J., and Snyderwine, E. G. (2004). Susceptibility of rats to mammary gland carcinogenesis by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) varies with age and is associated with the induction of differential gene expression. *Am. J. Pathol.* 165, 191–202.
- Shanklin, J., and Whittle, E. (2003). Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane g-hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. *FEBS Lett.* 545, 188–192.
- Shen, J., Liao, Y., Hopper, J. L., Goldberg, M., Santella, R. M., and Terry, M. B. (2017). Dependence of cancer risk from environmental exposures on underlying genetic susceptibility : an illustration with polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer. *Br. J. Cancer* 116, 1229–1233.
- Shen, X. J., Rawls, J. F., Randall, T., Burcal, L., Mpande, C. N., Jenkins, N., et al. (2010). Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* 1, 138–147.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., et al. (2000). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 779–82.
Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shin, J., Lee, S., Go, M.-J., Lee, S. Y., Kim, S. C., Lee, C.-H., et al. (2016). Analysis of the mouse gut microbiome using full-length 16S rRNA amplicon sequencing. *Sci. Rep.* 6, 29681.
- Silano, M., and Silano, V. (2015). Food and Feed Chemical Contaminants in the European Union: Regulatory , Scientific and Technical Issues Concerning Chemical Contaminants Occurrence , Risk Assessment and Risk Management in the European Union. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 2162–2217.
- Simonovic, I., Rosenberg, J., Koutsouris, A., and Hecht, G. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell. Microbiol.* 2, 305–315.

- Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R. M., Levy, A., et al. (2016). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *ISME J.* 10, 2020–2032.
- Singer, E., Wagner, M., and Woyke, T. (2017). Capturing the genetic makeup of the active microbiome in situ. *ISME J.* 11, 1949–1963.
- Sinha, R., Kullendorff, M., Gunter, M. J., Strickland, P., and Rothman, N. (2005). Dietary Benzo[a]Pyrene Intake and Risk of Colorectal Adenoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 14, 2030–2035.
- Sinha, R., Rothman, N., Brown, E. D., Salmon, C. P., Knize, M. G., Swanson, C. a, et al. (1995). High Concentrations of the Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo (PhIP) Occur in Chicken but Are Dependent on the Cooking Method. *Cancer Res.* 55, 4516–4519.
- Siro, V., Tard, A., Venisseau, A., Brosseaud, A., Marchand, P., Le Bizec, B., et al. (2012). Dietary exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls of the French population: Results of the second French Total Diet Study. *Chemosphere* 88, 492–500.
- Skog, K. (2002). Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1197–1203.
- Skog, K. I., Johansson, M. A. E., and Jagerstad, M. I. (1998). Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake. *Food Chem. Toxicol.* 36, 879–896.
- Smidt, H., and de Vos, W. M. (2004). Anaerobic Microbial Dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 43–73.
- Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., and Alm, E. J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature* 480, 241–244.
- Smith, M. I., Yatsunenko, T., Manary, M. J., Trehan, I., Mkakosya, R., Cheng, J., et al. (2013). Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science (80-.).* 339, 548–554.
- Söderström, G., Sellström, U., de Wit, C., and Tysklind, M. (2004). Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209). *Environ. Sci. Technol.* 38, 127–132.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H.-P., Jegou, S., Landman, C., et al. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 66, 1039–1048.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J.-J., et al. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16731–6. doi:10.1073/pnas.0804812105.
- Sokol, H., Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Lay, C., Lepage, P., Podglajen, I., et al. (2006). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 106–111.
- Solomon, K. V, Haitjema, C. H., Henske, J. K., Gilmore, S. P., Borges-Rivera, D., Lipzen, A., et al. (2016). Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. *Science (80-.).* 351, 1192–1195.
- Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J., and Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 630–638.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2016). Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. *BioEssays* 38, 455–464.
- Song, M., Luo, C., Jiang, L., Zhang, D., Wang, Y., and Zhang, G. (2015). Identification of Benzo[a]pyrene-metabolizing bacteria in forest soils by using DNA-based stable-isotope probing. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7368–7376.

- Sonnenburg, J. L., and Bäckhed, F. (2016). Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535, 56–64.
- Sowada, J., Lemoine, L., Schön, K., Hutzler, C., Luch, A., and Tralau, T. (2017). Toxicification of polycyclic aromatic hydrocarbons by commensal bacteria from human skin. *Arch. Toxicol.* 91, 2331–2341.
- Sowada, J., Schmalenberger, A., Ebner, I., Luch, A., and Tralau, T. (2014). Degradation of benzo[a]pyrene by bacterial isolates from human skin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 88, 129–139.
- Spanogiannopoulos, P., Bess, E. N., Carmody, R. N., and Turnbaugh, P. J. (2016). The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 273–287.
- Sperber, A. D., Dumitrascu, D., Fukudo, S., Gerson, C., Ghoshal, U. C., Gwee, K. A., et al. (2017). The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literature review. *Gut* 66, 1075–1082.
- Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., and Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS* 99, 15451–15455.
- Stavric, B., and Klassen, R. (1994). Dietary effects on the uptake of benzo[a]pyrene. *Food Chem. Toxicol.* 32, 727–734.
- Stedman, A., Nigro, G., and Sansonetti, P. J. (2016). Le dialogue microbiote-cellules souches. *Médecine/Sciences* 32, 983–990.
- Stedtfeld, R. D., Stedtfeld, T. M., Fader, K. A., Williams, M. R., Bhaduri, P., Quensen, J., et al. (2017). TCDD influences reservoir of antibiotic resistance genes in murine gut microbiome. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–8.
- Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S. K., et al. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *PNAS* 111, 13145–13150.
- Strati, F., Di Paola, M., Stefanini, I., Albanese, D., Rizzetto, L., Lionetti, P., et al. (2016). Age and gender affect the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. *Front. Microbiol.* 7, 1227.
- Su, Y., Zhao, B., Guo, F., Bin, Z., Yang, Y., Liu, S., et al. (2014). Annals of Epidemiology Interaction of benzo[a]pyrene with other risk factors in hepatocellular carcinoma: a case-control study in Xiamen, China. *Ann. Epidemiol.* 24, 98–103.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., et al. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263–275.
- Sugahara, H., Odamaki, T., Hashikura, N., Abe, F., and Xiao, J. (2015). Differences in folate production by bifidobacteria of different origins. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 34, 87–93.
- Swanson, P. A., Kumar, A., Samarin, S., Vijay-Kumar, M., Kundu, K., Murthy, N., et al. (2011). Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *PNAS* 108, 8803–8808.
- Takagi, R., Sasaki, K., Sasaki, D., Fukuda, I., Tanaka, K., Yoshida, K., et al. (2016). A single-batch fermentation system to simulate human colonic microbiota for high-throughput evaluation of prebiotics. *PLoS One* 11, e0160533.
- Tana, C., Umesaki, Y., Imaoka, A., Handa, T., Kanazawa, M., and Fukudo, S. (2010). Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil.* 22, 512–e115.
- Tang, W. H., Kitai, T., and Hazen, S. L. (2017). Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ. Res.* 120, 1183–1196.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., et al. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 11, 2574–84.

- Tasse, L., Bercovici, J., Pizzut-Serin, S., Robe, P., Tap, J., Klopp, C., et al. (2010). Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Res.* 20, 1605–1612.
- TENDR Project (2016). Project TENDR : Targeting Environmental Neuro-Developmental Risks. The TENDR Consensus Statement. *Environ. Health Perspect.* 124, 118–122.
- Teng, F., Klinger, C. N., Felix, K. M., Tran, N. L., Umesaki, Y., Wu, H. J., et al. (2016). Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer’s Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity* 44, 875–888.
- Thomas, V. H., Bhattachar, S., Hitchingham, L., Zocharski, P., Naath, M., Surendran, N., et al. (2006). The road map to oral bioavailability: an industrial perspective. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 591–608.
- Thorsen, W. a, Cope, W. G., and Shea, D. (2004). Bioavailability of PAHs: effects of soot carbon and PAH source. *Environ. Sci. Technol.* 38, 2029–37.
- Thursby, E., and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836.
- Tian, J., Feng, Y., Fu, H., Xie, H. Q., Jiang, J. X., and Zhao, B. (2015). The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9518–9531.
- Tian, M., Zhao, B., Zhang, J., Martin, F. L., Huang, Q., Liu, L., et al. (2016). Association of environmental benzo[a]pyrene exposure and DNA methylation alterations in hepatocellular carcinoma : A Chinese case – control study. *Sci. Total Environ.* 541, 1243–1252.
- Tigchelaar, E. F., Bonder, M. J., Jankipersadsing, S. A., Fu, J., Wijmenga, C., and Zhernakova, A. (2016). Gut microbiota composition associated with stool consistency. *Gut* 65, 540–543.
- Tilg, H., Cani, P. D., and Mayer, E. A. (2016). Gut microbiome and liver diseases. *Gut* 65, 2035–2044.
- Tottey, W., Denonfoux, J., Jaziri, F., Parisot, N., Missaoui, M., Hill, D., et al. (2013). The human gut chip “HuGChip”, an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *PLoS One* 8, e62544.
- Tottey, W., Gaci, N., Borrel, G., Alric, M., O’Toole, P. W., and Brugère, J. F. (2015). In-vitro model for studying methanogens in human gut microbiota. *Anaerobe* 34, 50–52.
- Trabelsi, M.-S., Daoudi, M., Prawitt, J., Ducastel, S., Touche, V., Sayin, S. I., et al. (2015). Farnesoid X Receptor Inhibits Glucagon-Like Peptide-1 Production by Enteroendocrine L-cells. *Nat. Commun.* 6, 7629.
- Tralau, T., Sowada, J., and Luch, A. (2014). Insights on the human microbiome and its xenobiotic metabolism : what is known about its effects on human physiology ? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 11, 1–15.
- Tremaroli, V., and Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249.
- Trinder, M., McDowell, T. W., Daisley, B. A., Ali, S. N., Leong, H. S., Sumarah, M., et al. (2016). Probiotic lactobacillus rhamnosus reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6204–6213.
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166.
- Tropini, C., Earle, K. A., Huang, K. C., and Sonnenburg, J. L. (2017). The Gut Microbiome: Connecting Spatial Organization to Function. *Cell Host Microbe* 21, 433–442.
- Trushin, N., Alam, S., El-Bayoumy, K., Krzeminski, J., Amin, S., Gullett, J., et al. (2012). Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes. *J. Carcinog.* 11, 1–10.

- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., et al. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61, 1007–1015.
- Tu, Q., Li, J., Shi, Z., Chen, Y., Lin, L., Li, J., et al. (2017). HuMiChip2 for strain level identification and functional profiling of human microbiomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 423–435.
- Tuomisto, J., Vartiainen, T., and Tuomisto, J. T. (2011). Synopsis on Dioxins and PCBs.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Ley, R. E., Sogin, M. L., et al. (2009a). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., and Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature* 449, 804–810.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Turnbaugh, P. J., Quince, C., Faith, J. J., McHardy, A. C., Yatsunencko, T., Niazi, F., et al. (2010). Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *PNAS* 107, 7503–7508.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., and Gordon, J. I. (2009b). The effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci. Transl. Med.* 1, 6ra14.
- Tyrer, P. C., Bean, E. G., Ruth Foxwell, A., and Pavli, P. (2011). Effects of bacterial products on enterocyte-macrophage interactions in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 336–341.
- Udden, S. M. N., Waliullah, S., Harris, M., and Zaki, H. (2017). The Ex Vivo Colon Organ Culture and Its Use in Antimicrobial Host Defense Studies. *J. Vis. Exp.* 120, e55347.
- UE (2003a). Directive 2002/95/CE, relative à la limitation de l'utilisation de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques.
- UE (2003b). DIRECTIVE 2003/5/CE modifiant la directive 91/414/CEE.
- UE (2005). Regulation (EC) N°396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- UE (2011). COMMISSION REGULATION (EU) No 835/2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs.
- UE (2014). RÈGLEMENT (UE) No 1327/2014 DE LA COMMISSION modifiant le règlement (CE) no 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les viandes, produits de viande, poissons et produits de la pêche fumés de façon.
- UE (2016). Règlement (UE) n°2016/293 du 01/03/16 modifiant le règlement (CE) n°850/2004 concernant les polluants organiques persistants en ce qui concerne l'annexe I.
- Ueng, T., Chang, Y., Tsai, Y., Su, J., Chan, P., Shih, J., et al. (2010). Potential roles of fibroblast growth factor-9 in the benzo(a)pyrene-induced invasion in vitro and the metastasis of human lung adenocarcinoma. *Arch. Toxicol.* 84, 651–660.
- Ufarté, L., Laville, É., Duquesne, S., and Potocki-Veronese, G. (2015). Metagenomics for the discovery of pollutant degrading enzymes. *Biotechnol. Adv.* 33, 1845–1854.
- Underhill, D. M., and Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 405–416.
- UNEP (2009). Stockholm convention on POPs.
- US-EPA (2003). Non-dioxin-like PCBs: effects and consideration in ecological risk assessment.

- US-EPA (2014). Preliminary Materials for the Integrated Risk Information System (IRIS) Toxicological Review of Hexabromocyclododecane (HBCD).
- US-EPA (2017). TOXICOLOGICAL REVIEW OF BENZO[a]PYRENE.
- US-EPA, and IRIS (2012). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD); CASRN 1746-01-6. Available at: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=326.
- van Beilen, J. B., Neuenschwander, M., Smits, T. H. M., Roth, C., Balada, S. B., and Witholt, B. (2002). Rubredoxins Involved in Alkane Oxidation. *J. Bacteriol.* 184, 1722–1732.
- Van de Wiele, T. R., Peru, K. M., Verstraete, W., Siciliano, S. D., and Headley, J. V (2004a). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, formed in a simulator of the human gastrointestinal tract. *J. Chromatogr. B* 806, 245–253.
- Van de Wiele, T. R., Verstraete, W., and Siciliano, S. D. (2004b). Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the in vitro gastrointestinal tract. *J. Environ. Qual.* 33, 1343–1353.
- Van de Wiele, T., Van den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S., and Marzorati, M. (2015). “The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME ®),” in *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health*, 305–317. doi:10.1007/978-3-319-16104-4.
- Van de Wiele, T., Van Praet, J. T., Marzorati, M., Drennan, M. B., and Elewaut, D. (2016). How the microbiota shapes rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 398–411.
- Van de Wiele, T., Vanhaecke, L., Boeckaert, C., Peru, K., Headley, J., Verstraete, W., et al. (2005). Human Colon Microbiota Transform Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Estrogenic Metabolites. *Environ. Health Perspect.* 113, 6–10. doi:10.1289/ehp.7259.
- Van den Abbeele, P., Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W. M., Thas, O., et al. (2012). Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* 7, 949–961.
- van der Ven, L. T. M., Verhoef, A., van de Kuil, T., Slob, W., Leonards, P. E. G., Visser, T. J., et al. (2006). A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats. *Toxicol. Sci.* 94, 281–292.
- Van Herwaarden, A. E., Van Waterschoot, R. A. B., and Schinkel, A. H. (2009). How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 223–227.
- Vanhaecke, L., Van Hoof, N., Van Brabandt, W., Soenen, B., Heyerick, A., De Kimpe, N., et al. (2006). Metabolism of the Food-Associated Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by Human Intestinal Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3454–3461.
- Vatanen, T., Kostic, A. D., Hennezel, E., Cullen, T. W., Knip, M., Xavier, R. J., et al. (2016). Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans Article. *Cell* 165, 1–12.
- Venema, K. (2015). The TNO In Vitro Model of the Colon (TIM-2). *Impact Food Bioact. Heal. Vitro. Ex Vivo Model.* 26, 293–304.
- Venema, K., and van den Abbeele, P. (2013). Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 115–26. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.002.
- Verbeke, K. A., Boobis, A. R., Chiodini, A., Edwards, C. A., Franck, A., Kleerebezem, M., et al. (2015). Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 28, 42–66.
- Verdu, E. F., Galipeau, H. J., and Jabri, B. (2015). Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 497–506.
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van De Kamp, E., Rempelberg, C. J. M., and Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.* 43, 31–40.

- Veyrand, B., Sirot, V., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Dervilly-Pinel, G., et al. (2013). Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Results of the second French Total Diet Study. *Environ. Int.* 54, 11–17.
- Viau, C., Zaoui, C., and Charbonneau, S. (2004). Dietary fibers reduce the urinary excretion of 1-hydroxypyrene following intravenous administration of pyrene. *Toxicol. Sci.* 78, 15–19.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., et al. (2010). Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science (80-.)*. 328, 228–231.
- Viluksela, M., van der Ven, L. T. M., Schrenk, D., Lilienthal, H., Andersson, P. L., Halldin, K., et al. (2012). Biological and toxicological effects of non-dioxin-like PCBs. *Acta Vet. Scand.* 54, S16.
- Voortman, T., Hendriks, H. F., Witkamp, R. F., and Wortelboer, H. M. (2012). Effects of Long- and Short-Chain Fatty Acids on the Release of Gastrointestinal Hormones using an ex Vivo Porcine Intestinal Tissue Model. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9035–9042.
- Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H. U., and Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab.* 24, 41–50.
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., et al. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J.* 5, 220–230.
- Walujkar, S. A., Dhotre, D. P., Marathe, N. P., Lawate, P. S., Bharadwaj, R. S., and Shouche, Y. S. (2014). Characterization of bacterial community shift in human Ulcerative Colitis patients revealed by Illumina based 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Gut Pathog.* 6, 22.
- Wampach, L., Heintz-Buschart, A., Hogan, A., Muller, E. E. L., Narayanasamy, S., Laczny, C. C., et al. (2017). Colonization and Succession within the Human Gut Microbiome by Archaea, Bacteria, and Microeukaryotes during the First Year of Life. *Front. Microbiol.* 8, 738.
- Wang, L., Conlon, M. A., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., and Angley, M. T. (2014). Gastrointestinal microbiota and metabolite biomarkers in children with autism spectrum disorders. *Biomark. Med.* 8, 331–344.
- Wang, W. L., Xu, S. Y., Ren, Z. G., Tao, L., Jiang, J. W., and Zheng, S. Sen (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J. Gastroenterol.* 21, 803–814.
- Wang, X., and Gibson, G. R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria in the large human intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 373–380.
- Wang, Y., Hatt, J. K., Tsementzi, D., Rodriguez-R, L. M., Ruiz-Pérez, C. A., Weigand, M. R., et al. (2017). Quantifying the importance of the rare biosphere for microbial community response to organic pollutants in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e03321-16.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., et al. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472, 57–63.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Mataka, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484–489.
- Wei, Y., Zhao, L., He, W., Yang, J., Geng, C., Chen, Y., et al. (2016). Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc. *Int. J. Oncol.* 49, 2055–2063.
- Weiland-Brauer, N., Fischer, M. A., Schramm, K.-W., and Schmitz, R. A. (2017). Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Potential of Microbes Present in a Cryoconite of Jamtalferner Glacier. *Front. Microbiol.* 8, 1105.
- Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. V., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C., et al. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455, 1109–1113.

- Wheeler, M. L., Limon, J. J., Bar, A. S., Leal, C. A., Gargus, M., Tang, J., et al. (2016). Immunological Consequences of Intestinal Fungal Dysbiosis. *Cell Host Microbe* 19, 865–873.
- White, A. J., Bradshaw, P. T., Herring, A. H., Teitelbaum, S. L., Beyea, J., Stellman, S. D., et al. (2016). Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environ. Int.* 89–90, 185–192.
- WHO (1998). Assessment of the health risk of dioxins: Re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI). doi:10.1080/713810655.
- WHO (2003). Polychlorinated biphenyls : Human health aspects.
- WHO, and IARC (1993). Some Naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
- WHO, and WPRO (2015). Meeting Report of the 5th International Workshop on Total Diet Studies convened by WHO, WPRO, the Ministry of Food and Drug Safety and the Korea Health Industry Development Institute.
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., et al. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *PNAS* 106, 3698–3703.
- Williams, C. F., Walton, G. E., Jiang, L., Plummer, S., Garaiova, I., and Gibson, G. R. (2015). Comparative Analysis of Intestinal Tract Models. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 329–350.
- Willing, B. P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A. F., Lucio, M., Zheng, Z., et al. (2010). A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 139, 1844–1854.
- Wilson, I. D., and Nicholson, J. K. (2016). Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* 179, 204–222.
- Woting, A., and Blaut, M. (2016). The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients* 8, 202.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Keilbaugh, S. A., et al. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* (80-.). 334, 105–108.
- Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., et al. (2013). Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. *Microb. Ecol.* 66, 462–470.
- Wu, X., He, B., Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Li, D., et al. (2016). Molecular insight into gut microbiota and rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 431.
- Xiao, L., Feng, Q., Liang, S., Sonne, S. B., Xia, Z., Qiu, X., et al. (2015). A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat. Biotechnol.* 33, 1103–1108.
- Xiao, S., Guo, J., Yun, B. H., Villalta, P. W., Krishna, S., Tejpal, R., et al. (2016). Biomonitoring DNA Adducts of Cooked Meat Carcinogens in Human Prostate by Nano Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry: Identification of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine DNA Adduct. *Anal. Chem.* 88, 12508–12515.
- Xing, G. H., Yang, Y., Yan Chan, J. K., Tao, S., and Wong, M. H. (2008). Bioaccessibility of polychlorinated biphenyls in different foods using an in vitro digestion method. *Environ. Pollut.* 156, 1218–1226.
- Xiong, W., Abraham, P., Li, Z., Pan, C., and Hettich, R. L. (2015). Microbial metaproteomics for characterizing the range of metabolic functions and activities of human gut microbiota. *Proteomics* 15, 3424–3438.
- Yamashiro, K., Tanaka, R., Urabe, T., Ueno, Y., Yamashiro, Y., Nomoto, K., et al. (2017). Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. *PLoS One* 12, e0171521.

- Yan, L., Sinkko, H., Penttinen, P., and Lindstrom, K. (2016). Characterization of successional changes in bacterial community composition during bioremediation of used motor oil-contaminated soil in a boreal climate. *Sci. Total Environ.* 542, 817–825.
- Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A., Tsuda, M., Hachimura, S., Takahashi, Y., et al. (2009). Bacteroides Induce Higher IgA Production Than Lactobacillus by Increasing Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in B Cells in Murine Peyer's Patches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 372–377.
- Yang, P., Wang, Y., Sun, L., Chen, Y., Liu, C., Huang, L., et al. (2017). Urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons, sperm DNA damage and spermatozoa apoptosis. *J. Hazard. Mater.* 329, 241–248.
- Yang, T., Santisteban, M. M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J. M., et al. (2015). Gut Microbiota Dysbiosis is Linked to Hypertension. *Hypertension* 65, 1331–1340.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nat.* 2012 486, 222–227.
- Yee, A. L., and Gilbert, J. A. (2016). Is triclosan harming your microbiome? *Science (80-)*. 353, 348–349.
- Yen, S., McDonald, J. A. K., Schroeter, K., Oliphant, K., Sokolenko, S., Blondeel, E. J. M., et al. (2015). Metabolomic analysis of human fecal microbiota: A comparison of feces-derived communities and defined mixed communities. *J. Proteome Res.* 14, 1472–1482.
- Yeoh, Y. K., Dennis, P. G., Paungfoo-Lonhienne, C., Weber, L., Brackin, R., Ragan, M. A., et al. (2017). Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nat. Commun.* 8, 215.
- Yi, S. W., Hong, J. S., Ohrr, H., and Yi, J. J. (2014). Agent Orange exposure and disease prevalence in Korean Vietnam veterans: The Korean veterans health study. *Environ. Res.* 133, 56–65.
- Yim, Y.-J., Seo, J., Kang, S.-I., Ahn, J.-H., and Hur, H.-G. (2008). Reductive Dechlorination of Methoxychlor and DDT by Human Intestinal Bacterium *Eubacterium limosum* Under Anaerobic Conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 406–411.
- Yu, Y.-X., Li, J.-L., Zhang, X. Y., Yu, Z.-Q., Van de Wiele, T., Han, S.-Y., et al. (2010). Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents. *J. Agric. Food Chem.* 58, 301–308.
- Yu, Y., Han, S., Zhang, D., Van De Wiele, T., Lu, M., Wang, D., et al. (2009). Factors affecting the bioaccessibility of polybrominated diphenylethers in an in vitro digestion model. *J. Agric. Food Chem.* 57, 133–139.
- Yu, Y. X., Huang, N. B., Zhang, X. Y., Li, J. L., Yu, Z. Q., Han, S. Y., et al. (2011). Polybrominated diphenyl ethers in food and associated human daily intake assessment considering bioaccessibility measured by simulated gastrointestinal digestion. *Chemosphere* 83, 152–160.
- Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., and Cortés-Espinosa, D. V. (2017). Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere* 172, 120–126.
- Zafra, G., and Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 19426–19433.
- Zafra, G., Taylor, T. D., Absalon, A. E., and Cortés-Espinosa, D. V. (2016). Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. *J. Hazard. Mater.* 318, 702–710.
- Zelante, T., Iannitti, R. G., Cunha, C., DeLuca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385.
- Zeller, P., Bricks, T., Vidal, G., Jacques, S., Anton, P. M., and Leclerc, E. (2015). Multiparametric temporal analysis of the Caco-2/TC7 demonstrated functional and differentiated monolayers as early as 14 days of culture. *Eur. J. Pharm. Sci.* 72, 1–11.

- Zhang, J., Empl, M. T., Schwab, C., Fekry, M. I., Engels, C., Schneider, M., et al. (2017). Gut microbial transformation of the dietary imidazoquinoxaline mutagen MeIQx reduces its cytotoxic and mutagenic potency. *Toxicol. Sci.* 159, 266–276.
- Zhang, J., Guo, Z., Xue, Z., Sun, Z., Zhang, M., Wang, L., et al. (2015a). A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *ISME J.* 9, 1979–1990.
- Zhang, L., Nichols, R. G., Correll, J., Murray, I. A., Tanaka, N., Smith, P. B., et al. (2015b). Persistent Organic Pollutants Modify Gut Microbiota – Host Metabolic Homeostasis in Mice Through Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Environ. Health Perspect.* 123, 679–688.
- Zhang, S., Jin, Y., Zeng, Z., Liu, Z., and Fu, Z. (2015c). Subchronic Exposure of Mice to Cadmium Perturbs Their Hepatic Energy Metabolism and Gut Microbiome. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 2000–2009.
- Zhang, X., Zhang, D., Jia, H., Feng, Q., Wang, D., Liang, D., et al. (2015d). The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* 21, 895–905.
- Zhang, Y., Zhao, F., Deng, Y., Zhao, Y., and Ren, H. (2015e). Metagenomic and metabolomic analysis of the toxic effects of trichloroacetamide-induced gut microbiome and urine metabolome perturbations in mice. *J. Proteome Res.* 14, 1752–1761.
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., et al. (2016). Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* (80-.). 352, 565–569.
- Zhu, W., Gregory, J. C., Org, E., Buffa, J. A., Gupta, N., Li, L., et al. (2016). Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell* 165, 111–124.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B., and Mills, D. A. (2011). Human milk glycobioime and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *PNAS* 108, 4653–4658.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., and De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3854–3859.

ANNEXES

[Annexe I.](#)

Capturing prokaryotic dark matter genomes

Gasc C, Ribière C, Parisot N, Beugnot R, Defois C, Petit-Biderre C, Boucher D, Peyretailade E, Peyret P

Research in Microbiology (2015)



ELSEVIER



CrossMark



Institut Pasteur

Research in Microbiology 166 (2015) 814–830



www.elsevier.com/locate/resmic

Capturing prokaryotic dark matter genomes

Cyrielle Gasc^{a,1}, Céline Ribière^{a,1}, Nicolas Parisot^b, Réjane Beugnot^a, Clémence Defois^a,
Corinne Petit-Biderre^c, Delphine Boucher^a, Eric Peyretailade^{a,**}, Pierre Peyret^{a,*}

^a Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4678 CIDAM, BP 10448, F-63001 Clermont-Ferrand, France

^b Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions, UMR203 BF2I, INRA, INSA-Lyon, Université de Lyon, Villeurbanne, France

^c Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS),
Unité Mixte de Recherche (UMR) 6023, F-63171 Aubière, France

Received 3 March 2015; accepted 3 June 2015

Available online 20 June 2015

Abstract

Prokaryotes are the most diverse and abundant cellular life forms on Earth. Most of them, identified by indirect molecular approaches, belong to microbial dark matter. The advent of metagenomic and single-cell genomic approaches has highlighted the metabolic capabilities of numerous members of this dark matter through genome reconstruction. Thus, linking functions back to the species has revolutionized our understanding of how ecosystem function is sustained by the microbial world. This review will present discoveries acquired through the illumination of prokaryotic dark matter genomes by these innovative approaches.

© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Dark matter; Metagenomics; Single-cell genomics; Complete genome reconstruction

1. Introduction

With an estimated total number of $4\text{--}6 \times 10^{30}$ cells, prokaryotes are the most diverse and abundant cellular life forms on Earth [190]. For example, 1 g of soil may contain up to 10^9 bacterial cells [190], and mathematical treatment of the data suggests that 10^6 distinct prokaryotic taxa may be present [27,54,184]. Prokaryotes are small and undergo a rapid cell cycle coupled with a metabolic versatility that enables them to be key players in the functioning of all ecosystems, even the

most extreme ones [190]. Nevertheless, studies aiming to investigate the diversity and functions of microbial communities have been hampered by the inability of the vast majority of microorganisms to grow in standard culture media [19,188]. Consequently, molecular approaches that circumvent limitations related to bacterial cultivation have increasingly been applied. The PCR amplification of marker genes was first performed to define barcodes that reflect the phylogenetic diversity of the studied environment [63] as reviewed in many papers [5,22,186]. Thus, the classical method used to characterize members of complex microbial communities relies on 16S small subunit ribosomal RNA gene (16S rRNA) analysis. Using this approach, the taxonomical classification of prokaryotes was refined [41,119], and new branches of the tree of life, termed candidate divisions, have been uncovered from various ecosystems. Today, at least 60 major branch points (phyla or divisions) in the bacterial and archaeal domains of life have been identified [80], with approximately half being represented by candidate divisions [62].

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: cyrielle.gasc@udamail.fr (C. Gasc), celine.ribiere1@udamail.fr (C. Ribière), nicolas.parisot@insa-lyon.fr (N. Parisot), rejane.beugnot@udamail.fr (R. Beugnot), clemence.defois@udamail.fr (C. Defois), corinne.PETIT@univ-bpclermont.fr (C. Petit-Biderre), delphine.boucher@udamail.fr (D. Boucher), eric.peyretailade@udamail.fr (E. Peyretailade), pierre.peyret@udamail.fr (P. Peyret).

¹ These authors contributed equally to this work.

The first application of high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing has also revealed the rare biosphere [168]. Indeed, the long tail in rank-abundance curves used to depict diversity demonstrates that natural microbial communities are typically composed of a large number of rare bacterial taxa that may be representatives of unidentified microbial lineages [20,88]. In addition, even the highly abundant genera and species comprise multiple strains, some of which may be included in the rare biosphere group [90]. Furthermore, members of the rare biosphere may become abundant depending on environmental conditions [17,82]. Finally, some studies focused on these populations have shown that a significant portion was active in the environment [17,82], sometimes even more active than abundant taxa [83], and played crucial roles in biogeochemical cycles and overall metabolic fluxes [196]. These different observations allowed the reclassification of the rare biosphere as not being simply a dormant seed bank and suggested that its ecological significance [141] and roles should be further evaluated.

Microbiologists are additionally confronted with a problem similar to that of astrophysicists: dark matter. As astrophysicists deduced the existence of a large amount of yet-undetected mass in the universe by indirect approaches, microbiologists can only estimate the main part of microbial diversity using techniques such as barcoding analysis. Indeed, it has been estimated that <1% of bacterial species have been axenically cultured [132,146], thus confirming that we have merely touched upon the environmental microbial world. Terms such as “biological dark matter” and “microbial dark matter” [36,110,153] have then been proposed to describe this vast uncultured microbial world [72]. Consequently, illuminating this microbial dark matter by complete genome sequencing is a real challenge in microbial ecology. Indeed, to improve our understanding of ecosystem functioning, it is necessary to obtain deeper insight into microbial processes and to establish a link between identified microbial populations and metabolic capabilities in the environment, even for its members present at very low abundance [104].

The development of cultivation-independent methods has led to obtaining drafts or complete genomes of vast numbers of uncultured prokaryotes from complex environments. Acquisition of these genomes has led to a better defined classification of superphyla, phyla and candidate divisions [153], as well as a better knowledge of microbial evolutionary history [114,157]. In addition, genome reconstruction of uncultured prokaryotes permits highlighting ecosystem functioning and revealing new metabolic potentialities, so far unsuspected [49,110,176,185,194]. However, separated from other data, functional information obtained from genomic analyses should be considered as clues rather than strong evidence. Thus, the aim of this review is to expose contributions to the microbial ecology of genome reconstruction by metagenomic strategies through the different sequencing generations and by two new approaches to complexity reduction, single-cell genomics (SCG) and gene capture.

2. Illuminating microbial dark matter genomes via metagenomic approaches

Successive sequencing improvements combined with dedicated bioinformatics tools (Fig. 1) have contributed to the exponential acquisition of complete genomes (Tables 1 and 2 and Supplementary Table S1).

2.1. The first genomes from the first sequencing generation

Shotgun sequencing of complex samples, hereafter defined as metagenomics, provides valuable information on the genomes of uncultivated microbial lineages. The pioneering study used metagenomics and the Sanger sequencing method to reconstruct two genomes of uncultured bacteria (i.e., *Leptospirillum* group II and *Ferroplasma* group II) from an acid mine drainage (AMD) pink biofilm composed of only five bacterial and archaeal dominant taxa [185]. Genome analyses have provided insight into their nutritional requirements and biogeochemical functions. Similarly, metagenomic analysis of an anaerobic digester has provided a first glimpse of the bacterial division WWE1 [142]. The genome of *Candidatus* ‘*Cloacamonas acidaminovorans*’, a representative bacterium of this division, was reconstructed, and its annotation revealed that this organism is probably a syntrophic bacterium whose microbial partners are still unknown. With the same sequencing approach, an almost complete genome sequence for a single dominant green sulfur bacteria species (*Chlorobiaceae*) from the O₂–H₂S interface of the water column of Ace Lake Antarctica was assembled [130]. Based on metaproteogenomic analyses, the authors have proposed an explanation for the active biological processes promoted by those cold-adapted green sulfur bacteria, likely involving the synthesis of mono-unsaturated lipids. Symbiotic lifestyles have also been explored through genome reconstruction, as was the case for *Candidatus* ‘*Liberibacter asiaticus*’ from infected psyllids [38], *Cenarchaeum symbiosum* from sponges [69] and *Gamma*- and *Deltaproteobacteria* from the marine oligochaete *Olavius algarvensis* [192].

In a few studies, nearly complete genomes were also obtained after Sanger shotgun sequencing of enrichment cultures such as anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacterium, *Kuenenia stuttgartiensis*, from an anoxic bioreactor [173], *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’ strain UW-1 in the enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process [56], rice cluster I archaea, the key methane producer in the rice rhizosphere [48] and *Candidatus* ‘*Nitrospira defluvii*’, from an activated sludge that differs dramatically from other known nitrite oxidizers, suggesting multiple independent evolution events of chemolithoautotrophic nitrite oxidation [105]. The genome of *Candidatus* ‘*Korarchaeum cryptofilum*’, belonging to the Korarchaeota candidate division, was obtained after enrichment culture based on its ability to resist high sodium dodecyl sulfate concentrations [44]. Phylogenetic analysis and metabolic investigations have revealed that this Korarchaeota member might have retained a set of cellular features representing the ancestral archaeal form and that

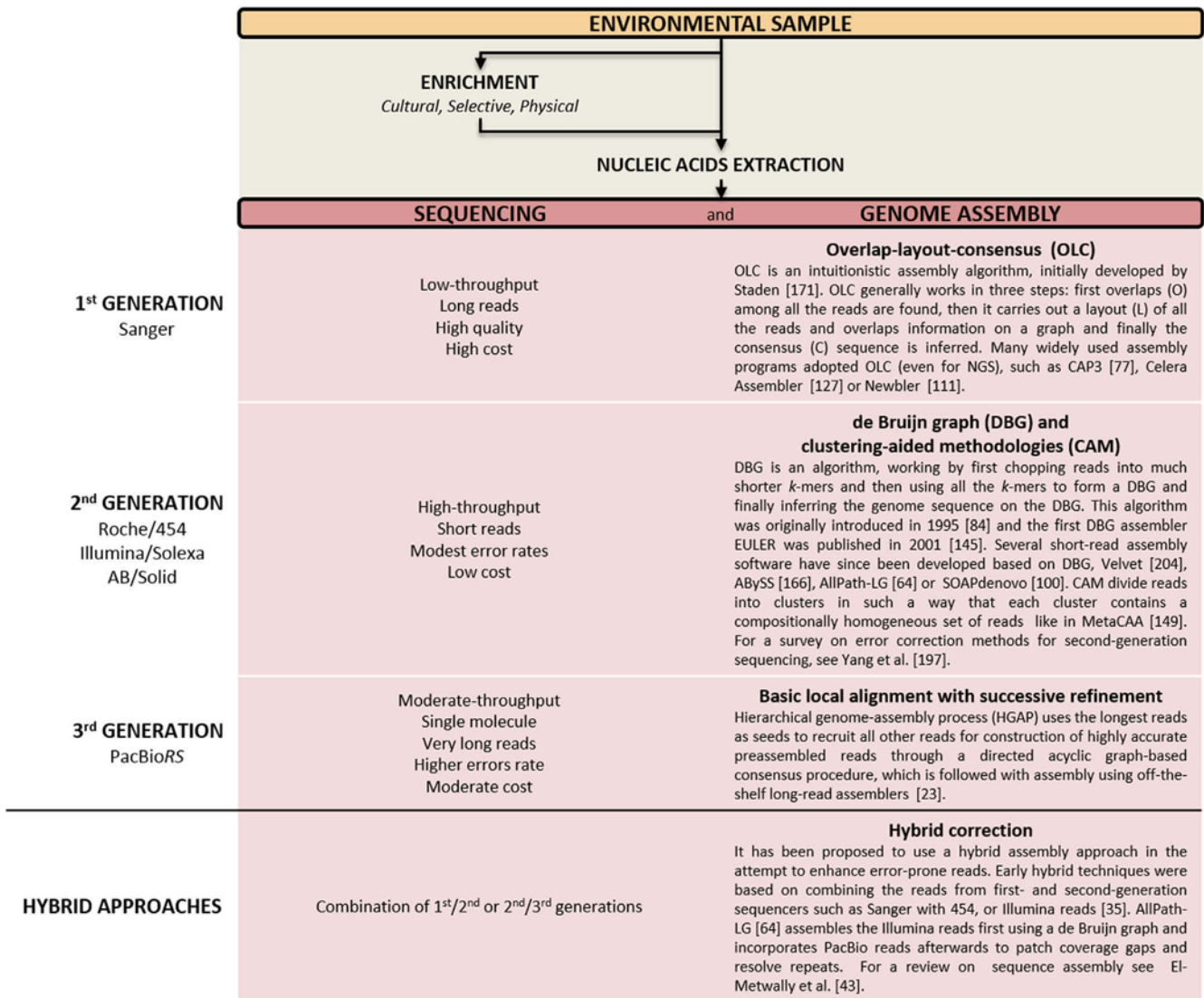


Fig. 1. Overview and features of metagenomic strategies in microbial ecology [23,35,43,64,77,84,100,111,127,145,149,166,171,197,204].

some essential nutrients for growth could be supplied in situ by other mat-forming organisms. Genomic data from three other archaeal lineages (*Candidatus* ‘Micrarchaeum acidiphilum’, *Candidatus* ‘Parvarchaeum acidiphilum’ and *Candidatus* ‘Parvarchaeum acidophilus’ [6,103]) have described inter-organism interactions in biofilms and the formation of large internal organelles with unknown functions. Finally, to target microbial subpopulations, Kalyuzhnaya et al. [87] used stable isotope probing to reveal a novel methylotroph, *Methylotenera mobilis*.

2.2. Next-generation sequencing (NGS) accelerates genome acquisition

The development of high-throughput low cost sequencing methods (Roche 454 pyrosequencing, Illumina Solexa technologies, SOLiD/Life Technologies/APG, and Ion Torrent) has subsequently facilitated the reconstruction of additional microbial dark matter genomes. High-throughput metagenomic

approaches first targeted large DNA fragments from fosmid libraries to reduce complexity and subsequently facilitate sequence assembly. This strategy was used to obtain the composite genomes of *Candidatus* ‘Caldiarchaeum subterraneum’ [136] and *Candidatus* ‘Acetothermum autotrophicum’ [177]. As the *Candidatus* ‘C. subterraneum’ genome was found to be clearly distinct from those of known archaeal divisions and to encode a eukaryotic protein modifier system prototype [136], *Candidatus* ‘A. autotrophicum’ is considered one of the earliest diverging bacterial lineages and has a substantially different acetyl-CoA pathway [177]. By subjecting DNA extracted from an enrichment culture to 454 pyrosequencing and Sanger paired-end sequencing on shotgun and fosmid libraries, the genome of *Candidatus* ‘Scalindua profunda’, an anammox bacteria, was obtained [187]. With a greater ability to utilize small organic acids and oligopeptides as well as the capability to use nitrate, nitrite and metal oxides as terminal electron acceptors, this bacterium is very different from its freshwater counterparts. Combined Sanger and

Table 1
Main candidate phylum genomes obtained with metagenomics and/or single-cell genomics approaches.

Kingdom	Candidate phylum	First description in	Sequenced genomes	
			Metagenomics	SCG
Bacteria	AD3	Sandy surface soils [206]	–	–
	BD1-5 group/GN02 [Gracilibacteria]	Guerrero Negro hypersaline microbial mat [98]	5 [196]	2 [153]
	BH1	Near-boiling silica-depositing thermal springs [11]	–	–
	BRC1/NKB19 [Hydrogenedentes]	Bulk soil and rice roots (BRC1 means Bacterial Rice Cluster) [32]	1 [133]	4 [133,153]
	CD12/BHI80-139 [Aerophobetes]	– [153]	–	1 [153]
	EM3 (former OP2)	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [81]	–	1 [153]
	GN01	Guerrero Negro hypersaline microbial mat [98]	–	–
	GN04	Guerrero Negro hypersaline microbial mat [98]	–	–
	GOUTA4	Monochlorobenzene-contaminated groundwater [3]	–	–
	KSB1	Sulfide-rich black mud from marine coastal environments [180]	–	–
	LD1	Anoxic marine sediments [52]	–	–
	Marine Group A/SAR406 [Marinimicrobia]	Subsurface of Atlantic and Pacific oceans [53]	1 [133]	22 [133,153]
	MVP-15	Suboxic freshwater pond [16]	–	–
	NC10	Aquatic microbial formations in flooded caves [74]	1 [49]	–
	OD1/WWE3 [Parcubacteria]	Obsidian Pool, Yellowstone National Park (OD1 means OP11-derived 1) [71]	28 [88,195,196]	9 [153]
	OP1/KB1 group [Acetothermia]	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [81]	1 [177]	–
	OP11 [Microgenomates]	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [81]	17 [195,196]	–
	OP3 [Omnitrophica]	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [81]	–	4 [153]
	OP8 [Aminicenantes]	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [81]	–	36 [153]
	OP9/JS1 [Atribacteria]	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [81]	2 [36,133]	18 [36,133,153]
	Poribacteria	Marine sponge-associated [50]	–	1 [165]
	SBR1093	Activated sludge from an industrial wastewater treatment system [96]	–	–
	SC4	Arid soil from Arizona [40]	–	–
	SPAM	Alpine soil in the Colorado Rocky Mountains (SPAM means Spring Alpine Meadow) [102]	–	–
	SR1	Hydrocarbon-contaminated aquifer (SR means “Sulfur River”) [37]	2 [88,196]	1 [18]
	TM6	Peat bog (TM means Torf, Mittlere schicht) [150]	–	1 [121]
	TM7	Peat bog (TM means Torf, Mittlere schicht) [150]	5 [2,88]	2 [110,148]
	WPS-2	Wittenberg polluted soil [135]	–	–
	WS1	Wurtsmith Air Force Base, Michigan [37]	–	2 [133,153]
	WS2	Wurtsmith Air Force Base, Michigan [37]	–	–
WS3 [Latescibacteria]	Wurtsmith Air Force Base, Michigan [37]	–	7 [153]	
WS6	Wurtsmith Air Force Base, Michigan [37]	–	–	
WWE1 [Cloacimonetes]	Municipal Anaerobic Sludge Digester [25]	2 [133,142]	3 [133]	
ZB3	Mesophilic sulfide-rich spring [46]	–	–	
Archaea	Korarchaeota	Obsidian Pool, Yellowstone National Park [7]	1 [44]	–
	Nanoarchaeota	Submarine hot vent [78]	–	–

Based on the works of Rinke et al. [153], McDonald et al. [119], Riesenfeld et al. [151] and Hugenholtz [79] and on information available on the Greengenes, Silva and RDP databases (in February 2015).

pyrosequencing approaches were also used to highlight the seven dominant bacterial genomes of an AMD highly contaminated with arsenic that are involved in the natural attenuation of such anthropized ecosystems [8]. Two of these genomes named *Candidatus* ‘Fodinabacter communicans’ be long to a novel bacterial phylum. To appreciate the EBPR process mediated by polyphosphate-accumulating organisms (PAOs), Sanger, pyrosequencing and Illumina technologies were applied to define another *Accumulibacter* reference genome: *Candidatus* ‘Accumulibacter sp.’ strain UW-2 [51]. Unlike UW-1 [56], the UW-2 genome seemed to lack genes for nitrogen and carbon fixation, but metabolic genes essential for denitrification and EBPR were conserved. Finally, such an approach enabled analysis of an uncultured marine

Actinobacteria genome, *Candidatus* ‘Actinomarinidae’, revealing a photoheterotrophic lifestyle [58].

Examples of genome reconstruction using only high-throughput sequencing methods directly on extracted DNA from low diversity ecosystems have been successfully described. To gain an understanding of the phylogenetic community structure and metabolic potential of a low-diversity mineral soil metagenome, Lynch et al. [106] analyzed DNA extracted from a high elevation Atacama Desert volcano debris field. The identified genome of *Pseudonocardia* sp. encodes complete pathways for the utilization of various low molecular weight atmospheric substrates (H₂, CO and several organic C1 compounds) and CO₂ fixation. From highly acidic biofilms (pH 0–1) and AMD, near complete *Thermoplasmatales* genomes

Table 2
Main non-candidate prokaryotic phylum genomes obtained with metagenomics and/or single-cell genomics approaches.

Kingdom	Phylum	Sequenced genomes	
		Metagenomics	SCG
Bacteria	Acidobacteria	2 [8,55]	–
	Actinobacteria	36 [58,59,106,131]	12 [57,61]
	Aquificae	–	–
	Armatimonadetes	–	2 [133,153]
	Bacteroidetes	135 [2,131,179,195]	14 [45,66,73,193,194]
	Caldiserica	2 [133]	2 [133,153]
	Caldithrix	–	–
	Chlamydiae	–	–
	Chlorobi	2 [130,172]	–
	Chloroflexi	3 [133,195,201]	1 [133]
	Chrysiogenetes	–	–
	Cyanobacteria	23 [34,131,169]	2 [68,154]
	Deferribacteres	–	–
	Dictyoglomi	–	–
	Elusimicrobia	–	–
	Fibrobacteres	–	–
	Firmicutes	453 [76,99,131,133,155,195]	16 [73,133,139,178]
	Fusobacteria	2 [131]	–
	Gemmatimonadetes	–	–
	Lentisphaerae	2 [131]	–
	Nitrospirae	5 [76,105,185]	–
	Planctomycetes	3 [133,173]	1 [45]
	Proteobacteria	96 [2,8,38,51,56,70,76,87,91,97,101,108,109,120,131,134,137,167,183,192,195]	25 [24,42,45,47,73,92,116,117,126,133,148,176]
	Spirochetes	3 [131,133,195]	40 [73,133,153]
	Synergistetes	–	2 [133,153]
	Tenericutes	32 [131]	–
	Thermi	–	–
Thermodesulfobacteria	–	–	
Thermotogae	3 [133,174]	1 [153]	
Verrucomicrobia	4 [2,131]	5 [113]	
Archaea	Crenarchaeota	6 [6,69,136,162]	61 [10,93,153,175]
	Euryarchaeota	32 [6,12,13,48,67,76,85,107,129,131,133,156,185,199]	6 [60,133,153]
	Thaumarchaeota	2 [158,205]	–

Based on information available from the Greengenes database (in February 2015).

have expanded our knowledge of archaeal toxic metal resistance as well as the phylogenetic diversity of this order [86,198,199]. Taking advantage of mate-paired NGS, two marine metagenomic samples have been explored, and the analysis of the marine group II Euryarchaeota genome has clarified the origin of proteorhodopsin, which appears to be a euryarchaeal innovation [85].

Ion Torrent sequencing technology has also been successfully used to investigate new microbial dark matter genomes. As an example, 500 Mbp of Ion Torrent PGM sequence data led to the recovery of the *Candidatus* ‘Methanoflorens stordalenmirensis’ genome, revealing genes necessary for hydrogenotrophic methanogenesis in thawing permafrost [124]. This species appears to be a key mediator of methane-based positive feedback in response to climate warming.

High-throughput sequencing has enabled the acquisition of numerous genomes. Even if most of them are partial, they not only give clues on ecosystem functioning, but improve our knowledge of the evolutionary history of the microbial world. Indeed, the definition of several conserved markers in addition to rRNA genes, in particular for uncultivated microorganisms,

enables establishing a more robust and reliable phylogeny. Then, to expand resolution of the archaeal domain, fourteen draft and two complete genomes have recently been obtained [21]. Genome analysis has improved the resolution of the physiology and structure of the newly proposed DPANN superphylum [21,153]. In the same way, through the analysis of 70 conserved markers, a new archaeal superphylum Proteoarchaeaota was defined and regroups the former phyla Aigarchaea, Crenarchaea, Korarchaea and Thaumarchaea [143]. According to these authors, the former archaeal phyla should be reclassified as classes [144,153], but to date, these new denominations are not included in databases such as Greengenes, SILVA or RDP.

2.3. Enrichments combined with NGS enhance genome data

To ensure comparative genomic analyses of two *Candidatus* ‘Kuenenia stuttgartiensis’ anammox bacterial strains, enrichments were applied before Illumina sequencing [170]. The high sequence identity between these two bacteria

indicates that mobile genetic elements are the main source of variation between these geographically separated strains. Following an enrichment-based culture strategy, a 1.23 Mbp genome of the pelagic ammonia-oxidizing thaumarchaeon *Candidatus* ‘Nitrosopelagicus brevis’ strain CN25 was reported [158]. Because of the ubiquitous presence of *Candidatus* ‘N. brevis’-like sequences in the surface of the ocean, such species may represent a model system for understanding the ecology and evolution of pelagic marine Thaumarchaeota. The well-studied EBPR process was conducted to draft a genome of *Candidatus* ‘Accumulibacter sp.’ strain HKU-1 [109] and to perform eight population genome reconstructions, including seven from phylogenetic clades with no previously sequenced representatives [167]. A major difference between the *Accumulibacter* clades was found in the encoded nitrate reductase type and the capacity to perform subsequent steps in denitrification [167]. Furthermore, in an acetate-fed anaerobic-aerobic membrane bioreactor with deteriorated EBPR, *Candidatus* ‘Defluviococcus tetraformis’ strain TFO71 dominates the microbial community [134]. Genomic analyses have shed light on important differences between *Defluviococcus*-related tetrad formation and PAOs that may contribute to EBPR community competition and deterioration. McIlroy et al. [120] assembled two *Competibacter* genomes representing distinct species from two short-term enrichment cultures. These genomes were the first from any glycogen-accumulating organism (GAO) and provided new insight into the complex interaction and niche competition between PAOs and GAOs in EBPR systems. Moreover, from an enrichment culture, the complete genome of the dominant bacterium (70–80%), *Candidatus* ‘Methylomirabilis oxyfera’, was assembled [49]. Genome annotation of this anaerobic denitrifying bacterium has allowed the detection of a new biological pathway that uses oxygen from denitrification to oxidize methane. Finally, three genomes of the recently identified seventh order of methanogens, the *Methanomassiliicoccales*, were recovered from highly enriched cultures (*Candidatus* ‘Methanomethylophilus alvus’, *Candidatus* ‘Methanomassiliicoccus intestinalis’ and *Methanomassiliicoccus luminyensis*) [12–14,67]. Comparative genomics has suggested an original combination of two main energy conservation processes previously described in other methanogens [14].

Microbial enrichment has also been carried out using morphological criteria. For example, *Thioploca ingrica* filaments were individually removed with forceps from the materials collected, allowing the complete genome to be obtained [91]. The authors showed that *T. ingrica* possesses all of the genes required for complete denitrification and represents the first complete genome sequence of a nitrate-storing sulfur oxidizer. Differential centrifugation has been used to effectively separate the slowly sedimenting *Candidatus* ‘Chloracidobacterium thermophilum’, a chlorophyll-based photoheterotroph belonging to the Acidobacteria phylum [55]. This organism lacks the capacity to reduce carbon, sulfate and nitrate, and seems to be unable to synthesize several amino acids.

2.4. Ultra-high-throughput sequencing combined with innovative assembly strategies accelerates genome discovery

With constant technical improvements in NGS systems, the number of reads produced per run and read length have rapidly increased (e.g., 4.3–5 billion reads per run with the HiSeq4000 and 2×300 bp read length with MiSeq systems). Moreover, to exploit the massive amount of data produced and to take into account microbial diversity, innovative assembly strategies have been developed. Binning input reads (i.e., gathering reads of similar species) is one of most frequently employed approaches [89,128,161] with 238 high-quality microbial genomes reconstructed from human gut microbiome samples [131]. Thus, these developments have ensured the identification of a greater number of genomes in complex environments. From an acetate-amended aquifer, 49 partial to near-complete genomes have been reconstructed [196]. To assemble high-quality, near-complete draft genomes of rare species, composition-independent information as the primary binning approach has been used by Albertsen et al. [2]. With this strategy, 31 bacterial genomes, including rare species (<1% relative abundance) from an activated sludge bioreactor, were reconstructed. Four of these genomes belong to the candidate bacterial phylum TM7 and represent the most complete genomes for this phylum to date.

To facilitate read assembly, researchers have used an iterative approach to address the problem of multiple coverage levels in metagenomic data. Indeed, Wrighton et al. [195] reinforced the contributions of ultra-high-throughput sequencing to understand global metabolic interdependencies between organisms, with the characterization of 87 genomes in an unconfined aquifer. Genomic analyses have revealed that several pathways for anoxic carbon, hydrogen and sulfur cycling in these organisms of candidate phyla BD1-5, OP11, OD1 and PER share features previously documented only in Archaea. The first draft genome from a complex soil metagenome, which corresponds to a novel methanogen, was binned by tetranucleotide frequency and read coverage [107]. It should be noted that the genome reconstruction succeeded due to the relatively high abundance of methanogens in the sample and the low population heterogeneity. Benefiting from the strategies of coverage clustering, GC content filtering and paired-end tracking, the near-complete genome of *Thauera aminoaromatica* MZ1T was assembled [108]. This draft genome provides a new genetic reference to deepen our understanding of this important genus in nitrogen removal from nitrate-contaminated and organic-deficient water systems. Re-examination of a fairly simple, well-studied habitat (hypersaline environments) with a combination of strategic environmental sampling, deep sequencing, and de novo metagenomic assembly has revealed two nearly complete genomes representing a novel archaeal class named *Nanohaloarchaea* [129]. This class is characterized by highly dissimilar metabolic capabilities compared with all previously identified hypersaline microbial species. Ghai et al. [59] recently carried out this same strategy of deep metagenome

sequencing and de novo assembly to define key roles for freshwater Actinobacteria. Seven distinct genomes of uncultured aquatic Actinobacteria were then reconstructed from ~250 million Illumina reads. Genomic analyses revealed how these bacteria are responsible for the biogeochemical cycling of important nutrients in relatively pristine freshwater systems.

Lately, using the “divide and conquer” assembly strategy and integrating a separate metatranscriptomic assembly, eleven draft genomes were successfully reconstructed, of which ten were from rare members of the low-diversity AMD system [76]. As revealed by genomic analyses, these microbial communities have evolved various mechanisms to survive in such an extreme habitat including tolerance to low pH, high heavy metal concentrations and oxidative stress. The complete 2.4 Mbp-long genome of a previously uncultivated *Epsilon-proteobacterium*, *Candidatus* ‘Sulfuricurvum sp.’ RIFRC-1, has been reconstructed via assembly of short-read shotgun metagenomic data using a complexity reduction approach [70]. This organism likely contributes to the subsurface carbon, sulfur, hydrogen and nitrogen cycles.

For some species, an interesting approach using intrinsic genome features (e.g., unusual gene family, gene distribution) can be sufficient to recover complete genomes. For example, the uniqueness of the *Melainabacteria* genomes makes them distinct not only from the genomes of all other organisms in the community but also from coexisting *Melainabacteria* [34]. Using unique features, eight genomes from adult human gut and groundwater were recovered. Metabolic analysis of this new candidate phylum sibling to Cyanobacteria has suggested that the ancestors to both lineages were non-photosynthetic, anaerobic, motile and obligatory fermentative bacteria [34]. Sequencing of additional *Melainabacteria* genomes has suggested that these organisms represent a class within Cyanobacteria and that photosystems were acquired after divergence of the classes *Melainabacteria* and *Oxyphotobacteria* [169].

2.5. Third-generation sequencing: longer is better

The emergence of third-generation sequencing platforms and the potential to sequence longer DNA sequences [125] has provided substantial benefits for genome reconstruction. Indeed, the average read length from the current PacBio RS instrument is ~3,000 bp, but some reads may reach 20,000 bp or longer. For example, using 621,000 PacBio reads, the full-length circular genome sequence of the *Dehalococcoides* sp. named *D. mccartyi* IBARAKI has been determined from a *Dehalococcoides*-enriched culture [201]. Irrespective of the high sequence identity with other *Dehalococcoides* genomes, there are significant differences in the distribution of reductive dehalogenase genes that catalyze the dehalogenation reactions unique to dehalorespiring bacteria. The complete genome of *Candidatus* ‘Nitrososphaera evergladensis’ has been reconstructed using a PacBio platform from a highly enriched culture obtained from agricultural soil and was the first genome analysis of ammonia-oxidizing archaea (AOA) group I.1b isolated from soil [205]. Comparative genomic analyses have revealed unique protein-coding genes (e.g., transporters) and

gene duplications that may be associated with the environmental versatility of this group.

2.6. Limits of metagenomics to genome reconstruction from microbial dark matter

Metagenomic studies actively contribute to the identification of new composite genomes from microbial dark matter, as described above and evidenced by the accumulation of new published studies in the “Genome Announcements” Journal [97,99,101,137,155,156,162,163,172,179]. Nevertheless, only dominant or enriched organisms and communities from low-diversity environments are highlighted through genome reconstruction from metagenomic data. The short read lengths produced by high-throughput platforms present significant hurdles in regard to reconstruction of complete genomes. Indeed, the percentage of reads that can be assembled is directly related to the complexity of the studied microbial community [160,164]. Thus, in general, depending on the sequencing technology and bioinformatics treatments used, the vast majority of metagenomic data can be assembled for very low complexity environments comprising only a few taxa (e.g. 85% in AMD) [185], whereas even with tremendous sequencing effort for very complex ecosystems, only a few reads can be assembled in large contigs (e.g. unassembled sequences represent 76% of input reads in soil ecosystems) [30]. Another obstacle when attempting assembly is intra-species variation. When these variations consist only of single nucleotide polymorphisms (SNPs) or homologous recombination, it is possible to obtain a genome that aggregates a pool of multiple strain sequence types [4]. Consequently, a genome from metagenomic data is always a composite genome that represents a population and not the genome of a single organism [164]. However, although prokaryotic genomes are quite stable from one generation to the next, they are plastic on an evolutionary time scale and are commonly modulated by horizontal gene transfer (HGT), genome rearrangements and the activities of mobile DNA elements [28]. Furthermore, as exchanges of genetic material due to HGT promote microbial diversification, closely phylogenetically related prokaryotes may present a divergent gene catalog. Thus, the reconstruction of genomes from metagenomes is somewhat unreliable, mostly due to this high intraspecies diversity. In fact, genome sequence quality is very variable and error rates must be high compared to genomes obtained from organisms axenically cultured. To overcome such a problem, several long-read sequencing methods, including nanopore sequencing and sequencing by synthesis, coupled with SMRT (single molecule real time) technology (PacBio RS instruments) have been proposed. However, these new sequencing methods are less well developed than the current generation of high-throughput sequencing and are limited by error rates, throughput and cost, even for research applications [90].

Finally, despite constantly improving the throughput of sequencing technologies and bioinformatic tools, the sequencing depth required to provide a comprehensive view of microbial communities remains unaffordable for complex

environments. For example, considering 10^9 prokaryotic cells per gram of soil, and even if some of them are identical, the vast majority present interindividual variations, and assuming 3,000 genes per single bacterial genome [189] with an average length of 1,000 bp per gene, such cells will thus represent up to 3×10^{15} bp. Therefore, Desai et al. [33] estimated that, with the HiSeq2000 instrument (2 billion of sequences, 2×100 bp), 6,000 runs must be realized with a global cost of \$267 million to produce a dataset representing onefold coverage of the microbial community from 1 g of soil. The constant and quick improvement of sequencing technologies reduces the number of runs required, but even with the current HiSeq2500 instrument (4 billion of sequences, 2×125 bp), a substantial number of runs (i.e. 3,000) still need to be realized to cover the microbial community from 1 g of soil.

Metagenomic approaches enable reconstruction of numerous genomes from complex environments. The vast majority of these genomes are partial, qualified as draft because constituted of many contigs, and potential errors may subsist, unlike genomes obtained from cultivated organisms (Supplementary Table S1). However, these genomes have the advantage of originating from environmental microorganisms and therefore allow access to novel phylogenetic and/or functional information. Due to the wide complexity of microbial ecosystems, genome reconstruction through metagenomics often requires preliminary enrichment (culture enrichment, physical separations, bioinformatic treatments, etc.) to be efficient. Constant NGS technical improvements and the development of new bioinformatics strategies will lead to reconstructing a growing number of microbial genomes from complex environments through metagenomic approaches. Furthermore, new strategies of complexity reduction complementary to metagenomics have been developed, such as SCG that allows targeting one specific cell.

3. Illuminating genome dark matter by single-cell genomic approaches

SCG emerged as a powerful tool to enable unprecedented access to genomes present in uncultured microbial communities (Fig. 2). This approach involves numerous steps, from the isolation of single cells from the environmental sample to genome sequencing, cell lysis and whole genome amplification [94,95].

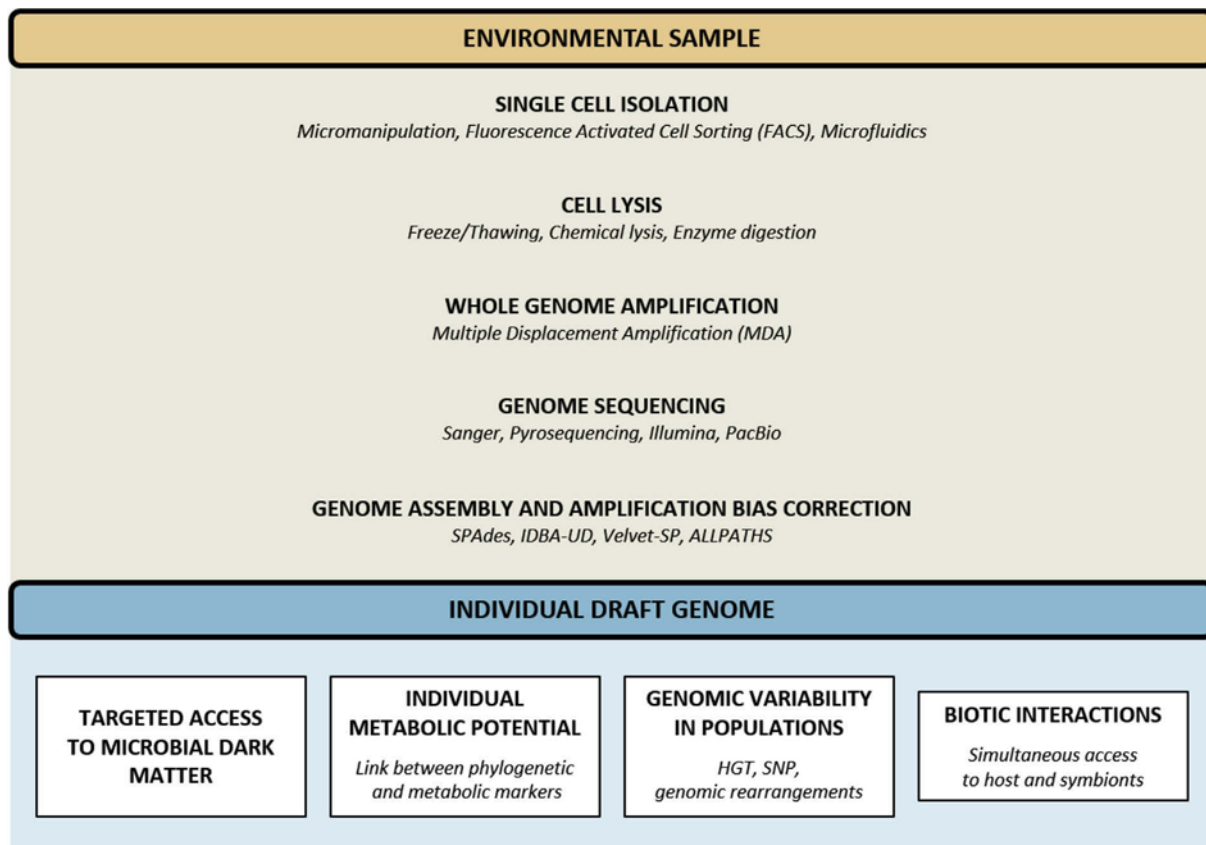
Due to its ability to reconstruct partial or even complete genomes from only one targeted organism, SCG allows exploration of many fields of microbial ecology (Tables 1 and 2 and Supplementary Table S1). This approach has been broadly used to provide gDNA sequences and some nearly complete genomes for numerous major taxa with no sequenced representative genomes in databases. One interesting example is the first genome reconstruction of five low-salinity type AOAs, named *Candidatus* ‘Nitrosoarchaeum limnia’ SFB1, from an enrichment culture [10]. The sequencing of each organism led to 60% genome recovery and the combination of the five genomic sequence datasets permitted the rebuilding of a high-quality draft genome

assembly representing more than 95% of the complete sequence.

SCG presents the advantage of accessing the genetic makeup of single uncultivated microbes directly isolated from environmental samples, but is particularly interesting for its capacity to target microbial dark matter and microorganisms belonging to the rare biosphere, as was highlighted by Marcy et al. [110] and Podar et al. [148]. Indeed, these authors demonstrated the possibility of isolating uncultured TM7 cells present at between 0.7 and 1.9% in the ecosystems studied. They enabled the partial assembly of two genomes, which showed high metabolic complexity that explained the adaptability of TM7 cells to a broad range of environments. Mc Lean et al. [121] assembled the first partial genome from a member of globally distributed candidate phylum TM6, suggesting its symbiotic lifestyle, and Woyke et al. [194] characterized the genome of a coastal ocean water *Flavobacteria* with a proteorhodopsin metabolism that was biogeochemically significant in surface oceans. Others studies provided genomes of filamentous *Beggiatoa* [126], the candidate phylum Poribacteria [165], and even the SAR324 clade of *Deltaproteobacteria* [24], providing new insight into their chemolithoautotrophic, mixotrophic and chemoheterotrophic lifestyles, respectively.

Even the partial reconstruction of genomes with SCG provides essential information on the metabolic capacities of microorganisms, and consequently, on their roles in the environment. A typical example is the partial genome assembly of a single cell belonging to the yet uncultured candidate division OP11 that is widely distributed in terrestrial and marine ecosystems [203]. Little information was initially available regarding these poorly understood bacteria, although their various metabolic capabilities that allow stress responses, production of multiple antibiotics and resistance mechanisms enhancing their survival in diverse and competitive habitats have been shown. Thanks to single-cell analysis, the genomic determination of the heterotrophy of the novel marine protist group of Picobiliphyta, originally defined as phototrophic, has been highlighted [202]. Other notable discoveries include the capacity of *Colwellia* isolated during the Deepwater Horizon oil spill to degrade gaseous and aromatic hydrocarbons [116] and the potential role of *Peptococcaceae* in alkane degradation under methanogenic conditions [178].

Broadly, SCG enables collection of information on the possible role of targeted organisms within ecosystems and their impact on trophic networks. This was well illustrated by Swan et al. [176], who showed chemolithoautotrophy pathways in uncultured *Deltaproteobacteria* cluster SAR324, *Gammaproteobacteria* clusters ARCTIC96BD-19 and Agg47 and some *Oceanospirillales* that constitute a major fraction of dark ocean biomass and could significantly contribute to carbon cycling in the ocean. Additionally, all of the ubiquitous freshwater bacterioplankton clusters such as acI Actinobacteria, *Poly-nucleobacter* sp. and LD12 contain at least one photoheterotrophic member, suggesting that photoheterotrophy is widespread in the euphotic zone of temperate freshwater lakes [114]. Another complementary study revealed that acI Actinobacteria have particular traits that confer competitive advantages when



The list of methods is not exhaustive. Only the most commonly used current methods are presented.

Fig. 2. Single-cell genomics workflow applied to the study of metagenomic communities.

scavenging for energy and nutrients in freshwater habitats, thus explaining their domination of many freshwater ecosystems and their impact on trophic networks [61]. Thus, such precise knowledge of microbial metabolic capabilities through single-cell approaches opens up new horizons for the development of biotechnological and medical applications [68,113,191] and potentially for guided cultivation of uncultured microorganisms [73].

SCG permits a better understanding of the interactions between organisms such as those occurring in symbiosis (commensalism, mutualism and parasitism). Indeed, the simultaneous access to genomes belonging to hosts and symbionts, which are usually not easily accessible through cultivation-independent techniques, provides unique insight into their relationships under true ecological conditions. When sequencing genomes from individual protists and the prokaryotes that are physically associated with them, Martinez-Garcia et al. [112] revealed single-cell-scale interactions between diverse unicellular heterotrophic marine eukaryotes and bacteria, such as the association between *Pelagibacter ubique* and MAST-4 protists or that between *Actinobacterium* and chrysophytes. Furthermore, with SCG, they suggested marine protists prey preferences, such as Gammaproteobacteria grazing among bacterioplankton. Similarly, Hongoh et al. [75] assembled the complete genome of the uncultured bacterium Rs-D17, an intracellular symbiont of protists *Trichonympha*

agili, which themselves are termite *Reticulitermes speratus* gut symbionts. They evidenced that the metabolism of this bacterium belonging to the candidate phylum Termite Group 1 (TG1) coincides with the ecology of wood-feeding termites, thus elucidating the precise interactions among individual members of this multilayered symbiotic community. Another interesting SCG approach was developed to discriminate and isolate *Emiliania huxleyi* microalga cells infected by viruses. This method permitted analysis of the viral genome allowing viral infection mechanism comprehension [115].

Such interactions can induce genome rearrangements in microorganism populations that rapidly diversify, such as gene insertion through HGT and loss. SCG is particularly well suited to detect that type of genomic variability in natural microbial populations compared with metagenomics, due to its capacity to resolve fine-scale heterogeneity at the population level without ambiguity. Good illustrations of this resolution include the discovery of HGT and recombination of rhodopsin genes in freshwater Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria and Actinobacteria [114], as well as the detection of HGT in the MAST-4 lineage, both of which provide insight into its evolutionary history [157]. This technique permitted a better understanding of the extensive variations in protein-coding genes within two bee gut symbionts, *Gilliamella apicola* and *Snodgrassella alvi*, revealing an in situ diversification of bee gut communities [47]. Even more precisely, single-cell

approaches revealed SNPs in ammonia-oxidizing Archaea [10], segmented filamentous bacteria [139] and the *Candidatus* ‘Sulcia muelleri’ DMIN symbiont [193] at the population level, which, combined with genomic data, can confidently resolve phylogenies and inform about organism evolution. These examples illustrate the power of SCG to provide information concerning the fine-scale structure of microbial communities due to its ability to generate high quality non-composite reference genomes.

SCG thus appears to be a particularly interesting and promising technique for understanding ecosystem function. Nevertheless, technical challenges remain. After being isolated from the environment, cells are lysed to access gDNA. This step is one of the most critical because subsequent genomic analyses depend on the quantity and quality of gDNA available, and conventional bulk cell lysis procedures such as physical disruption and chemical handling with ionic surfactants are often irrelevant for single-cell permeation. They subject cells to harsh treatments which cause DNA fragmentation and loss and impact on later genomic analysis [9,200]. After cell lysis, single cell whole genome amplification (WGA) is essential. Some WGA techniques are PCR-based [29,147], but single microbial cell WGA is preferentially performed by multiple displacement amplification (MDA) [115,152,154] even if some biases occur [147]. The first bias of MDA and all WGA methods is related to sample contamination because, after WGA, contaminating DNA can represent a significant fraction likely to be detrimental to subsequent genome assembly, and up to the entirety of DNA products in case of lysis failure. MDA reactions generate chimeras and are subjected to stochastic and sequence-dependent priming at the early stages of the reaction, resulting in substantial variations in the amplifications of the different regions of the single amplified genome (SAG) [147,154]. Finally, another major constraint of SCG approaches is the absence of any robust single-molecule amplification technology.

Although all sequences obtained from SCG approaches come with certainty from a unique cell, unlike the case for metagenomics, the success of genome recovery varies widely, from 12% to a complete genome. It is directly linked to the correct achievement of each of the different steps leading to a SAG and to the specific properties of cells. SCG thus still requires further improvements, such as overcoming technological limitations, to make it easily applicable for ecosystem study. Nevertheless, its combination with other approaches like metagenomics makes it particularly interesting and provides complete and reliable information.

4. Complementarity between metagenomics and SCG for dark matter exploration

Because SCG possesses certain strengths and metagenomics possesses others, the integration of the two methods enables a wider comprehension of microbial ecosystems than allowed by the single methods. The first advantage is the possibility of combining genomic data provided by each method to reach complete genome assemblies. Metagenomic reads can be incorporated into single-cell data, as was

performed for *Candidatus* ‘Nitrosoarchaeum limnia’ SFB1 [10], and in other cases, single-cell data can be used to guide and validate genome reconstruction from metagenomic data, as for the SAR86 genome [42]. Nobu et al. [133] combined SCG and metagenomics and generated 35 draft genomes spanning more than 15 phyla, thus permitting the first genomic insight into 3 candidate phyla belonging to the microbial dark matter, Atribacteria, Hydrogenedentes and Marinimicrobia. The second advantage is the possibility of using SCG as a specific tool to target organisms studied in metagenomic analyses and thus explain community function. For instance, Mason et al. [117] used single-cell approaches to specifically characterize and confirm the hydrocarbon degradation potential of the dominant *Oceanospirillales* identified with metagenomic methods during the Deepwater Horizon oil spill. Likewise, thanks to metagenomics, Ghai et al. [60] discovered new abundant microorganisms in hypersaline salt ponds whose photoheterotrophic and polysaccharide-degrading metabolism has been investigated with SCG. Gomariz et al. [66] showed an uncultured group of Bacteroidetes in similar environments for which single-cell genomes suggest competitive metabolic characteristics in hypersaline conditions.

A combination of metagenomics and SCG represents a promising strategy for understanding ecosystem functioning. Nevertheless, linking specific microbial populations to environmental processes does not necessarily imply billions of random-shotgun metagenomic reads or SCG expertise. Gene capture undeniably represents a promising genomic-scale sequence enrichment strategy that could contribute to the reconstruction of large DNA fragments or even complete genomes from complex environments.

5. Gene capture as an innovative approach for capturing microbial dark matter

Gene capture approaches, which were first developed for resequencing application, rely on either solid phase [1,123,138] or solution phase hybridization [65,182] of nucleic acid capture probes to the targeted DNA sequences. Denonfoux et al. [31] described the first adaptation of a gene capture method for selective enrichment of a target-specific genomic locus from a complex environmental metagenomic DNA. Thus, a solution hybrid selection (SHS) method was applied to a lacustrine environment targeting the methyl coenzyme M reductase subunit A (*mcrA*) gene, revealing higher methanogen community diversity than previously observed with other methods. The enrichment performance (>41%) demonstrated the relevance of this method compared to a random-shotgun metagenomic approach (0.003%). Applied to other genomic loci, including functional [15] and phylogenetic markers such as 16S or 18S rRNA genes (P. Peyret, unpublished), enrichment performance of the gene capture can be greater than 90%. Nevertheless, the success of a gene capture experiment in microbial ecology strongly depends on the high-quality probe sets encompassing variant specific and explorative probes. Thus, probe design must be carried out with

dedicated softwares like PhylArray [122], MetabolicDesign [181], HiSpOD [39] and KASpOD [140].

Adaptation of gene capture for microbial ecology enabled a better taxonomic and functional description of the studied microbial communities, including the rare biosphere and unknown sequences [31]. Additionally, gene capture allows recovering large DNA fragments, highlighting the ability to extend beyond the initial targeted biomarker gene sequence; it thus facilitates the discovery of new genes or genomic organizations. Initially coupled with pyrosequencing, the emergence of third generation sequencing platforms and the possibility of sequencing longer DNA sequences without library construction [118,125,159] should provide real benefits to gene capture for recovering large genomic regions or even complete microbial genomes.

6. Conclusion

After undergoing an estimated 3.8 billion years of evolution, microorganisms are the most diverse and abundant

cellular life forms on Earth and are critical to the functioning of all metabolic niches. Molecular approaches (Fig. 3.) have highlighted the presence of microbial dark matter [193] despite cultivation difficulties for the vast majority of prokaryotes from the environment. During the last decade, advances in high-throughput sequencing, DNA amplification and computing has enabled access to the genetic makeup of unknown microorganisms by recovering genomes from complex environments through metagenomics and SCG methods [87,94]. Thus, unraveling the mysteries of metabolic potential and the ecological roles of this dark matter is one of the most exciting challenges in microbiology. These innovative approaches, which are cornerstones for discoveries in microbial ecology and environmental microbiology, have been successfully applied to expand our understanding of many processes, especially geochemical element cycles. In addition, access to the complete genomes of these unknown microorganisms has accelerated the development of novel compounds and processes for biotechnology, pharmaceuticals and other applications in industry [193]. The

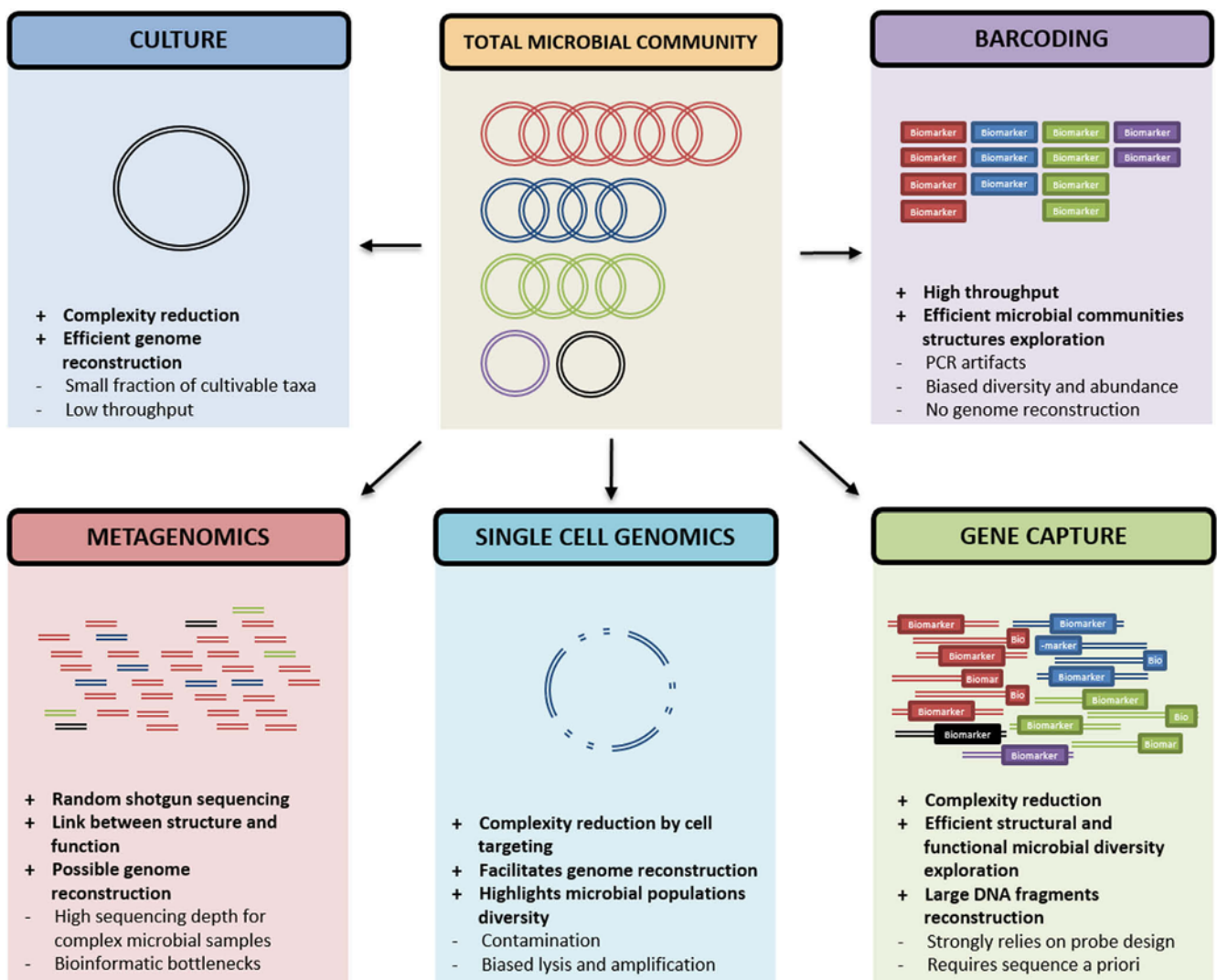


Fig. 3. Strengths and weaknesses of various microbial ecology approaches to link identity and function in metagenomic samples.

strengths of metagenomics are its simplicity in sample preparation and its ability to give access to all community members if a sufficient sequencing effort is provided. However, in high complexity environments, metagenomics fails to identify numerous complete genomes, especially those from rare biospheres. Moreover, reconstruction of closely related genomes is difficult, hindering evolutionary analysis of bacterial populations that may be adapted to different ecological niches or that harbor distinct functional capabilities [47]. In contrast, SGC provides genomes of one cell, allowing the study of these organisms at the most fundamental biological level. Indeed, SGC recovers high quality non-composite reference genomes from individual organisms and thus permits access to genomic variability in natural microbial communities by resolving fine-scale heterogeneity at the population level without ambiguity. The SCG approach allows the linkage of function to phylogeny, but technological improvements must be performed to make it applicable to a large variety of complex natural environments [26]. Nevertheless, as SCG and metagenomics present complementary advantages, their combination offers vast opportunities for discovering functional capabilities deduced from the deciphering of dark matter genomes. More targeted and innovative approaches such as gene capture can be carried out to focus on particular populations. Such a promising strategy, contributing to the reconstruction of large genomic fragments or even complete genomes, provides valuable information about uncultivated microbial lineages.

However, each technique discussed in this review has strengths and weaknesses that must be taken into account (Fig. 3). Until the development of an innovative technology enabling elucidation of both community structure and function, the best experimental design must be chosen with the knowledge of biological questions and samples.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was funded by the Auvergne Regional Council, the European Regional Development Fund and the program Investissements d'Avenir AMI 2011 VALTEX. PhD scholarships were funded by the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" and given to CR and CD and the French 'Direction Générale de l'Armement' (DGA) was awarded to CG and NP.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.06.001>.

References

- [1] Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X, et al. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods* 2007;4:903–5.
- [2] Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, Nielsen KL, Tyson GW, Nielsen PH. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat Biotechnol* 2013;31:533–8.
- [3] Alfreider A, Vogt C, Babel W. Microbial diversity in an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Syst Appl Microbiol* 2002;25:232–40.
- [4] Allen EE, Banfield JF. Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:489–98.
- [5] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143–69.
- [6] Baker BJ, Comolli LR, Dick GJ, Hauser LJ, Hyatt D, Dill BD, et al. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:8806–11.
- [7] Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9188–93.
- [8] Bertin PN, Heinrich-Salmeron A, Pelletier E, Goulhen-Chollet F, Arsene-Ploetze F, Gallien S, et al. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME J* 2011;5:1735–47.
- [9] Blainey PC. The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:407–27.
- [10] Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR. Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *PLoS One* 2011;6:e16626.
- [11] Blank CE, Cady SL, Pace NR. Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5123–35.
- [12] Borrel G, Harris HM, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, et al. Genome sequence of "Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis" isoire-Mx1, a third thermoplasmatales-related methanogenic archaeon from human feces. *Genome Announc* 2013;1.
- [13] Borrel G, Harris HM, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, et al. Genome sequence of "Candidatus Methanomethylophilus alvus" Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *J Bacteriol* 2012;194:6944–5.
- [14] Borrel G, Parisot N, Harris HM, Peyretailade E, Gaci N, Tottey W, et al. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 2014;15:679.
- [15] Bragalini C, Ribiere C, Parisot N, Vallon L, Prudent E, Peyretailade E, et al. Solution hybrid selection capture for the recovery of functional full-length eukaryotic cDNAs from complex environmental samples. *DNA Res* 2014;21:685–94.
- [16] Briece C, Moreira D, Lopez-Garcia P. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res Microbiol* 2007;158:213–27.
- [17] Campbell BJ, Yu L, Heidelberg JF, Kirchman DL. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:12776–81.
- [18] Campbell JH, O'Donoghue P, Campbell AG, Schwientek P, Sczyrba A, Woyke T, et al. UGA is an additional glycine codon in uncultured SR1 bacteria from the human microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:5540–5.

- [19] Carvalhais LC, Dennis PG, Tyson GW, Schenk PM. Application of metatranscriptomics to soil environments. *J Microbiol Methods* 2012;91:246–51.
- [20] Castelle CJ, Hug LA, Wrighton KC, Thomas BC, Williams KH, Wu D, et al. Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment. *Nat Commun* 2013;4:2120.
- [21] Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Hug LA, Brown CT, Wilkins MJ, et al. Genomic expansion of domain archaea highlights roles for organisms from new phyla in anaerobic carbon cycling. *Curr Biol* 2015;25:690–701.
- [22] Chakraborty C, Doss CG, Patra BC, Bandyopadhyay S. DNA barcoding to map the microbial communities: current advances and future directions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:3425–36.
- [23] Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 2013;10:563–9.
- [24] Chitsaz H, Yee-Greenbaum JL, Tesler G, Lombardo MJ, Dupont CL, Badger JH, et al. Efficient de novo assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets. *Nat Biotechnol* 2011;29:915–21.
- [25] Chouari R, Le Paslier D, Dauga C, Daegelen P, Weissenbach J, Sghir A. Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2145–53.
- [26] Clingenpeel S, Clum A, Schwientek P, Rinke C, Woyke T. Reconstructing each cell's genome within complex microbial communities—dream or reality? *Front Microbiol* 2014;5:771.
- [27] Curtis TP, Sloan WT. Microbiology. Exploring microbial diversity—a vast below. *Science* 2005;309:1331–3.
- [28] Darmon E, Leach DR. Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:1–39.
- [29] Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5261–6.
- [30] Delmont TO, Prestat E, Keegan KP, Faubladier M, Robe P, Clark IM, et al. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME J* 2012;6:1677–87.
- [31] Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, Boucher D, Morgavi DP, et al. Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA Res* 2013;20:185–96.
- [32] Derakshani M, Lukow T, Liesack W. Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:623–31.
- [33] Desai N, Antonopoulos D, Gilbert JA, Glass EM, Meyer F. From genomics to metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:72–6.
- [34] Di Rienzi SC, Sharon I, Wrighton KC, Koren O, Hug LA, Thomas BC, et al. The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria. *Elife* 2013;2:e01102.
- [35] Diguistini S, Liao NY, Platt D, Robertson G, Seidel M, Chan SK, et al. De novo genome sequence assembly of a filamentous fungus using Sanger, 454 and illumina sequence data. *Genome Biol* 2009;10:R94.
- [36] Dodsworth JA, Blainey PC, Murugapiran SK, Swingley WD, Ross CA, Tringe SG, et al. Single-cell and metagenomic analyses indicate a fermentative and saccharolytic lifestyle for members of the OP9 lineage. *Nat Commun* 2013;4:1854.
- [37] Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3869–77.
- [38] Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, et al. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Mol Plant Microbe Interact* 2009;22:1011–20.
- [39] Dugat-Bony E, Missaoui M, Peyretailade E, Biderre-Petit C, Bouzid O, Gouinaud C, et al. HiSpOD: probe design for functional DNA microarrays. *Bioinformatics* 2011;27:641–8.
- [40] Dunbar J, Barns SM, Ticknor LO, Kuske CR. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3035–45.
- [41] Dunfield PF, Tamas I, Lee KC, Morgan XC, McDonald IR, Stott MB. Electing a candidate: a speculative history of the bacterial phylum OP10. *Environ Microbiol* 2012;14:3069–80.
- [42] Dupont CL, Rusch DB, Yooseph S, Lombardo MJ, Richter RA, Valas R, et al. Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. *ISME J* 2012;6:1186–99.
- [43] El-Metwally S, Hamza T, Zakaria M, Helmy M. Next-generation sequence assembly: four stages of data processing and computational challenges. *PLoS Comput Biol* 2013;9:e1003345.
- [44] Elkins JG, Podar M, Graham DE, Makarova KS, Wolf Y, Randau L, et al. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8102–7.
- [45] Elloe EA, Fadrosch DW, Novotny M, Zeigler Allen L, Kim M, Lombardo MJ, et al. Going deeper: metagenome of a hadopelagic microbial community. *PLoS One* 2011;6:e20388.
- [46] Elshahed MS, Senko JM, Najjar FZ, Kenton SM, Roe BA, Dewers TA, et al. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5609–21.
- [47] Engel P, Stepanauskas R, Moran NA. Hidden diversity in honey bee gut symbionts detected by single-cell genomics. *PLoS Genet* 2014;10:e1004596.
- [48] Erkel C, Kube M, Reinhardt R, Liesack W. Genome of rice cluster I archaea—the key methane producers in the rice rhizosphere. *Science* 2006;313:370–2.
- [49] Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MM, et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 2010;464:543–8.
- [50] Fieseler L, Horn M, Wagner M, Hentschel U. Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3724–32.
- [51] Flowers JJ, He S, Malfatti S, del Rio TG, Tringe SG, Hugenholtz P, et al. Comparative genomics of two '*Candidatus Accumulibacter*' clades performing biological phosphorus removal. *ISME J* 2013;7:2301–14.
- [52] Freitag TE, Prosser JI. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1359–71.
- [53] Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA. Phylogenetic diversity of sub-surface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1294–302.
- [54] Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 2005;309:1387–90.
- [55] Garcia Costas AM, Liu Z, Tomsho LP, Schuster SC, Ward DM, Bryant DA. Complete genome of *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*, a chlorophyll-based photoheterotroph belonging to the phylum acidobacteria. *Environ Microbiol* 2012;14:177–90.
- [56] Garcia Martin H, Ivanova N, Kunin V, Warnecke F, Barry KW, McHardy AC, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nat Biotechnol* 2006;24:1263–9.
- [57] Garcia SL, McMahon KD, Martinez-Garcia M, Srivastava A, Sczyrba A, Stepanauskas R, et al. Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *ISME J* 2013;7:137–47.
- [58] Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, Camacho A, Rodriguez-Valera F. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Sci Rep* 2013;3:2471.
- [59] Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, Camacho A, Rodriguez-Valera F. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Mol Ecol* 2014;23:6073–90.
- [60] Ghai R, Pasic L, Fernandez AB, Martin-Cuadrado AB, Mizuno CM, McMahon KD, et al. New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* 2011;1:135.
- [61] Ghylin TW, Garcia SL, Moya F, Oyserman BO, Schwientek P, Forest KT, et al. Comparative single-cell genomics reveals potential

- ecological niches for the freshwater acI Actinobacteria lineage. *ISME J* 2014;8:2503–16.
- [62] Gies EA, Konwar KM, Beatty JT, Hallam SJ. Illuminating microbial dark matter in meromictic Sakinaw Lake. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:6807–18.
- [63] Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 1990;345:60–3.
- [64] Gnerre S, Maccallum I, Przybylski D, Ribeiro FJ, Burton JN, Walker BJ, et al. High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:1513–8.
- [65] Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27:182–9.
- [66] Gomariz M, Martinez-Garcia M, Santos F, Rodriguez F, Capella-Gutierrez S, Gabaldon T, et al. From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic bacterioidetes generalists. *ISME J* 2015;9:16–31.
- [67] Gorlas A, Robert C, Gimenez G, Drancourt M, Raoult D. Complete genome sequence of *Methanomassiliicoccus luminyensis*, the largest genome of a human-associated archaea species. *J Bacteriol* 2012;194:4745.
- [68] Grindberg RV, Ishoey T, Brinza D, Esquenazi E, Coates RC, Liu WT, et al. Single cell genome amplification accelerates identification of the apratoxin biosynthetic pathway from a complex microbial assemblage. *PLoS One* 2011;6:e18565.
- [69] Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N, Schleper C, Watanabe Y, Sugahara J, et al. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18296–301.
- [70] Handley KM, Bartels D, O'Loughlin EJ, Williams KH, Trimble WL, Skinner K, et al. The complete genome sequence for putative H(2)- and S-oxidizer *Candidatus Sulfuricurvum* sp., assembled de novo from an aquifer-derived metagenome. *Environ Microbiol* 2014;16:3443–62.
- [71] Harris JK, Kelley ST, Pace NR. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:845–9.
- [72] Hedlund BP, Dodsworth JA, Murugapiran SK, Rinke C, Woyke T. Impact of single-cell genomics and metagenomics on the emerging view of extremophile “microbial dark matter”. *Extremophiles* 2014;18:865–75.
- [73] Hess M, Szyrba A, Egan R, Kim TW, Chokhwalala H, Schroth G, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science* 2011;331:463–7.
- [74] Holmes AJ, Tujula NA, Holley M, Contos A, James JM, Rogers P, et al. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ Microbiol* 2001;3:256–64.
- [75] Hongoh Y, Sharma VK, Prakash T, Noda S, Taylor TD, Kudo T, et al. Complete genome of the uncultured termite group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5555–60.
- [76] Hua ZS, Han YJ, Chen LX, Liu J, Hu M, Li SJ, et al. Ecological roles of dominant and rare prokaryotes in acid mine drainage revealed by metagenomics and metatranscriptomics. *ISME J* 2014;9:1280–94.
- [77] Huang X, Madan A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res* 1999;9:868–77.
- [78] Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO. A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 2002;417:63–7.
- [79] Hugenholtz P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* 2002;3: REVIEWS0003.
- [80] Hugenholtz P, Kyrpides NC. A changing of the guard. *Environ Microbiol* 2009;11:551–3.
- [81] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 1998;180:366–76.
- [82] Hugoni M, Taib N, Debroas D, Domaizon I, Jouan Dufournel I, Bronner G, et al. Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:6004–9.
- [83] Hunt DE, Lin Y, Church MJ, Karl DM, Tringe SG, Izzo LK, et al. Relationship between abundance and specific activity of bacterioplankton in open ocean surface waters. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:177–84.
- [84] Idury RM, Waterman MS. A new algorithm for DNA sequence assembly. *J Comput Biol* 1995;2:291–306.
- [85] Iverson V, Morris RM, Frazar CD, Berthiaume CT, Morales RL, Armbrust EV. Untangling genomes from metagenomes: revealing an uncultured class of marine Euryarchaeota. *Science* 2012;335:587–90.
- [86] Jones DS, Albrecht HL, Dawson KS, Schaperdoth I, Freeman KH, Pi Y, et al. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *ISME J* 2012;6:158–70.
- [87] Kalyuzhnaya MG, Lapidus A, Ivanova N, Copeland AC, McHardy AC, Szeto E, et al. High-resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities. *Nat Biotechnol* 2008;26:1029–34.
- [88] Kantor RS, Wrighton KC, Handley KM, Sharon I, Hug LA, Castelle CJ, et al. Small genomes and sparse metabolisms of sediment-associated bacteria from four candidate phyla. *MBio* 2013;4:e00708–13.
- [89] Kim M, Lee KH, Yoon SW, Kim BS, Chun J, Yi H. Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. *Genomics Inf* 2013;11:102–13.
- [90] Kirkup Jr BC. Bacterial strain diversity within wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4:12–23.
- [91] Kojima H, Ogura Y, Yamamoto N, Togashi T, Mori H, Watanabe T, et al. Ecophysiology of *Thioploca ingrica* as revealed by the complete genome sequence supplemented with proteomic evidence. *ISME J* 2014;9:1166–76.
- [92] Kolinko S, Richter M, Glockner FO, Brachmann A, Schuler D. Single-cell genomics reveals potential for magnetite and greigite biomineralization in an uncultivated multicellular magnetotactic prokaryote. *Environ Microbiol Rep* 2014;6:524–31.
- [93] Kvist T, Ahring BK, Lasken RS, Westermann P. Specific single-cell isolation and genomic amplification of uncultured microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:926–35.
- [94] Lasken RS. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:631–40.
- [95] Lasken RS, McLean JS. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet* 2014;15:577–84.
- [96] Layton AC, Karanth PN, Lajoie CA, Meyers AJ, Gregory IR, Stapleton RD, et al. Quantification of *Hyphomicrobium* populations in activated sludge from an industrial wastewater treatment system as determined by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1167–74.
- [97] Leon MJ, Ghai R, Fernandez AB, Sanchez-Porro C, Rodriguez-Valera F, Ventosa A. Draft genome of *Spiribacter salinus* M19-40, an abundant gammaproteobacterium in aquatic hypersaline environments. *Genome Announc* 2013;1.
- [98] Ley RE, Harris JK, Wilcox J, Spear JR, Miller SR, Bebout BM, et al. Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3685–95.
- [99] Li D, Greenfield P, Rosewarne CP, Midgley DJ. Draft genome sequence of *Thermoanaerobacter* sp. Strain A7A, reconstructed from a metagenome obtained from a high-temperature hydrocarbon reservoir in the Bass Strait, Australia. *Genome Announc* 2013;1.
- [100] Li R, Zhu H, Ruan J, Qian W, Fang X, Shi Z, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genome Res* 2010;20:265–72.
- [101] Lima AR, Siqueira AS, Dos Santos BG, da Silva FD, Lima CP, Cardoso JF, et al. Draft genome sequence of *Blastomonas* sp. Strain CACIA 14H2, a heterotrophic bacterium associated with cyanobacteria. *Genome Announc* 2014;2.
- [102] Lipson DA, Schmidt SK. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado rocky mountains. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2867–79.
- [103] Lo I, Denev VJ, Verberkmoes NC, Shah MB, Goltsman D, DiBartolo G, et al. Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic bacteria. *Nature* 2007;446:537–41.

- [104] Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220–30.
- [105] Lucker S, Wagner M, Maixner F, Pelletier E, Koch H, Vacherie B, et al. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:13479–84.
- [106] Lynch RC, Darcy JL, Kane NC, Nemergut DR, Schmidt SK. Metagenomic evidence for metabolism of trace atmospheric gases by high-elevation desert Actinobacteria. *Front Microbiol* 2014;5:698.
- [107] Mackelprang R, Waldrop MP, DeAngelis KM, David MM, Chavarria KL, Blazewicz SJ, et al. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature* 2011;480:368–71.
- [108] Mao Y, Xia Y, Wang Z, Zhang T. Reconstructing a *Thauera* genome from a hydrogenotrophic-denitrifying consortium using metagenomic sequence data. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:6885–95.
- [109] Mao Y, Yu K, Xia Y, Chao Y, Zhang T. Genome reconstruction and gene expression of “*Candidatus* Accumulibacter phosphatis” clade IB performing biological phosphorus removal. *Environ Sci Technol* 2014;48:10363–71.
- [110] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Losekann T, Ivanova N, Martin HG, et al. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11889–94.
- [111] Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005;437:376–80.
- [112] Martinez-Garcia M, Brazel D, Poulton NJ, Swan BK, Gomez ML, Masland D, et al. Unveiling in situ interactions between marine protists and bacteria through single cell sequencing. *ISME J* 2012;6:703–7.
- [113] Martinez-Garcia M, Brazel DM, Swan BK, Arnosti C, Chain PS, Reitenga KG, et al. Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of verrucomicrobia. *PLoS One* 2012;7:e35314.
- [114] Martinez-Garcia M, Swan BK, Poulton NJ, Gomez ML, Masland D, Sieracki ME, et al. High-throughput single-cell sequencing identifies photoheterotrophs and chemoautotrophs in freshwater bacterioplankton. *ISME J* 2012;6:113–23.
- [115] Martinez Martinez J, Poulton NJ, Stepanauskas R, Sieracki ME, Wilson WH. Targeted sorting of single virus-infected cells of the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *PLoS One* 2011;6:e22520.
- [116] Mason OU, Han J, Woyke T, Jansson JK. Single-cell genomics reveals features of a *Colwellia* species that was dominant during the Deepwater horizon oil spill. *Front Microbiol* 2014;5:332.
- [117] Mason OU, Hazen TC, Borglin S, Chain PS, Dubinsky EA, Fortney JL, et al. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater horizon oil spill. *ISME J* 2012;6:1715–27.
- [118] McCarthy A. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences’ single molecule real time technology. *Chem Biol* 2010;17:675–6.
- [119] McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 2012;6:610–8.
- [120] McIlroy SJ, Albertsen M, Andresen EK, Saunders AM, Kristiansen R, Stokholm-Bjerregaard M, et al. ‘*Candidatus* Competibacter’-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity. *ISME J* 2014;8:613–24.
- [121] McLean JS, Lombardo MJ, Badger JH, Edlund A, Novotny M, Yee-Greenbaum J, et al. Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E2390–9.
- [122] Militon C, Rimour S, Missaoui M, Biderre C, Barra V, Hill D, et al. PhylArray: phylogenetic probe design algorithm for microarray. *Bioinformatics* 2007;23:2550–7.
- [123] Mokry M, Feitsma H, Nijman IJ, de Bruijn E, van der Zaag PJ, Guryev V, et al. Accurate SNP and mutation detection by targeted custom microarray-based genomic enrichment of short-fragment sequencing libraries. *Nucleic Acids Res* 2010;38:e116.
- [124] Mondav R, Woodcroft BJ, Kim EH, McCalley CK, Hodgkins SB, Crill PM, et al. Discovery of a novel methanogen prevalent in thawing permafrost. *Nat Commun* 2014;5:3212.
- [125] Morey M, Fernandez-Marmiesse A, Castineiras D, Fraga JM, Couce ML, Cocho JA. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol Genet Metab* 2013;110:3–24.
- [126] Musmann M, Hu FZ, Richter M, de Beer D, Preisler A, Jorgensen BB, et al. Insights into the genome of large sulfur bacteria revealed by analysis of single filaments. *PLoS Biol* 2007;5:e230.
- [127] Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, et al. A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* 2000;287:2196–204.
- [128] Nagarajan N, Pop M. Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet* 2013;14:157–67.
- [129] Narasingarao P, Podell S, Ugalde JA, Brochier-Armanet C, Emerson JB, Brocks JJ, et al. De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J* 2012;6:81–93.
- [130] Ng C, DeMaere MZ, Williams TJ, Lauro FM, Raftery M, Gibson JA, et al. Metaproteogenomic analysis of a dominant green sulfur bacterium from Ace Lake, Antarctica. *ISME J* 2010;4:1002–19.
- [131] Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* 2014;32:822–8.
- [132] Nikolaki S, Tsiamis G. Microbial diversity in the era of omic technologies. *Biomed Res Int* 2013;2013:958719.
- [133] Nobu MK, Narihiro T, Rinke C, Kamagata Y, Tringe SG, Woyke T, et al. Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *ISME J* 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.256> [Epub ahead of print].
- [134] Nobu MK, Tamaki H, Kubota K, Liu WT. Metagenomic characterization of ‘*Candidatus* Defluviococcus tetraformis strain TFO71’, a tetrad-forming organism, predominant in an anaerobic-aerobic membrane bioreactor with deteriorated biological phosphorus removal. *Environ Microbiol* 2014;16:2739–51.
- [135] Nogales B, Moore ER, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R, Timmis KN. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1874–84.
- [136] Nunoura T, Takaki Y, Kakuta J, Nishi S, Sugahara J, Kazama H, et al. Insights into the evolution of archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res* 2011;39:3204–23.
- [137] Oh S, Zhang R, Wu QL, Liu WT. Draft genome sequence of a novel SAR11 clade species abundant in a Tibetan Lake. *Genome Announc* 2014;2.
- [138] Okou DT, Steinberg KM, Middle C, Cutler DJ, Albert TJ, Zwick ME. Microarray-based genomic selection for high-throughput resequencing. *Nat Methods* 2007;4:907–9.
- [139] Pamp SJ, Harrington ED, Quake SR, Relman DA, Blainey PC. Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB). *Genome Res* 2012;22:1107–19.
- [140] Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E, Peyret P, Peyretailade E. KASpOD—a web service for highly specific and explorative oligonucleotide design. *Bioinformatics* 2012;28:3161–2.
- [141] Pedros-Alio C. The rare bacterial biosphere. *Ann Rev Mar Sci* 2012;4:449–66.
- [142] Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, et al. ‘*Candidatus* Cloacamonas acidaminovorans’: genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *J Bacteriol* 2008;190:2572–9.
- [143] Petitjean C, Deschamps P, Lopez-Garcia P, Moreira D. Rooting the domain archaea by phylogenomic analysis supports the foundation of the new kingdom Proteoarchaeota. *Genome Biol Evol* 2015;7:191–204.
- [144] Petitjean C, Deschamps P, Lopez-Garcia P, Moreira D, Brochier-Armanet C. Extending the conserved phylogenetic core of archaea

- disentangles the evolution of the third domain of life. *Mol Biol Evol* 2015;32:1242–54.
- [145] Pevzner PA, Tang H, Waterman MS. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9748–53.
- [146] Pham VH, Kim J. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol* 2012;30:475–84.
- [147] Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, et al. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics* 2006;7:216.
- [148] Podar M, Abulencia CB, Walcher M, Hutchison D, Zengler K, Garcia JA, et al. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3205–14.
- [149] Reddy RM, Mohammed MH, Mande SS. MetaCAA: a clustering-aided methodology for efficient assembly of metagenomic datasets. *Genomics* 2014;103:161–8.
- [150] Rheims H, Rainey FA, Stackebrandt E. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *J Ind Microbiol* 1996;17:159–69.
- [151] Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 2004;38:525–52.
- [152] Rinke C, Lee J, Nath N, Goudeau D, Thompson B, Poulton N, et al. Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nat Protoc* 2014;9:1038–48.
- [153] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 2013;499:431–7.
- [154] Rodrigue S, Malmstrom RR, Berlin AM, Birren BW, Henn MR, Chisholm SW. Whole genome amplification and de novo assembly of single bacterial cells. *PLoS One* 2009;4:e6864.
- [155] Rosewarne CP, Greenfield P, Li D, Tran-Dinh N, Bradbury MI, Midgley DJ, et al. Draft genome sequence of *Clostridium* sp. Maddingley, isolated from coal-seam gas formation water. *Genome Announc* 2013;1.
- [156] Rosewarne CP, Greenfield P, Li D, Tran-Dinh N, Midgley DJ, Hendry P. Draft genome sequence of *Methanobacterium* sp. Maddingley, reconstructed from metagenomic sequencing of a methanogenic microbial consortium enriched from coal-seam gas formation water. *Genome Announc* 2013;1.
- [157] Roy RS, Price DC, Schliep A, Cai G, Korobeynikov A, Yoon HS, et al. Single cell genome analysis of an uncultured heterotrophic stramenopile. *Sci Rep* 2014;4:4780.
- [158] Santoro AE, Dupont CL, Richter RA, Craig MT, Carini P, McIlvin MR, et al. Genomic and proteomic characterization of “*Candidatus Nitrosopelagicus brevis*”: an ammonia-oxidizing archaeon from the open ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:1173–8.
- [159] Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* 2010;19:R227–40.
- [160] Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* 2005;6:229.
- [161] Segata N, Boernigen D, Tickle TL, Morgan XC, Garrett WS, Huttenhower C. Computational metaomics for microbial community studies. *Mol Syst Biol* 2013;9:666.
- [162] Servin-Garciduenas LE, Martinez-Romero E. Draft genome sequence of the sulfolobales archaeon AZ1, obtained through metagenomic analysis of a mexican hot Spring. *Genome Announc* 2014;2.
- [163] Servin-Garciduenas LE, Peng X, Garrett RA, Martinez-Romero E. Genome sequence of a novel archaeal fusellovirus assembled from the metagenome of a mexican hot spring. *Genome Announc* 2013;1:e0016413.
- [164] Sharon I, Banfield JF. Microbiology. Genomes from metagenomics. *Science* 2013;342:1057–8.
- [165] Siegl A, Kamke J, Hochmuth T, Piel J, Richter M, Liang C, et al. Single-cell genomics reveals the lifestyle of poribacteria, a candidate phylum symbiotically associated with marine sponges. *ISME J* 2011;5:61–70.
- [166] Simpson JT, Wong K, Jackman SD, Schein JE, Jones SJ, Birol I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res* 2009;19:1117–23.
- [167] Skennerton CT, Barr JJ, Slater FR, Bond PL, Tyson GW. Expanding our view of genomic diversity in *Candidatus Accumulibacter* clades. *Environ Microbiol* 2014;17:1574–85.
- [168] Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12115–20.
- [169] Soo RM, Skennerton CT, Sekiguchi Y, Imelfort M, Paech SJ, Dennis PG, et al. An expanded genomic representation of the phylum cyanobacteria. *Genome Biol Evol* 2014;6:1031–45.
- [170] Speth DR, Hu B, Bosch N, Keltjens JT, Stunnenberg HG, Jetten MS. Comparative genomics of two independently enriched “*Candidatus kueningia stuttgartiensis*” anammox bacteria. *Front Microbiol* 2012;3:307.
- [171] Staden R. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Res* 1979;6:2601–10.
- [172] Stamps BW, Corsetti FA, Spear JR, Stevenson BS. Draft genome of a novel chlorobi member assembled by tetranucleotide binning of a hot spring metagenome. *Genome Announc* 2014;2.
- [173] Strous M, Pelletier E, Manganot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 2006;440:790–4.
- [174] Sutcliffe B, Midgley DJ, Rosewarne CP, Greenfield P, Li D. Draft genome sequence of *Thermotoga maritima* A7A reconstructed from metagenomic sequencing analysis of a hydrocarbon reservoir in the Bass Strait, Australia. *Genome Announc* 2013;1.
- [175] Swan BK, Chaffin MD, Martinez-Garcia M, Morrison HG, Field EK, Poulton NJ, et al. Genomic and metabolic diversity of marine group I thaumarchaeota in the mesopelagic of two subtropical gyres. *PLoS One* 2014;9:e95380.
- [176] Swan BK, Martinez-Garcia M, Preston CM, Sczyrba A, Woyke T, Lamy D, et al. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science* 2011;333:1296–300.
- [177] Takami H, Noguchi H, Takaki Y, Uchiyama I, Toyoda A, Nishi S, et al. A deeply branching thermophilic bacterium with an ancient acetyl-CoA pathway dominates a subsurface ecosystem. *PLoS One* 2012;7:e30559.
- [178] Tan B, Charchuk R, Li C, Nesbo C, Abu Laban N, Foght J. Draft genome sequence of uncultivated firmicutes (Peptococcaceae SCADC) single cells sorted from methanogenic alkane-degrading cultures. *Genome Announc* 2014;2.
- [179] Tang S, Edwards EA. Complete genome sequence of bacteroidales strain CF from a chloroform-dechlorinating enrichment culture. *Genome Announc* 2013;1.
- [180] Tanner MA, Everett CL, Coleman WJ, Yang MM, Youvan DC. Complex microbial communities inhabiting sulfide-rich black mud from marine coastal environments. *Biotechnol Bioinform* 2000;8:1–16.
- [181] Terrat S, Peyretaillade E, Goncalves O, Dugat-Bony E, Gravelat F, Mone A, et al. Detecting variants with metabolic design, a new software tool to design probes for explorative functional DNA microarray development. *BMC Bioinform* 2010;11:478.
- [182] Tewhey R, Warner JB, Nakano M, Libby B, Medkova M, David PH, et al. Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27:1025–31.
- [183] Tian RM, Wang Y, Bougouffa S, Gao ZM, Cai L, Bajic V, et al. Genomic analysis reveals versatile heterotrophic capacity of a potentially symbiotic sulfur-oxidizing bacterium in sponge. *Environ Microbiol* 2014;16:3548–61.
- [184] Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF. Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 2002;296:1064–6.
- [185] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 2004;428:37–43.
- [186] Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol* 2009;24:110–7.

- [187] van de Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJ, Wessels HJ, Dutilh BE, Kartal B, et al. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environ Microbiol* 2013;15:1275–89.
- [188] Vartoukian SR, Palmer RM, Wade WG. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2010;309:1–7.
- [189] Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:236–55.
- [190] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6578–83.
- [191] Wilson MC, Mori T, Ruckert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 2014;506:58–62.
- [192] Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, Huntemann M, Richter M, Gloeckner FO, et al. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 2006;443:950–5.
- [193] Woyke T, Tighe D, Mavromatis K, Clum A, Copeland A, Schackwitz W, et al. One bacterial cell, one complete genome. *PLoS One* 2010;5:e10314.
- [194] Woyke T, Xie G, Copeland A, Gonzalez JM, Han C, Kiss H, et al. Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS One* 2009;4:e5299.
- [195] Wrighton KC, Castelle CJ, Wilkins MJ, Hug LA, Sharon I, Thomas BC, et al. Metabolic interdependencies between phylogenetically novel fermenters and respiratory organisms in an unconfined aquifer. *ISME J* 2014;8:1452–63.
- [196] Wrighton KC, Thomas BC, Sharon I, Miller CS, Castelle CJ, VerBerkmoes NC, et al. Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* 2012;337:1661–5.
- [197] Yang X, Chockalingam SP, Aluru S. A survey of error-correction methods for next-generation sequencing. *Brief Bioinform* 2013;14:56–66.
- [198] Yelton AP, Comolli LR, Justice NB, Castelle C, Denev VJ, Thomas BC, et al. Comparative genomics in acid mine drainage biofilm communities reveals metabolic and structural differentiation of co-occurring archaea. *BMC Genomics* 2013;14:485.
- [199] Yelton AP, Thomas BC, Simmons SL, Wilmes P, Zemla A, Thelen MP, et al. A semi-quantitative, synteny-based method to improve functional predictions for hypothetical and poorly annotated bacterial and archaeal genes. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002230.
- [200] Yilmaz S, Singh AK. Single cell genome sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:437–43.
- [201] Yohda M, Yagi O, Takechi A, Kitajima M, Matsuda H, Miyamura N, et al. Genome sequence determination and metagenomic characterization of a dehalococcoides mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene. *J Biosci Bioeng* 2015;120:69–77.
- [202] Yoon HS, Price DC, Stepanauskas R, Rajah VD, Sieracki ME, Wilson WH, et al. Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science* 2011;332:714–7.
- [203] Youssef NH, Blainey PC, Quake SR, Elshahed MS. Partial genome assembly for a candidate division OP11 single cell from an anoxic spring (Zodletone Spring, Oklahoma). *Appl Environ Microbiol* 2011;77:7804–14.
- [204] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 2008;18:821–9.
- [205] Zhalnina KV, Dias R, Leonard MT, Dorr de Quadros P, Camargo FA, Drew JC, et al. Genome sequence of *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* from group I.1b enriched from everglades soil reveals novel genomic features of the ammonia-oxidizing archaea. *PLoS One* 2014;9:e101648.
- [206] Zhou J, Xia B, Huang H, Treves DS, Hauser LJ, Mural RJ, et al. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biol Biochem* 2003;35:915–24.

Annexe 2.

Targeted gene capture by hybridization to illuminate ecosystem functioning

Rivière C, Beugnot R, Parisot N, Gasc C, Defois C, Denonfoux J, Boucher D, Peyretailade E, Peyret P

Methods in Molecular Biology, Springer (2016)

Targeted Gene Capture by Hybridization to Illuminate Ecosystem Functioning

Céline Ribière, Réjane Beugnot, Nicolas Parisot, Cyrielle Gasc, Clémence Defois, Jérémie Denonfoux, Delphine Boucher, Eric Peyretailade, and Pierre Peyret

Abstract

Microbial communities are extremely abundant and diverse on earth surface and play key role in the ecosystem functioning. Thus, although next-generation sequencing (NGS) technologies have greatly improved knowledge on microbial diversity, it is necessary to reduce the biological complexity to better understand the microorganism functions. To achieve this goal, we describe a promising approach, based on the solution hybrid selection (SHS) method for the selective enrichment in a target-specific biomarker from metagenomic and metatranscriptomic samples. The success of this method strongly depends on the determination of sensitive, specific, and explorative probes to assess the complete targeted gene repertoire. Indeed, in this method, RNA probes were used to capture large DNA or RNA fragments harboring biomarkers of interest that potentially allow to link structure and function of communities of interest.

Key words Solution hybrid selection, Metagenomics, Metatranscriptomics, Microbial diversity, RNA probes, Next-generation sequencing

1 Introduction

Microbial communities show the greatest organisms diversity on earth and are key players for the functioning of all the ecosystems. For example, 1 g of soil may contain up to 10^9 bacterial cells [1] and assuming 3000 genes per single bacteria genome [2] and an average of 1000 bp per gene, such cells will thus represent up to 3×10^{15} bp. To explore such diversity, next-generation sequencing (NGS) technologies, especially Illumina systems, produce a great amount of sequence information (e.g. HiSeq 2500 produces six billion paired-end reads corresponding to 600 Gb of data). High-throughput sequencing greatly improved the resolution for microbial diversity description [3]. However, a substantial number of runs (6000) must be realized with a global cost of \$267 million to

produce a dataset representing onefold coverage of the microbial from 1 g of soil [4].

To reduce this biological complexity, barcoding is an efficient method [5] but cannot establish the link between the microbial structure and the realized functions limiting the understanding levels [6]. Furthermore, various PCR biases could alter these descriptions [7]. Recently, promising approaches, based on the SHS (Solution Hybrid Selection) capture method for the selective enrichment in a target-specific biomarker from metagenomic [8] and metatranscriptomic [9] (*see* Chapter 14 for metatranscriptomic application) samples have been developed (Fig. 1). First results have showed that this technology allows the identification of rare populations within the studied environment but also to participate to large DNA fragments reconstruction potentially allowing to link structure and function in microbial communities. The success of this innovating gene capture approach, however strongly depends on the determination of the best probe set while taking the biological question into account [10]. Consequently, capture probe design is of critical importance and should therefore consider multiple parameters in order to assess the complete targeted gene repertoire. In addition, to being sensitive and specific, probes must also anticipate genetic variations and thus must be able to detect known and unknown sequences in environmental samples. To design such explorative probes, three algorithms, PhylGrid, KASpOD and HiSpOD have been developed. PhylGrid is a large-scale probe design software linked to the EGI (European Grid Infrastructure) [11]. It is an improvement of the PhylArray algorithm presented in Milton et al. [12] which relies on initial multiple sequence alignments to define regular and explorative oligonucleotide probes for SSU rRNA genes. KASpOD is a web service dedicated to the design of signature sequences using a k-mer-based algorithm [13, 14]. PhylGrid and KASpOD software were used to define 74,003 probes of 25 mer targeting SSU rRNA genes from 2178 genera including Bacteria and Archaea. These probes are available using PhylOPDb, an online resource for a comprehensive phylogenetic oligonucleotide probe database [15]. Finally, the HiSpOD program allows designing both gene-specific and sequence-specific probes to target any functional biomarker [16]. All these software, developed in the context of microbial ecology, are then particularly appropriate for the design of highly sensitive, specific, and explorative probes in the context of gene capture by hybridization. Indeed, these probes, used for the gene capture molecular approach described below will ensure the selective enrichment of DNA or RNA (*see* Chapter 14 for metatranscriptomic application) from targeted phylogenetic or functional biomarker genes of interest in complex environments.

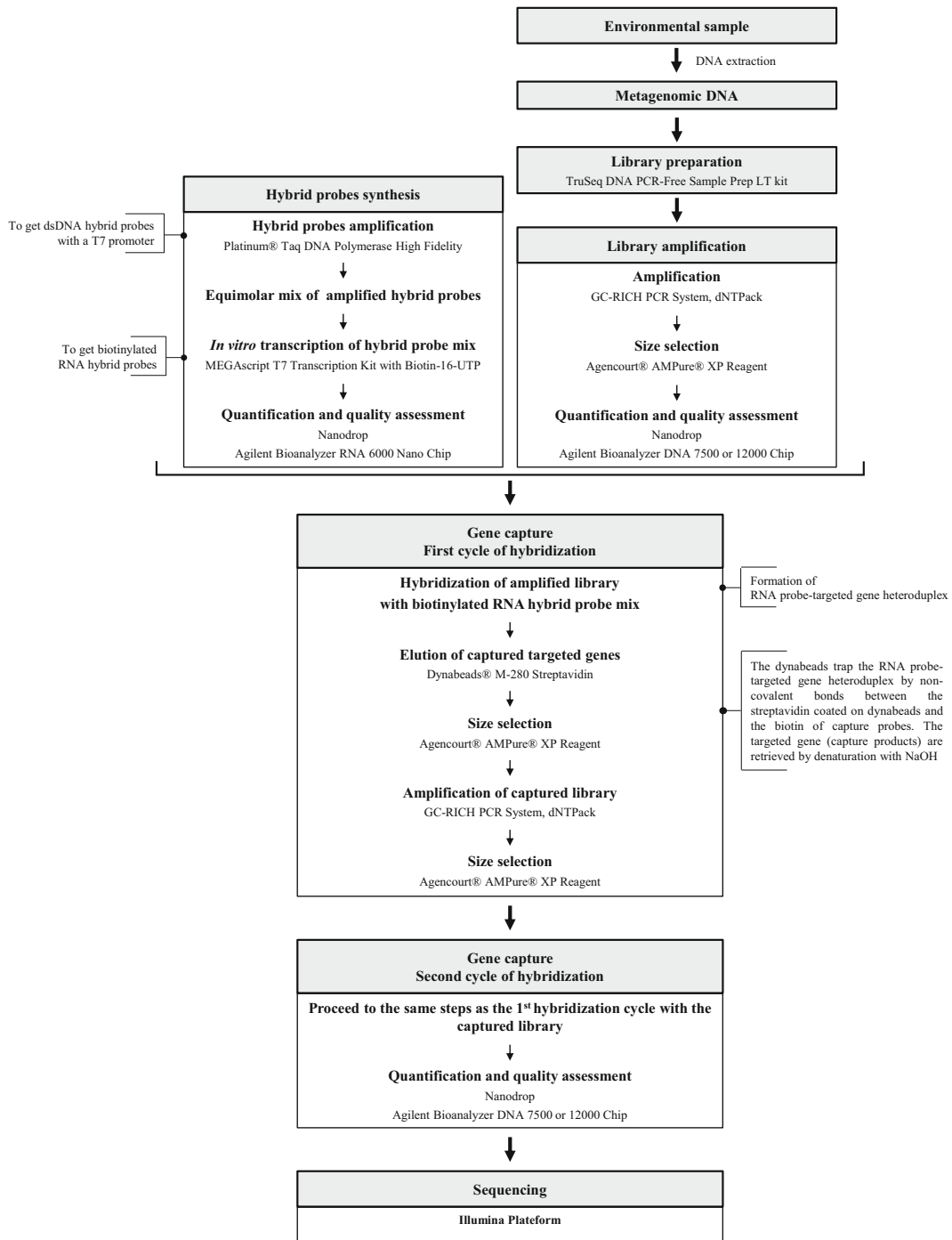


Fig. 1 Process workflow of targeted gene capture by hybridization

2 Materials

2.1 Reagents and Kits

1. Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).
2. Agilent DNA 7500 or 12000 Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).
3. Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).
4. Biotin-16-UTP (Epicentre, Madison, WI, USA).
5. Dynabeads® M-280 Streptavidin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
6. GC-RICH PCR System, dNTPack (Roche Applied Science, Basel, Switzerland).
7. Glycogen(molecular biology grade).
8. MEGAscript® T7 Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
9. MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany).
10. MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany).
11. Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
12. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany).
13. RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).
14. 10 mg/mL sheared salmon sperm DNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
15. TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep LT Set A or Set B (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.2 Buffers and Solutions

All buffers and solutions could be prepared in laboratory under DNase/RNase-free conditions or purchased in general lab supplier. Prepare all solutions using ultrapure water (prepared by purifying deionized water to attain a sensitivity of 18 MΩ cm at 25 °C) and molecular biology grade reagents. Prepare and store all solutions and buffers at room temperature (unless indicated otherwise).

1. 100× Denhardt's solution: 2 % bovine serum albumin (BSA) (Fraction V), 2 % Ficoll 400, 2 % polyvinylpyrrolidone. Weigh 1 g BSA, 1 g Ficoll 400 and 1 g polyvinylpyrrolidone and transfer to a 50 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 50 mL. Filter through a 0.2 µm syringe filter to sterilize. Divide into aliquots of 2 mL, and store at -20 °C.
2. 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): pH 8.0. Weigh 46.53 g EDTA and transfer to a 250 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 150 mL. Mix and adjust pH with

- NaOH. Make up to 250 mL with water. Sterilize by autoclaving (*see Note 1*).
3. 80 % Ethanol (*see Note 2*).
 4. 5 M NaCl. Weigh 73.08 g NaCl and transfer to a 250 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 250 mL. Sterilize by autoclaving.
 5. 1 M NaOH. Weigh 1 g NaOH and transfer into the plastic beaker. Add water to a volume of 25 mL. Stir vigorously and as precaution, place the beaker on ice (*see Note 2*).
 6. 0.1 M NaOH. Make a dilution at $1/10^6$ in nuclease-free water of 1 M NaOH solution (*see Note 2*).
 7. 3 M sodium acetate: pH 5.2. Weigh 40.83 g sodium acetate and transfer to a 100 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 80 mL. Adjust pH with glacial acetic acid. Make up to 100 mL with water. Filter through a 0.2 μm syringe filter to sterilize.
 8. 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS). Weigh 10 g SDS and transfer to a 100 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 85 mL. Heat to 68 °C and stir with a magnetic stirrer to assist dissolution. Adjust pH to 7.2 by adding a few drop of concentrated HCl (36 %). Make up to 100 mL with water. Filter through a 0.2 μm syringe filter to sterilize.
 9. 10 \times Tris-Borate-EDTA (TBE): 450 mM Tris-borate, 10 mM EDTA. Weigh 108 g Tris base, 27.5 g boric acid and transfer to a 1 L graduated cylinder. Add 10 mL of 0.5 M EDTA (pH 8.0) and water to a volume of 800 mL. Mix and adjust pH to 8. Make up to 1 L with water. Sterilize by autoclaving.
 10. 10 \times Tris-EDTA (TE): 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA. Weigh 0.24 g Tris base and 0.23 g EDTA and transfer to a 50 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 35 mL. Adjust pH to 7.5 with HCl. Make up to 50 mL with water. Sterilize by autoclaving.
 11. 1 M Tris-HCl: pH 7.5. Weigh 60.57 g Tris base and transfer to a 500 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 350 mL. Adjust pH to 7.5 with HCl. Make up to 500 mL with water. Sterilize by autoclaving.
 12. 20 \times SSC: 3 M NaCl, 0.3 M trisodium citrate. Weigh 17.53 g NaCl and 8.82 g trisodium citrate and transfer to a 100 mL graduated cylinder. Add water to a volume of 80 mL. Adjust pH to 7.0 by adding HCl. Make up to 100 mL with water. Sterilize by autoclaving.
 13. 20 \times SSPE: 3 M NaCl, 0.2 M NaH_2PO_4 , 0.02 M EDTA. Weigh 17.53 g NaCl, 2.76 g NaH_2PO_4 , and 0.74 g EDTA and transfer to the cylinder. Add water to a volume of 80 mL. Adjust pH to 7.4 with NaOH. Make up to 100 mL with water. Sterilize by autoclaving.

14. Binding buffer: 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA. Transfer 10 mL of 5 M NaCl, 500 μ L of 1 M Tris-HCl (pH 7.5) and 100 μ L of 0.5 M EDTA (pH 8.0) to the cylinder. Make up to 50 mL with water. Filter through a 0.2 μ m syringe filter to sterilize (*see Note 2*).
15. 2 \times Hybridization buffer: 10 \times SSPE, 10 \times Denhardt's solution, 10 mM EDTA, 0.2 % SDS. Transfer 10 mL of 20 \times SSPE, 2 mL of 100 \times Denhardt's solution, 400 μ L of 0.5 M EDTA (pH 8.0), and 400 μ L of 10 % SDS to a 20 mL graduated cylinder. Make up to 20 mL with water. Filter through a 0.2 μ m syringe filter to sterilize. Divide into aliquots of 2 mL, and store at -20 °C.
16. Wash buffer n°1: 1 \times SSC, 0.1 % SDS. Transfer 2.5 mL of 20 \times SSC and 500 μ L of 10 % SDS to a 50 mL graduated cylinder. Make up to 50 mL with water. Filter through a 0.2 μ m syringe filter to sterilize (*see Note 2*).
17. Wash buffer n°2: 0.1 \times SSC, 0.1 % SDS. Transfer 250 μ L of 20 \times SSC and 500 μ L of 10 % SDS to a 50 mL graduated cylinder. Make up to 50 mL with water. Filter through a 0.2 μ m syringe filter to sterilize (*see Note 2*).

2.3 Oligonucleotides (Probes and Primers)

1. Hybrid probes. Purchase hybrid probes at 100 μ M. Adaptor sequences must be added to the 5' and 3' ends of the specific capture probes. These hybrid probes consist of 5'-ATCGCA CCAGCGTGT(X)CACTGCGGCTCCTCA-3', with X indicating the specific capture probe.
2. Primers for probe amplification. Purchase oligonucleotides at 100 μ M, T7-A 5'-GGATTCTAATACGACTCACTATAGG GATCGCACCAGCGTGT-3' and B 5'-CGTGGATGAGGAG CCGCAGTG-3'.
3. Primers for library amplification. Purchase oligonucleotides at 100 μ M, TS-PCR Oligo 1 5'-AATGATACGGCGACCAC CGAGA-3' and TS-PCR Oligo 2 5'-CAAGCAGAAGACGGCA TACGAG-3'.

2.4 Equipments

1. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).
2. AFA System (Covaris, Woburn, MA, USA). One of these following items: M220, S220, S2 or E210 Focused-Ultrasonicator with the corresponding AFA Tubes (*see Note 3*).
3. DynaMag™-2 Magnet (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
4. HulaMixer® Sample Mixer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (optional).
5. Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) or other systems for DNA quantification (e.g.:

Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) or other fluorometers).

6. Speedv acuuum.
7. Thermal cycler (with heated lid).

3 Methods

3.1 Hybrid Probe Synthesis

1. First step of hybrid probe synthesis consists in amplification of oligonucleotide to obtain double-stranded DNA (dsDNA). Each amplification reaction should contain 5 μ L of 10 \times high fidelity buffer, 1 μ L of dNTPs (10 mM), 2 μ L of MgSO₄ (50 mM), 1 μ L of primer T7-A (10 μ M), 1 μ L of primer B (10 μ M), 0.2 μ L of Platinum® Taq DNA polymerase high fidelity, 38.8 μ L of nuclease-free water and 1 μ L of hybrid probe diluted at 10 μ M (*see Note 4*). Include a negative control with 1 μ L of nuclease-free water instead of 1 μ L of hybrid probe. Use a thermal cycler with the following conditions: 2 min at 94 °C then 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 20 s at 68 °C and a final elongation step at 68 °C for 5 min.
2. Check the probe amplification by electrophoresis on a 2 % agarose-TBE gel containing 0.5 \times syber safe (or comparable nucleic acid stain). Deposit 5 μ L of amplified product (with loading buffer) (*see Note 5*). One lane is reserved for 100 bp DNA ladder. The gel is run in TBE buffer at 100 V for 45 min. The DNA is visualized on a UV transilluminator.
3. If one band at the expected size is observed, proceed to the purification of the remaining 45 μ L of amplified products using the MinElute PCR Purification Kit, following the manufacturer's instructions. If two amplification bands are observed, deposit the remaining PCR product (i.e. 45 μ L), excise with a clean razor blade or scalpel the band corresponding to the size of hybrid probes and proceed to their purification using the MinElute Gel Extraction Kit, following the manufacturer's instructions. The purified product is eluted in 15 μ L of nuclease-free water (Fig. 2).
4. Evaluate the concentration of purified amplified hybrid probes with a nanodrop spectrophotometer.
5. For RNA synthesis, mix all hybrid probes in an equimolar amount taking into account the degeneracy of each probe. Each probe combination must be present in the same molecular amount (*see Note 6*). Validate the concentration of hybrid probe mix with Nanodrop spectrophotometer. Take 150 ng of hybrid probe mix, evaporate to dryness with a speed vacuum and resuspend in 4.75 μ L of nuclease-free water. If the 150 ng

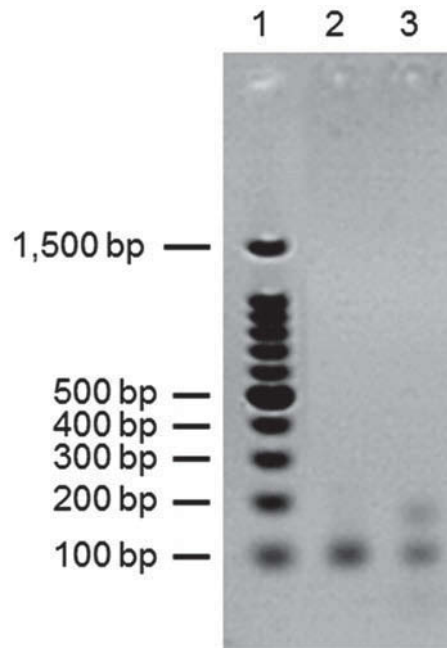


Fig. 2 Amplified hybrid probes electrophoresis on a 2 % agarose-TBE gel. *Lane 1* shows DNA ladder (100 bp). *Lane 2* shows one amplification band at the expected size, in this case at 112 bp corresponding to a hybrid probe of 50 bp with amplification primers T7-A (41 bp) and B (21 bp). *Lane 3* shows two amplification bands, one at the expected size (same as *lane 2*) and another one (at 150 bp) corresponding to aberrant amplification of the T7 promoter

of hybrid probe mix is in a volume lower than 4.75 μL , do not evaporate and adjust the volume to 4.75 μL with nuclease-free water.

6. The *in vitro* transcription (IVT) is realized with the MEGAscript[®] T7 Transcription Kit and using Biotin-16-UTP to produce biotinylated RNA. Each IVT reaction should contain 2 μL of 10 \times reaction buffer, 2 μL of ATP solution (75 mM), 2 μL of CTP solution (75 mM), 2 μL of GTP solution (75 mM), 1.5 μL of UTP solution (75 mM), 3.75 μL of biotin-16-UTP (10 mM), 2 μL of T7 enzyme mix, and the 4.75 μL of previously prepared hybrid probe mix (*see Notes 4 and 7*). Incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for at least 6 h (or overnight).
7. Add 1 μL of TURBO DNase (include in the MEGAscript[®] T7 Transcription Kit) to each IVT reaction and incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min.
8. For RNA precipitation, transfer the IVT reaction mix in a 1.5 mL microcentrifuge tube. Add 1/10^e volume of 3 M sodium acetate (pH 5.2), 3 volumes of cold 100 % ethanol, and 1 μL of glycogen (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). The reaction is incubated at

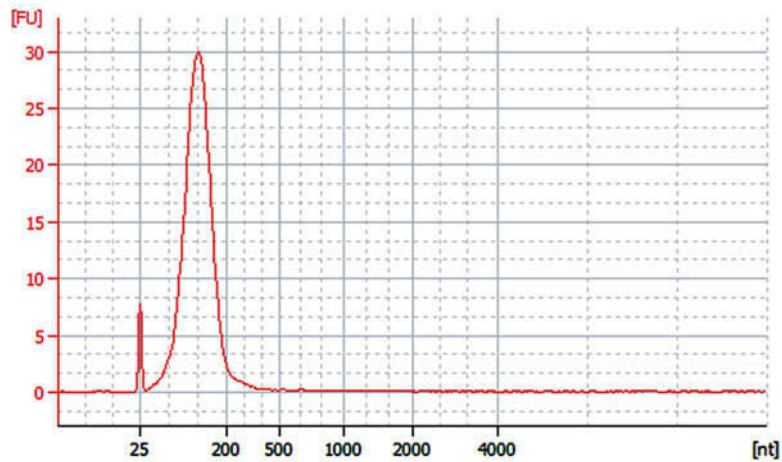


Fig. 3 Quality of biotinylated RNA probes assess on Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano chip. The electropherogram shows a resolved peak at the expected size of a hybrid probe of 50 bp with amplification primers T7-A (41 bp) and B (21 bp) (same probe as Fig. 2)

–80 °C for 30 min. Centrifuge at $18,000\times g$ for 15 min at 4 °C. Discard the supernatant and wash two times the pellet as following: add 500 μL of cold 70 % ethanol, centrifuge at $18,000\times g$ for 10 min at 4 °C and discard the supernatant. Dry the pellet with a speed vacuum. Add 100 μL of TE for pellet resuspension.

9. Proceed to the purification of biotinylated RNA probe mix with the RNeasy Plus Mini Kit following the “Appendix D: Purification of Total RNA Containing Small RNAs from Cells” instructions excepted the step D2 with the gDNA Eliminator spin column. Make two RNeasy Mini spin columns per hybrid probe mix (apply 50 μL of biotinylated RNA probe mix on each column), elute the product in 40 μL of nuclease-free water and pool the two obtained eluates.
10. Evaluate the concentration of purified biotinylated RNA probe mix with Nanodrop spectrophotometer. Assess their quality on an Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano chip, according to the manufacturer’s instructions (Fig. 3).
11. Store at –80°C .

3.2 Library Preparation (550 bp Insert)

The library is prepared for 550 bp insert using the TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep LT kit by Illumina following the manufacturer’s instructions.

3.3 Library Amplification

1. Add 30 μL of nuclease-free water to the library.
2. Proceed to the library amplification with the GC-RICH PCR System, dNTPack. Realize ten 50 μL PCR reactions per library.

Each amplification reaction should contain 10 μL of 5 \times GC-RICH PCR reaction buffer, 2 μL of 25 mM MgCl_2 , 1 μL of PCR grade nucleotide mix, 1 μL of 25 μM TS-PCR Oligo 1, 1 μL of 25 μM TS-PCR Oligo 2, 29 μL of PCR grade water, 1 μL of GC-RICH enzyme mix and 5 μL of prepared library (*see Note 4*). Use the following thermal conditions: 4 min at 94 $^\circ\text{C}$ then 20 cycles of 30 s at 94 $^\circ\text{C}$, 1 min at 58 $^\circ\text{C}$ and 1 min 30 s at 68 $^\circ\text{C}$ and a final elongation step at 68 $^\circ\text{C}$ for 3 min.

3. Purify the amplified library using the QIAquick PCR Purification Kit following the manufacturer's instructions. Use one column of the kit for two PCR reactions pooled from a same library (i.e. five columns per library). The purified product is eluted in 50 μL of nuclease-free water.
4. Select the DNA fragments size with the Agencourt[®] AMPure[®] XP Reagent. Check that the eluate volume is equal to 50 μL . If necessary make up to 50 μL with nuclease-free water. Add 50 μL of AMPure beads, gently mix by pipetting and incubate for 5 min at room temperature (*see Note 8*). Place the tubes on the magnetic stand for at least 5 min at room temperature (until the supernatant is clear). Remove and discard the supernatant from each tube. Keep the tubes on the magnetic stand and wash two times the beads like following: add 500 μL of 80 % ethanol to each tube without disturbing them, incubate for 30 s at room temperature, and then remove and discard all of the supernatant from each tube. Take care not to disturb the beads. Remove and discard any remaining ethanol with a 10 μL pipette and let the beads air-dry for 5 min at room temperature. Add 50 μL of nuclease-free water to each tube. Remove the tubes from the magnetic stand. By pipetting, resuspend the beads by repeatedly dispensing the water over the bead pellet until it is immersed in the solution. Incubate for 2 min at room temperature. Place the tubes on the magnetic stand for at least 5 min at room temperature (until the supernatant is clear). Transfer all of the supernatant from each of the five tubes into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (*see Note 9*).
5. Evaluate the concentration of purified amplified library with NanoDrop spectrophotometer. Assess its quality on an Agilent DNA 7500 or 12000 chip, according to the manufacturer's instructions (Fig. 4).
6. Store the purified amplified libraries at $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.4 Gene Capture by Hybridization

1. Transfer 2.5 μg of sheared salmon sperm DNA and 500 ng of purified amplified library into a 0.2 mL PCR tube (*see Note 10*). Evaporate to dryness with a speed vacuum and resuspend in 7 μL of nuclease-free water.
2. Thaw an aliquot of 2 \times hybridization buffer, prewarmed it at 65 $^\circ\text{C}$ and transfer 20 μL into a 0.2 mL PCR tube (*see Note 11*).

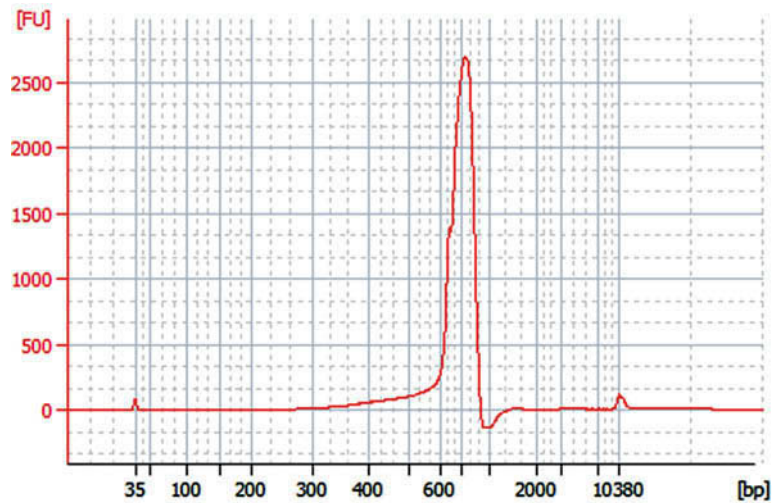


Fig. 4 Quality of amplified library (prepared for 650 bp insert) assess on an Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip. The electropherogram shows a peak focused on 770 bp for the case of library prepared for 650 bp insert with 120 bp Illumina adaptors. With a library prepared for 550 bp, the same profile will be observed but with a peak focused on 670 bp

3. Thaw the biotinylated RNA probe mix on ice, transfer 500 ng into a 0.2 mL PCR tube and adjust the volume to 6 μ L with nuclease-free water (*see Notes 11 and 12*).
4. Incubate the salmon sperm DNA/purified amplified library (SL) mix in a thermal cycler with the following conditions: 95 $^{\circ}$ C for 5 min and 65 $^{\circ}$ C at 5 min.
5. Without removing SL mix from the thermal cycler, incubate at 65 $^{\circ}$ C the 0.2 mL PCR tube with 2 \times hybridization buffer. Add quickly 13 μ L of prewarmed 2 \times hybridization buffer to the tube containing the SL mix and homogenize by pipetting.
6. Always without removing SL mix from the thermal cycler, incubate at 65 $^{\circ}$ C the 0.2 mL PCR tube with the biotinylated capture probes mix. Add quickly 6 μ L of probe mix to SL mix (hybridization mix) and homogenize by pipetting. Incubate at 65 $^{\circ}$ C for the obtained hybridization mix 24 h in the thermal cycler.
7. Prior to removing the hybridization mix from the thermal cycler, prepare the Dynabeads[®] M-280 Streptavidin as following: transfer 50 μ L of dynabeads into a 1.5 mL microcentrifuge tube (*see Note 11*), place the tube on the magnetic stand until the supernatant is clear, remove and discard it. Wash three times the dynabeads as following: add 200 μ L of binding buffer, gently tap the tube to resuspend the dynabeads, place the tube on the magnetic stand until the supernatant is clear, remove and discard the supernatant. Take care not to disturb

- the dynabeads. After the three washes, resuspend the dynabeads in 200 μL of binding buffer.
8. Add the 26 μL of hybridization mix to the washed dynabeads. Gently tap the tube to resuspend the dynabeads and incubate for 30 min at room temperature (off the magnetic stand). Regularly resuspend the dynabeads during the incubation by gently taping the tube (*see Note 13*).
 9. During the incubation, pre-warm the wash buffer n°2 at 65 °C (at least 1.5 mL per captured library).
 10. After the incubation, place the tube on the magnetic stand until the supernatant is clear. Remove and discard the supernatant. Take care not to disturb the dynabeads. Add 500 μL of wash buffer n°1 and resuspend the dynabeads by gently taping the tube. Incubate for 15 min at room temperature (off the magnetic stand). Regularly resuspend the dynabeads during the incubation by gently taping the tube (*see Note 13*).
 11. After the incubation, place the tube on the magnetic stand until the supernatant is clear, remove and discard it. Take care not to disturb the dynabeads. Wash three times the dynabeads as following: resuspend the dynabeads in 500 μL of pre-warmed wash buffer n°2, incubate for 10 min at 65 °C (off the magnetic stand). Regularly resuspend the dynabeads during the incubation by gently taping the tube. Place the tube on the magnetic stand until the supernatant is clear. Remove and discard the supernatant. Take care not to disturb the dynabeads.
 12. Resuspend the dynabeads in 50 μL of 0.1 M NaOH by vortexing the tube for 5 s (*see Note 2*). Incubate for 10 min at room temperature (off the magnetic stand).
 13. Place the tube on the magnetic stand until the supernatant is clear and transfer it to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 70 μL of 1 M Tris-HCl (pH 7.5). Take care not to disturb the Dynabeads.
 14. Purify the captured library using the QIAquick PCR Purification Kit following the manufacturer's instructions. The purified product is eluted in 50 μL of nuclease-free water.
 15. Select the DNA fragment size with the Agencourt® AMPure® XP Reagent as indicated in **step 4** of Subheading **3.3**.
 16. Amplify the captured library using the GC-RICH PCR System, dNTPack. Make five 50 μL PCR reactions per captured library and proceed in the same way as the **step 2** of Subheading **3.3** but realize 25 amplification cycles instead of 20 in the thermal conditions.
 17. Purify the amplified captured library using the QIAquick PCR Purification Kit following the manufacturer's instructions. Realize one column for 2.5 amplification reactions from a same

library (i.e. two columns per library (125 μ L)). The purified product is eluted in 50 μ L of nuclease-free water.

18. Select the DNA fragment size with the Agencourt[®] AMPure[®] XP Reagent as indicated in **step 4** of Subheading **3.3**.
19. Evaluate the concentration of purified amplified captured library with Nanodrop spectrophotometer.
20. Proceed to a second cycle of hybridization by repeating the **steps 1–15** with the purified amplified capture products obtained previously (*see Notes 14 and 15*).
21. Amplify the captured library using the GC-RICH PCR System, dNTPack. Make ten PCR reactions per library and proceed in the same way as the **step 2** of Subheading **3.3** but realize 25 amplification cycles instead of 20 in the thermal conditions.
22. Purify the amplified captured library using the QIAquick PCR Purification Kit following the manufacturer's instructions. Realize one column for two amplification reactions from a same library (i.e. five columns per library). The purified product is eluted in 50 μ L of nuclease-free water.
23. Select the DNA fragment size with the Agencourt[®] AMPure[®] XP Reagent as indicated in **step 4** of Subheading **3.3**.
24. Evaluate the concentration of purified amplified captured library with Nanodrop spectrophotometer. Assess its quality on an Agilent DNA 7500 or 12000 chip, according to the manufacturer's instructions (Fig. 5).

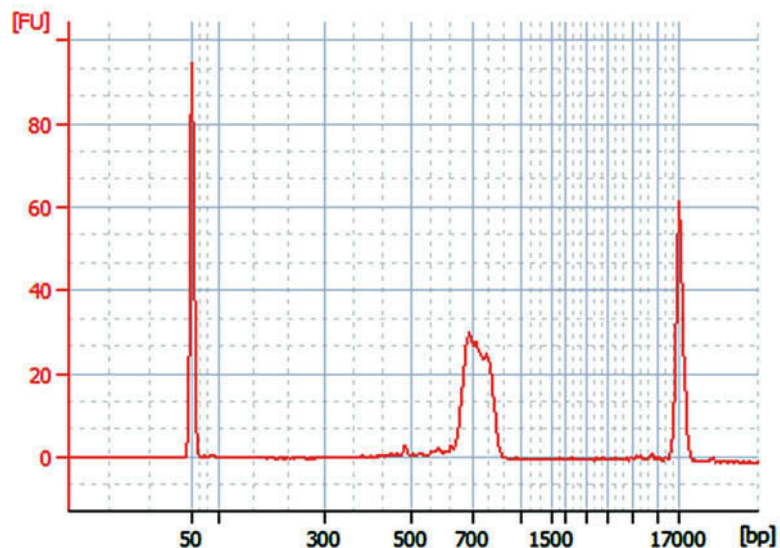


Fig. 5 Quality of captured library (prepared for 650 bp insert) assess on an Agilent Bioanalyzer 12000 DNA chip. The electropherogram shows a peak focused on 770 bp for the case of library prepared for 650 bp insert with 120 bp Illumina adaptor. With a library prepared for 550 bp, the same profile will be observed but with a peak focused on 670 bp

25. Store the purified amplified captured library products at -20°C .
26. Proceed to the sequencing of captured library on an Illumina sequencer compatible with the kit use to prepare the library.

4 Notes

1. EDTA will not go into solution until the pH of the solution is adjusted to ~ 8.0 by the addition of 1 M NaOH.
2. Buffers and solutions must be extemporaneously prepared.
3. For the fragmentation of gDNA, we recommend, as Illumina, to use Covaris microTUBES with a focused-ultrasonicator. Covaris offers different models of focused-ultrasonicator and the material necessary for the fragmentation depends on the focused-ultrasonicator used.
4. Include 10 % excess for multiple samples.
5. The verification of the amplified hybrid probe size by electrophoresis on a 2 % agarose-TBE gel is absolutely necessary. It is possible to get two amplification bands, one at the expected size (i.e. size of hybrid probe with amplification primers T7-A and B) and another due to aberrant amplification of the T7 promoter. Only the correct band at the expected size must be excised and purified.
6. For example, three hybrid probes (specific capture probe and adaptor sequences) are necessary for the mix with specific capture probe as following: probe A 5'-CCCAGGATWAGATACCKCCYAGTTTAYRC-3', probe B 5'-TTCAGAAGTAGATATGCTGGTAGTCTACCA-3' and probe C 5'-TGCACAATCAGATAGTYTGGYAGTGACCGC-3'. The probe A has one W base (two combinations, T or A), one K base (two combinations, T or G), two Y bases (two combinations, C or T), and one R base (two combinations, A or G), therefore there is 32 possible combinations for the probe A ($1\text{ W} \times 1\text{ K} \times 2\text{ Y} \times 1\text{ R} = 2 \times 2 \times (2 \times 2) \times 2 = 32$). In the same way, the probes B and C have a degeneracy of 1 (none degenerated base) and 4 (2×2) respectively. To make the hybrid probe mix, use $1/32^{\text{e}}$ in quantity of the probe B and $1/8^{\text{e}}$ in quantity of the probe C compared to the probe A. Thus, for 500 ng of probe A, add 15.6 ng of probe B and 62.5 ng of probe C. In this example, the three probes have the same size, otherwise you must calculate a number of molecules (taking into account the size of each probe) to realize an equimolar mix.
7. The IVT reaction mix must be realized at room temperature. Indeed the spermidine in the 10 \times reaction buffer can coprecipitate the template DNA if the reaction is assembled on ice.

8. Remove the AMPure beads from 2 to 8 °C storage and let stand for at least 30 min to bring them to room temperature. Vortex the room temperature AMPure beads for at least 1 min or until they are well dispersed. Vortex the beads frequently and collect them by slowly pipetting (due to their viscosity) to make sure that they are evenly distributed.
9. Be sure not to retrieve beads with the supernatant because the beads can interfere with the following steps. It is better to retrieve less volume of clear supernatant and if necessary to adjust the volume by adding nuclease-free water to the purified product.
10. The sheared salmon sperm DNA commercial solution is concentrated at 10 mg/mL. Make a dilution at 1/10^e in nuclease-free water and pipette 2.5 µL to get 2.5 µg of sheared salmon sperm DNA.
11. Make as many aliquots as captured library.
12. It could be necessary to dilute the biotinylated RNA probe mix. The 500 ng of the biotinylated RNA probe mix should be in a volume less than or equal to 6 µL.
13. Alternatively, incubate the appropriate time at room temperature with tilting and gentle rotation on a HulaMixer Sample Mixer or other similar device.
14. If you do not plan to proceed immediately to the second cycle of hybridization, the protocol can be safely stopped here. If you are stopping, store the tubes at -20 °C.
15. If the quantity of purified amplified capture products, obtained after the first cycle of hybridization, is less than 500 ng, proceed to the second cycle of hybridization with the totality of the sample.

References

1. Schloss PD, Handelsman J (2006) Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol*. doi:[10.1371/journal.pcbi.0020092](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092)
2. Vieites JM, Guazzaroni M-E, Beloqui A et al (2009) Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 33:236–255
3. Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21:1794–1805
4. Desai N, Antonopoulos D, Gilbert JA et al (2012) From genomics to metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 23:72–76
5. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T et al (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. doi:[10.1093/nar/gks808](https://doi.org/10.1093/nar/gks808)
6. Allen EE, Banfield JF (2005) Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat Rev Microbiol* 3:489–498
7. Hong S, Bunge J, Leslin C et al (2009) Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J* 3:1365–1373
8. Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E et al (2013) Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA Res* 20:185–196
9. Bragalini C, Ribière C, Parisot N et al (2014) Solution hybrid selection capture for the recovery of functional full-length eukaryotic cDNAs

- from complex environmental samples. *DNA Res* 21:685–694
10. Dugat-Bony E, Peyretailade E, Parisot N et al (2012) Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environ Microbiol* 14:356–371
 11. Jaziri F, Peyretailade E, Missaoui M et al (2014) Large scale explorative oligonucleotide probe selection for thousands of genetic groups on a computing grid: application to phylogenetic probe design using a curated small subunit ribosomal RNA gene database. *Sci World J*. doi:[10.1155/2014/350487](https://doi.org/10.1155/2014/350487)
 12. Militon C, Rimour S, Missaoui M et al (2007) PhylArray: phylogenetic probe design algorithm for microarray. *Bioinformatics* 23:2550–2557
 13. Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E et al (2012) KASpOD—a web service for highly specific and explorative oligonucleotide design. *Bioinformatics* 28:3161–3162
 14. Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E et al (2014) Software tools for the selection of oligonucleotide probes for microarrays. In: He Z (ed) *Current technology, innovations and applications*. Academic, New York
 15. Jaziri F, Parisot N, Abid A et al (2014) PhylOPDb: a 16S rRNA oligonucleotide probe database for prokaryotic identification. Database. doi:[10.1093/database/bau036](https://doi.org/10.1093/database/bau036)
 16. Dugat-Bony E, Missaoui M, Peyretailade E et al (2011) HiSpOD: probe design for functional DNA microarrays. *Bioinformatics* 27: 641–648

Annexe 3.

ASaiM: a Galaxy-based framework to analyze raw shotgun data from microbiota

Batut B, Gravouil K, Defois C, Hiltemann S, Brugère J-F, Peyretailade E, Peyret P

Soumis à *Gigascience* (2017)

ASaiM: a Galaxy-based framework to analyze raw shotgun data from microbiota

B er enice Batut^{1,*}, K evin Gravouil^{2,3,4}, Cl emence Defois², Saskia Hiltemann⁵, Jean-François Brug ere², Eric Peyretailade² and Pierre Peyret^{2,*}

Author affiliations

¹Bioinformatics Group, Department of Computer Science, University of Freiburg, Germany

²Universit e Clermont Auvergne, INRA, MEDIS, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³Universit e Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁴Universit e Clermont Auvergne, CNRS, LIMOS, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁵Department of Bioinformatics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, 3015 CE, Netherlands

Correspondence should be addressed to B.B. (berenice.batut@gmail.com) and P.P.

(pierre.peyret@uca.fr)

Abstract

Background

New generation of sequencing platforms coupled to numerous bioinformatics tools has led to rapid technological progress in metagenomics and metatranscriptomics to investigate complex microorganism communities. Nevertheless, a combination of different bioinformatic tools remains necessary to draw conclusions out of microbiota studies. Modular and user-friendly tools would greatly improve such studies.

Findings

We therefore developed ASaiM, an Open-Source Galaxy-based framework dedicated to microbiota data analyses. ASaiM provides a curated collection of tools to explore and visualize taxonomic and functional information from raw amplicon, metagenomic or metatranscriptomic sequences. To guide different analyses, several customizable workflows are included. All workflows are supported by tutorials and Galaxy interactive tours to guide the users through the analyses step by step. ASaiM is implemented as Galaxy Docker flavour. It is scalable to many thousand datasets, but also can be used a normal PC. The associated source code is available under Apache 2 license at <https://github.com/ASaiM/framework> and documentation can be found online (<http://asaim.readthedocs.io/>)

Conclusions

Based on the Galaxy framework, ASaiM offers sophisticated analyses to scientists without command-line knowledge. ASaiM provides a powerful framework to easily and quickly explore microbiota data in a reproducible and transparent environment.

Keywords

Metagenomics, Metabarcoding, User-friendly, Galaxy, Docker, Microbiota,

Findings

Background

The study of microbiota and microbial communities has been facilitated by the evolution of sequencing techniques and the development of metagenomics and metatranscriptomics. These techniques are giving insight into phylogenetic properties and metabolic components of microbial communities. However, meta'omic data exploitation is not trivial due to the large amount of data, high variability, incompleteness of reference databases, difficulty to find, configure, use and combine the dedicated bioinformatics tools, etc. Hence, to extract useful information, a sequenced microbiota sample has to be processed by sophisticated workflows with numerous successive bioinformatics steps [1]. Each step may require execution of several tools or software programs. For example, to extract taxonomic information with the widely used QIIME [2] or Mothur [3], at least 10 different tools with at least 4 parameters each are needed. Designed for amplicon data, both QIIME and Mothur can not be directly applied to shotgun metagenomics data. In addition, the tools can be complex to use; they are command-line tools and may require computational resources specially for the metagenomics datasets. In this context, selecting the best tools, configuring them to use the correct parameters and appropriate computational resources and combining them together in an analysis chain is a complex and error-prone process. These issues and the involved complexity are blocking scientist from participating in the analysis of their own data. Furthermore, bioinformatics tools are often manually executed and/or patched together with custom scripts. These practices raise doubts about a science gold standard: reproducibility

[3,4]. Web services and automated pipelines such as MG-RAST [5] and EBI metagenomics [6] offer solutions to the accessibility issue. However, these web services work as a black box and are lacking in transparency, flexibility and even reproducibility as the version and parameters of the tools are not always available. Alternative approaches to improve accessibility, modularity and reproducibility can be found in open-source workflow systems such as Galaxy [6–8]. Galaxy is a lightweight environment providing a web-based, intuitive and accessible user interface to command-line tools, while automatically managing computation and transparently managing data provenance and workflow scheduling [6–8]. More than 4,500 tools can be used inside Galaxy environments. The tools can be selected and combined to build Galaxy flavors focusing on specific type of analysis, *e.g.* the Galaxy RNA workbench [9].

In this context, we developed ASaiM (Auvergne Sequence analysis of intestinal Microbiota), an Open-Source opinionated Galaxy-based framework. It integrates tools and workflows dedicated to microbiota analyses with an extensive documentation (<http://asaim.readthedocs.org>) and training support.

Goals of ASaiM

ASaiM is developed as a modular, accessible, redistributable, sharable and user-friendly framework for scientists working with microbiota data. This framework is unique in combining curated tools and workflows and providing easy access for scientists.

ASaiM is based on four pillars: 1) easy and stable dissemination via Galaxy, Docker and conda, 2) a comprehensive set of metagenomics related tools, 3) a set of predefined and tested workflows, and 4) extensive documentation and training to help scientists in their analyses.

A framework built on the shoulders of giants

The ASaiM framework is built on existing tools and infrastructures and combine all their forces to build an easily accessible and reproducible analysis platform.

ASaiM is implemented as portable virtualized container based on Galaxy framework [8].

Galaxy provides researchers with means to reproduce their own workflows analyses, rerun entire pipelines, or publish and share them with others. Based on Galaxy, ASaiM is scalable from single CPU installations to large multi-node high performance computing environments.

Deployments can be archived by using a pre-built ASaiM Docker image, which is based on the Galaxy Docker project (<http://bgruening.github.io/docker-galaxy-stable>) or by installing all needed components into an already existing Galaxy instance. This ASaiM Docker instance

is customized with a variety of selected tools, workflows, Interactive tours and data that have been added as additional layers on top of the generic Galaxy Docker instance. The

containerization keeps the deployment task to a minimum. The selected Galaxy tools are automatically installed from the Galaxy ToolShed [10] (<https://toolshed.g2.bx.psu.edu/>) using

the Galaxy API BioBlend [11] and the installation of the tools and their dependencies are automatically resolved using packages available through Bioconda

(<https://bioconda.github.io>). We migrated then 10 tools/suites of tools and their

dependencies to Bioconda (e.g. HUMAnN2) and integrated 14 suites into Galaxy (e.g.

QIIME with around forty tools).

The containerization as well as the packaging with conda enables automatic continuous integration tests at different levels: dependencies (BioConda), tool integration in Galaxy,

Galaxy itself and at ASaiM level. Together with strict version management on all levels, this contributes to a high degree of error-control and reproducibility.

Tools for microbiota data analyses

The tools integrated in ASaiM can be seen in Table 1. They are expertly selected for their relevance with regard to microbiota studies, such as Mothur [3], QIIME [2], MetaPhlan2 [12], HUMAnN2 [13] or tools used in existing pipelines such as EBI Metagenomics' one. We also added general tools used in sequence analysis such as quality control, mapping or similarity search tools.

Table 1: Available tools in ASaiM

Section	Subsection	Tools
File and meta tools	Data retrieval	EBISearch, ENASearch, SRA Tools
	Text manipulation	Tools from Galaxy ToolShed
	Sequence file manipulation	Tools from Galaxy ToolShed
	BAM/SAM file manipulation	SAM tools [15–17]
	BIOM file manipulation	BIOM-Format tools [18]
Genomics tools	Assembly	FastQ joiner [19], FastQ-join
	Quality control	FastQC, PRINSEQ [20], Trim Galore!, Trimmomatic [21]
	Clustering	CD-Hit [22], Format CD-HIT outputs
	Sorting	SortMeRNA [23]
	Mapping	BWA [24,25], Bowtie [26]
	Similarity search	NCBI Blast+ [27,28], Diamond [29]
	Alignment	HMMER3
Microbiota dedicated tools	Metagenomics data manipulation	VSEARCH [14]
	Amplicon sequence processing	Mothur [3], QIIME [2]
	Taxonomy assignation on WGS sequences	MetaPhlan2 [12], Format MetaPhlan2, Kraken [30]
	Metabolism assignation	HUMAnN2 [13], Group HUMAnN2 to GO slim terms , Compare HUMAnN2 outputs, PICRUST [31],

InterProScan	
Combination of functional and taxonomic results	Combine MetaPhlAn2 and HUMAnN2 outputs
Visualization	Export2graphlan, GraPhlAn , Krona

This table presents the tools, organized in section and subsections to help users. A more detailed table of the available tools and some documentation can be found in the online documentation (<http://asaim.readthedocs.org/>)

An effort in development was made to integrate these tools into Conda and the Galaxy environment, with the help and support of the Galaxy community. We also developed two new tools to search and get data from EBI Metagenomics and ENA databases using the API of the databases (EBISearch and ENASearch) and a tool to group HUMAnN2 outputs into Gene Ontology Slim Terms. Tools inside ASaiM are organized to make them findable and documented (<http://asaim.readthedocs.org/>).

Diverse source of data

Any easy way to upload user-data into ASaiM is provided by an web-interface or more sophisticated via FTP or SFTP. Moreover, we added specialised tools that can interact with external databases like NCBI, ENA or EBI Metagenomics to query them and download data into the framework.

Visualization of the data

An analysis often ends with summarizing figures that conclude and represent the findings. ASaiM includes standard interactive plotting tools to draw bar charts and scatter plots from all kinds of tabular data. Pinch visualization is also included to interactively visualize and explore any BIOM file, and generate different types of ready-to-publish figures. We also integrated two other tools to explore and represent the community structure from outputs of MetaPhlAn: KRONA ([Ondov et al. 2011](#)) and GraPhlAn. Moreover, as in any Galaxy

instance, other visualization are included such PhyloViz for phylogenetic trees or the Genome browser Trackster for visualizing SAM/BAM, BED, GFF/GTF, WIG, bigWig, bigBed, bedGraph, and VCF datasets.

Workflows

Each tool can be used separately in an explorative manner or multiple tools can be orchestrated inside workflows passing raw data to the data reduction step, to information extraction and visualization. To assist in microbiota analyses, several default but customizable workflows are proposed in ASaiM. All the available workflows with tool and parameter choices are documented (<http://asaim.readthedocs.org/>).

Analysis of raw metagenomic or metatranscriptomic shotgun data

A workflow quickly produces, from raw metagenomic or metatranscriptomic shotgun data, accurate and precise taxonomic assignments, wide extended functional results and taxonomically related metabolism information (Figure 1). This workflow consists of i) processing with quality control/trimming (FastQC and Trim Galore!) and dereplication (VSearch [14]; ii) taxonomic analyses with assignment (MetaPhlAn2 [12]) and visualization (KRONA , GraPhlAn); iii) functional analyses with metabolic assignment and pathway reconstruction (HUMAN2 [13]); iv) functional and taxonomic combination with developed tools combining HUMAN2 and MetaPhlAn2 outputs.

This workflow has been tested on two mock metagenomic datasets with controlled communities (Supplementary material). We have compared the extracted taxonomic and functional information to such information extracted with the EBI metagenomics' pipeline and to the expectations from the mock datasets. With ASaiM, we generate more accurate and precise data for taxonomic analyses (Figure 2): we can access information at the level of the species. More informative data for metabolic description (gene families, gene ontologies,

pathways, etc) are also extracted with ASaiM compared to the ones available on EBI metagenomics. With this workflow, we can investigate which taxons are involved in a specific pathway or a gene family (e.g. involved species and their relative involvement in different step of fatty acid biosynthesis pathways, Figure 3).

For the tests, ASaiM was deployed on a computer with Debian GNU/Linux System, 8 cores Intel(R) Xeon(R) at 2.40 GHz and 32 Go of RAM. The workflow processed the 1,225,169 and 1,386,198 454 GS FLX Titanium reads of each datasets in 4h44 and 5h22 respectively, with a stable memory usage (Supplementary material). With this workflow, it is then easy and quick to process raw microbiota data and extract diverse useful information.

Analysis of amplicon data

To analyze amplicon data, the Mothur and QIIME tool suites are available to ASaiM. We integrated the workflows described in tutorials of Mothur and QIIME websites, as example of amplicon data analyses as well as support for the training material. These workflows, as any workflows available in ASaiM, can be adapted for a specific analysis or used as subworkflows by the users.

Running as in EBI metagenomics

The tools used in the EBI Metagenomics pipeline are also available in ASaiM. We integrate then also a workflow with the same steps as the EBI Metagenomics pipeline. Analyses made in EBI Metagenomics website can be then reproduced locally, without having to wait for availability of EBI Metagenomics or to upload any data on EBI Metagenomics. However the parameters must be defined by the user as we can not find them on EBI Metagenomics documentation.

Documentation and training

A tool or software is easier to use if it is well documented. Hence extensive documentation helps the users to be familiar with the tool and also prevents mis-usage. For ASaiM, we developed an extensive online documentation (<http://asaim.readthedocs.io/>), mainly to explain how to use it, how to deploy it, which tools are integrated with small documentation about these tools, which workflows are integrated and how to use them.

In addition to this online documentation, Galaxy Interactive Tours are included inside the Galaxy instance. Such tours guide users through an entire analysis in an interactive (step-by-step) way. Some tours, included in every Galaxy instance, explains how to use Galaxy. We also developed such tours dedicated specifically to the ASaiM workflows.

These interactive tours are used to complement tutorials and trainings. Some tutorials about the integrated workflows have been developed to explain step-by-step the workflows with small example datasets. Hosted in the Galaxy Training Network (GTN) GitHub repository (<https://github.com/galaxyproject/training-material>), the tutorials are available online at <http://training.galaxyproject.org>. They have been used during several workshops on metagenomics data analysis with ASaiM as training support. These tutorials are also accessible directly from ASaiM and its documentation for self-training.

Installation and running ASaiM

Running the containerized ASaiM simply requires to install Docker and to start the ASaiM image with:

```
$ docker run -d -p 8080:80 quay.io/bebatut/asaim
```

Thanks to Docker, ASaiM can be installed under every operating systems, even with a graphical tool (Kitematic: <https://kitematic.com>) on OSX and Windows.

ASaiM is production-ready. It can also be configured to use external accessible computer clusters or cloud environments.

It is also possible and easy to install all or only a subset of tools of the ASaiM framework on existing Galaxy instances. The set of available tools can be easily extended either only a given instance using the Galaxy admin interface or for ASaiM more generally thanks to the simple definition of the installed tools in YAML files available in ASaiM GitHub repository. In the latter case, the Docker image will be automatically rebuilt and the already integrated tools will be updated to keep ASaiM up-to-date. For reproducibility reason, every version of the Docker image is associated to a tag and is conserved.

Conclusion

ASaiM provides a powerful framework to easily and quickly analyze microbiota data in a reproducible, accessible and transparent way. Built on a Galaxy instance wrapped in a Docker image, ASaiM can be easily deployed with a comprehensive set of tools and their dependencies. These tools are complemented with a set of predefined and tested workflows to address the main microbiota questions (community structure and functions). All these tools and workflows are extensively documented online (<http://asaim.readthedocs.io>) and supported by Galaxy Interactive Tours and tutorials.

With this complete infrastructure, ASaiM offers a good environment for sophisticated microbiota analyses to scientists without computational knowledge, while promoting transparency, sharing and reproducibility.

Methods

For the tests, ASaiM was deployed on a computer with Debian GNU/Linux System, 8 cores Intel(R) Xeon(R) at 2.40 GHz and 32 Go of RAM. The workflow has been run on two mock community samples of Human Microbiome Project (HMP), containing a genomic mixture of

22 known microbial strains. The details of comparison analyses are described in the Supplementary Material.

Availability of supporting source code and requirements

- Project name: ASaiM
- Project home page: <https://github.com/ASaiM/framework>
- Operating system(s): Platform independent
- Other requirements: Docker
- License: Apache 2

All tools described herein are available in the Galaxy Toolshed (<https://toolshed.g2.bx.psu.edu>). The Dockerfile to automatically install deploy ASaiM is provided in the GitHub repository and a pre-built Docker image is available at <https://quay.io/repository/bebatut/asaim-framework>.

Declarations

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Funding

The Auvergne Regional Council and the European Regional Development Fund have supported this work.

Authors' contributions

BB, KG, CD, SH, JFB, EP, PP contributed equally to the conceptualization, to the methodology and to the writing process. JFP, PP contributed equally to the funding

acquisition. BB, KG, SH contributed equally to the software development and BB, KG, CD and JFP to the validation.

Acknowledgements

The authors would like to thank EA 4678 CIDAM, UR 454 INRA, M2iSH, LIMOS, CRRRI for their involvement in this project, as well as Réjane Beugnot, Thomas Eymard, David Parsons and Björn Grüning for their help.

References

1. Ladoukakis E, Kollis FN, Chatziioannou AA. Integrative workflows for metagenomic analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:70.
2. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Gregory Caporaso J, Knight R. Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. *Current Protocols in Microbiology.* 2012. p. 1E.5.1–1E.5.20.
3. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75:7537–41.
4. Nekrutenko A, Taylor J. Next-generation sequencing data interpretation: enhancing reproducibility and accessibility. *Nat. Rev. Genet.* 2012;13:667–72.
5. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:386.
6. Hunter S, Corbett M, Denise H, Fraser M, Gonzalez-Beltran A, Hunter C, et al. EBI metagenomics--a new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D600–6.
7. Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Galaxy Team. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 2010;11:R86.
8. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:W3–10.
9. Grüning BA, Fallmann J, Yusuf D, Will S, Erxleben A, Eggenhofer F, et al. The RNA workbench: best practices for RNA and high-throughput sequencing bioinformatics in Galaxy. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx409>

10. Blankenberg D, Von Kuster G, Bouvier E, Baker D, Afgan E, Stoler N, et al. Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. *Genome Biol.* 2014;15:403.
11. Sloggett C, Goonasekera N, Afgan E. BioBlend: automating pipeline analyses within Galaxy and CloudMan. *Bioinformatics.* 2013;29:1685–6.
12. Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, et al. MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. *Nat. Methods.* 2015;12:902–3.
13. Abubucker S, Segata N, Goll J, Schubert AM, Izard J, Cantarel BL, et al. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput. Biol.* 2012;8:e1002358.
14. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016;4:e2584.
15. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* 2011;27:2987–93.
16. Li H. Improving SNP discovery by base alignment quality. *Bioinformatics.* 2011;27:1157–8.
17. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9.
18. McDonald D, Clemente JC, Kuczynski J, Rideout JR, Stombaugh J, Wendel D, et al. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *Gigascience.* 2012;1:7.
19. Blankenberg D, Gordon A, Von Kuster G, Coraor N, Taylor J, Nekrutenko A, et al. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics.* 2010;26:1783–5.
20. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011;27:863–4.
21. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30:2114–20.
22. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2012;28:3150–2.
23. Kopylova E, Noé L, Touzet H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics.* 2012;28:3211–7.
24. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25:1754–60.
25. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26:589–95.
26. Press AR. Ultrafast and Memory-Efficient Alignment of Short DNA Sequences to the Human Genome. CreateSpace; 2015.
27. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, et al. BLAST+:

architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:421.

28. Cock PJA, Chilton JM, Grüning B, Johnson JE, Soranzo N. NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *Gigascience*. 2015;4:39.

29. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods*. 2015;12:59–60.

30. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*. 2014;15:R46.

31. Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol*. 2013;31:814–21.

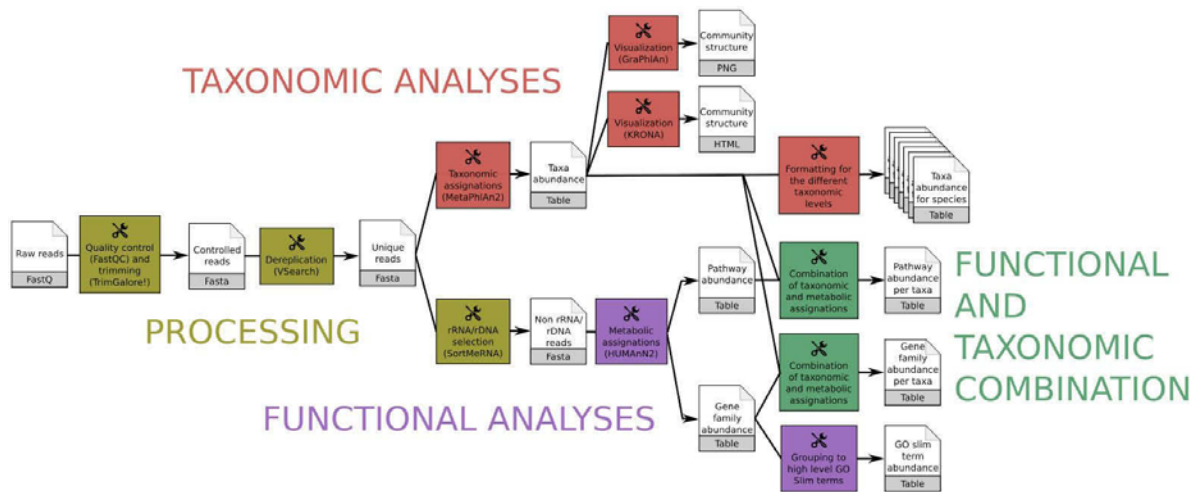


Figure 1: Main ASaiM workflow to analyze raw sequences.

This workflow takes as input a dataset of raw shotgun sequences (in FastQ format) from microbiota, preprocess it (yellow boxes), extracts taxonomic (red boxes) and functional (purple boxes) assignments and combines them (green boxes).

Image available under CC-BY license (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5371396.v3>)

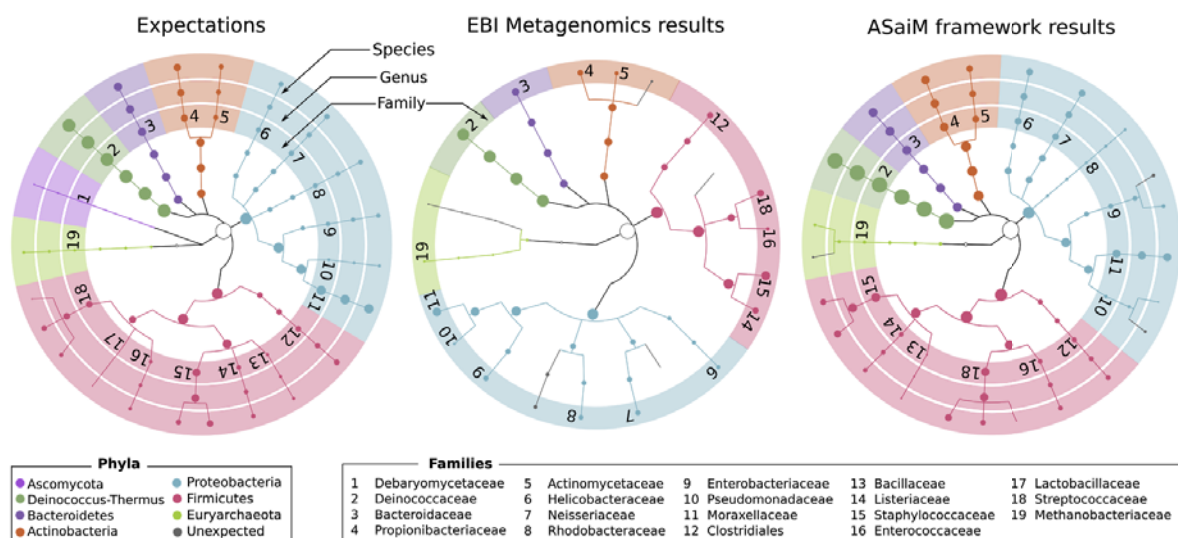


Figure 2: Comparisons of the community structure for SRR072233.

This figure compares the community structure between the expectations (mapping of the sequences on the expected genomes), data found on EBI Metagenomics database (extracted with the EBI Metagenomics pipeline) and the results of the main ASaiM workflow (Figure 1).

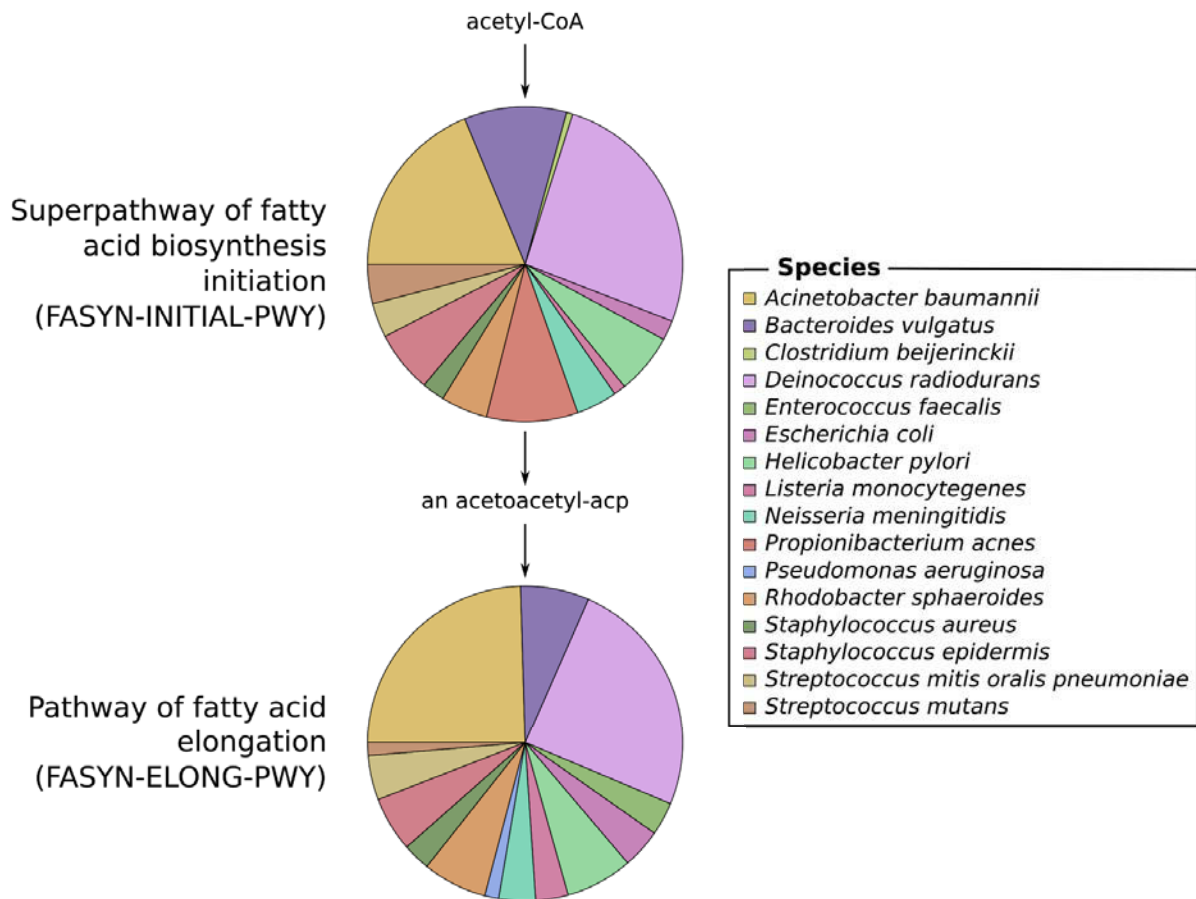


Figure 3: Example of an investigation of the relation between community structure and functions.

The involved species and their relative involvement in fatty acid biosynthesis pathways have been extracted with ASaiM workflow (Figure 1) for SRR072233

Annexe 4.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ORALES ET AFFICHEES

How to analyze raw sequencing data from microbiota? Using ASaiM!

Batut B, Gravouil K, Defois C, Brugere J-F, Peyretailade E, Peyret P. GCB, Tübingen, ALLEMAGNE (2017) [**poster**]

Impact d'un polluant environnemental, le benzo[a]pyrène, sur le volatolome et le transcriptome du microbiote intestinal humain.

Defois C, Ratel J, Denis S, Batut B, Beugnot R, Peyretailade E, Engel E and Peyret P. JED, Clermont-Ferrand, FRANCE (2017) [**Communication orale**]

ASaiM: a Galaxy-based framework to analyze raw sequencing data from microbiota.

Batut B, Defois C, Gravouil K, Brugere J-F, Peyretailade E, Peyret P. GCC, Montpellier, FRANCE (2017) [**poster**]

Impacts of benzo[a]pyrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, on the volatile metabolome and transcriptome of the human gut microbiota.

Defois C, Ratel J, Denis S, Batut B, Beugnot R, Peyretailade E, Engel E and Peyret P. CGIF, Chicago, ETATS-UNIS (2017) [**Communication orale**]

Benzo[a]pyrene impacts the volatile metabolome and transcriptome of the human gut microbiota.

Defois C, Batut B, Ratel J, Beugnot R, Mercier F, Gasc C, Denis S, Peyretailade E, Engel E and Peyret P. INRA-ROWETT, Clermont-Ferrand, FRANCE (2016) [**Communication orale et poster**]

Caractérisation d'un intégron au sein d'un métagénome environnemental par une approche de capture de gènes par hybridation.

Abella J, Defois C, Gasc C, Parisot N, Bernard A, Bouchez O, Cravo-Laureau C, Duran R, Peyret P, Cagnon C. CAPTURE, Paris, FRANCE (2016) [**Communication orale**]

Benzo[a]pyrene impacts human gut microbiota function.

Defois C, Batut B, Ratel J, Ribiere C, Gasc C, Beugnot R, Peyretailade E, Engel E and Peyret P. TARGETING MICROBIOTA, Paris, FRANCE (2015) [**Poster**]

ASaiM : an intuitive and adjustable pipeline to process metatranscriptomic data from intestinal microbiota.

Batut B, Defois C, Ribière C, Gasc C, Brugère JF, Peyretailade E, CPER consortium Environnement Digestif, Peyret P. JOBIM, Clermont-Ferrand, FRANCE (2015) [**Communication orale**]

Gene capture by hybridization for accurate taxonomic affiliation.

Gasc C, Ribière C, Defois C, Allario T, Batut B, Beugnot R, Peyretailade E, Peyret P. JOBIM, Clermont-Ferrand, FRANCE (2015) [**Poster**]

Annexe 5.

ACTIVITES/RESPONSABILITES EXTRA-RECHERCHE

Enseignements, communication scientifique pour les étudiants

2014-2017 Doctorante contractuelle (Activité d’enseignement), Université d’Auvergne. 64h /
année universitaire (= 192h)

Travaux Pratiques en Microbiologie, 1ère année DUT Génie biologique

Milieux, matériels et stérilisation

Croissance bactérienne

Structure bactérienne

Infection bactériophages

Antibiothérapie et microbiote intestinal en modèle murin

Métabolisme bactérien

25.01.2017 Participation à la Journée Régionale des Innovations Thérapeutiques à Lyon.
Rencontre Doctorants-Masters. Financement du rassemblement par la région
Auvergne-Rhône Alpes.

Modules « biologie »

- Participation à un workshop à l’Institut Pasteur (Paris, 2015) : “*Exploration & Sequencing of Human Microbiota: The Perfect Signature*”.
- Suivi du module “Programmation en Perl” du Master 1 « Analyse et Modélisation des Données », semestre 1 (31h) (Clermont-Ferrand, 2015)
- Membre du comité d’organisation des Journées de l’Ecole Doctorale (2 jours de congrès, Clermont-Ferrand, 2016)

Conférencier invité : Dr Aurore Marcou. Institut M.Curie. *Moduler le cerveau par l'hypnose : Applications à la médecine.*

- Représentant des étudiants au conseil scientifique de l'Ecole Doctorale SVSAE (Clermont-Ferrand, 2017)

Modules « sociaux-professionnels »

- Bilan professionnel (OSP 21) (Mai 2017)
- Culture d'entreprise (OSP 3) (Mars 2015)
- La propriété intellectuelle (OSP 6) (Février 2015)
- Le défi de l'évaluation de l'étudiant (OSP 12) (Février 2015)

RESUME

L'exposition aux polluants environnementaux a été associée à de nombreux désordres métaboliques, immunitaires et reproductifs ainsi qu'à divers cancers. De plus en plus de travaux, indiquent que le microbiote intestinal, qui joue un rôle majeur dans l'immunité et le métabolisme de l'hôte, interagit avec les xénobiotiques dont les polluants organiques persistants (POPs) et les contaminants néoformés dans les aliments. Cette interaction peut avoir des conséquences toxicologiques importantes *via* la modification des fonctions du microbiote intestinal mais également *via* la métabolisation des xénobiotiques, entraînant une potentielle altération de l'homéostasie de l'hôte. Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré, en modèle *in vitro*, qu'une exposition aiguë du microbiote intestinal humain au benzo[*a*]pyrène (hydrocarbure aromatique polycyclique) a entraîné une altération des fonctions du microbiote intestinal au niveau du volatolome et du métatranscriptome microbien. Cependant, dans nos conditions expérimentales, aucun impact sur la structure microbienne n'a été observé. L'Homme étant continuellement exposé à un panel de composés chimiques environnementaux, nous avons par la suite étudié l'impact de divers POPs et produits néoformés dans les aliments sur le microbiote intestinal humain. Des familles de gènes ainsi que des composés volatiles microbiens ont été identifiés comme altérés après l'exposition, conduisant à une perturbation de l'activité microbienne. Nous avons finalement démontré que l'interaction microbiote-polluant pourrait conduire à l'établissement d'un état pro-inflammatoire modéré dans l'intestin avec une libération de cytokine IL-8 par les cellules épithéliales intestinales. Ces résultats appuient le concept émergent selon lequel les contaminants alimentaires pourraient altérer les activités du microbiote intestinal.

ABSTRACT

Exposure to environmental pollutants has been associated with various life-threatening disorders, including dysregulation of the immune and reproductive systems, metabolic diseases and various cancers. Growing evidences indicate that the gut microbiota, which plays major roles in host metabolic and immune functions, interacts with xenobiotics including persistent organic pollutants (POPs) and foodborne chemicals. The toxicological relevance of the gut microbiota-pollutant interplay is of great concern for the host since the chemicals may disrupt the gut microbiota functions leading to a potential impairment of the host homeostasis. During this PhD thesis, we demonstrated that *in vitro* acute exposure of the human gut microbiota with benzo[*a*]pyrene (polycyclic aromatic hydrocarbon) led to an impairment of the gut microbiota functions with a specific shift of the microbial volatolome and metatranscriptome. However, in our experimental conditions, no impact on the microbial structure was observed. Since humans are exposed to a wide range of environmental chemicals we investigated the impact of various POPs and foodborne chemicals on the human gut microbiota. We identified microbial volatiles and gene families that shifted after this exposure leading to an imbalance of the microbial activity. Furthermore, we demonstrated that the interaction between the pollutants and the gut microbiota lead to a significant release of pro-inflammatory IL-8 cytokine by the intestinal epithelial cells which may contribute to the establishment of a low-grade inflammatory state in the gut. All together, these data support the emerging concept that food pollutants could alter the gut microbiota activities.

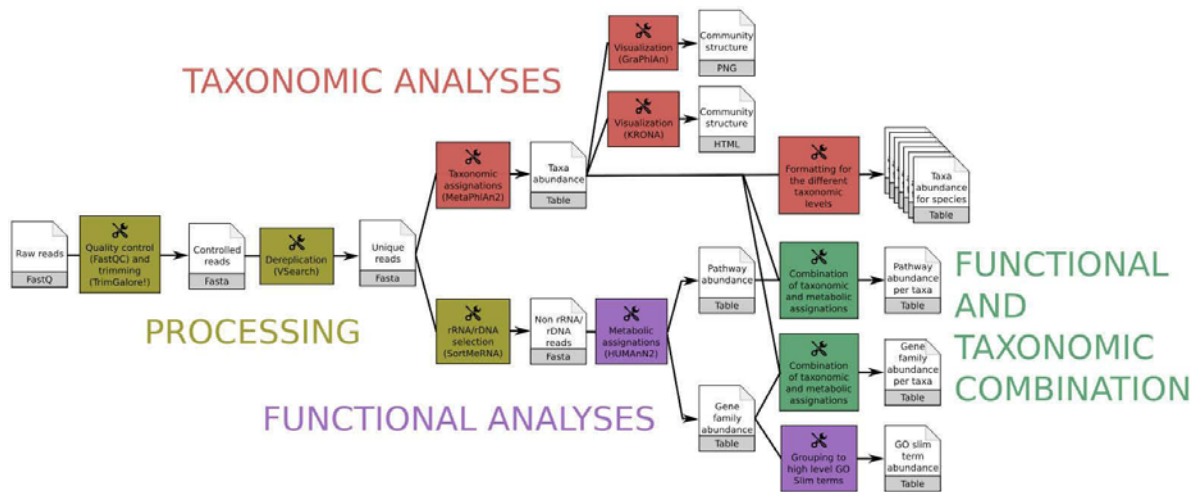


Figure 1: Main ASaiM workflow to analyze raw sequences.

This workflow takes as input a dataset of raw shotgun sequences (in FastQ format) from microbiota, preprocess it (yellow boxes), extracts taxonomic (red boxes) and functional (purple boxes) assignments and combines them (green boxes).

Image available under CC-BY license (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5371396.v3>)

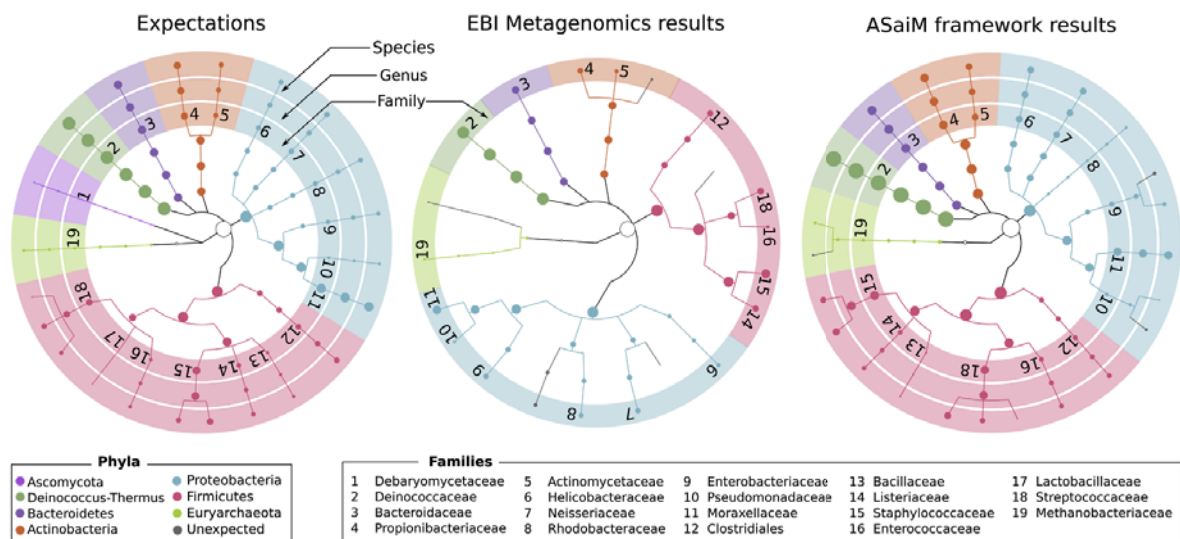


Figure 2: Comparisons of the community structure for SRR072233.

This figure compares the community structure between the expectations (mapping of the sequences on the expected genomes), data found on EBI Metagenomics database (extracted with the EBI Metagenomics pipeline) and the results of the main ASaiM workflow (Figure 1).

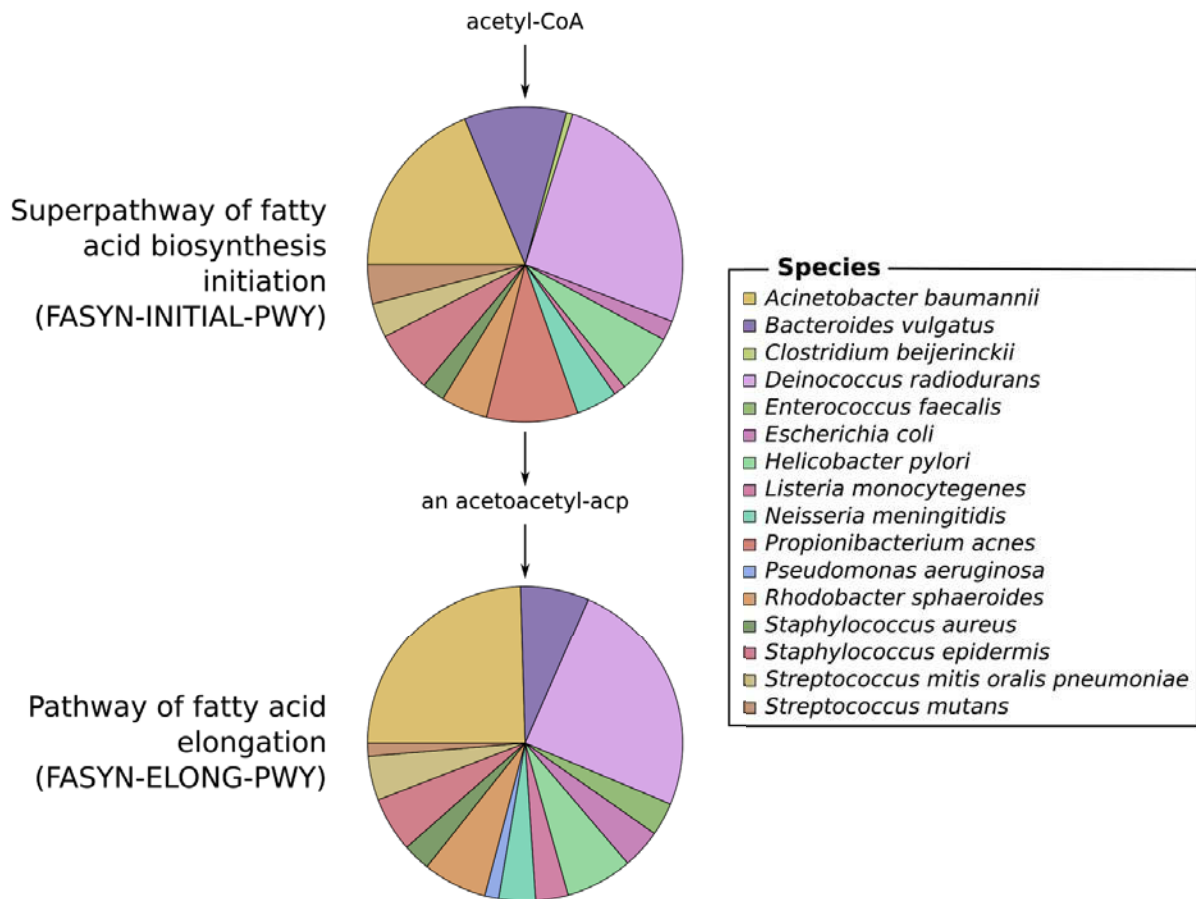


Figure 3: Example of an investigation of the relation between community structure and functions.

The involved species and their relative involvement in fatty acid biosynthesis pathways have been extracted with ASaiM workflow (Figure 1) for SRR072233

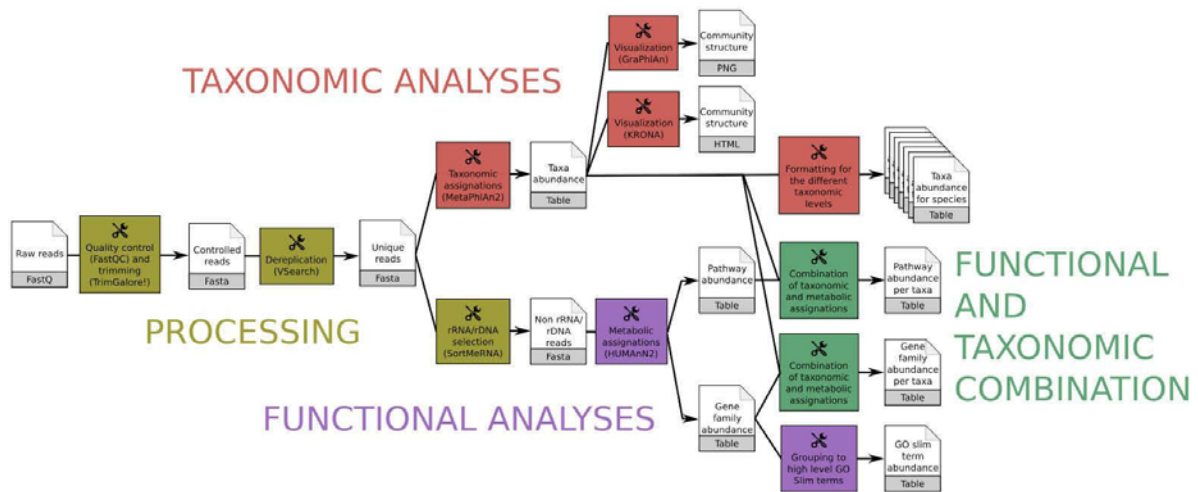


Figure 1: Main ASaiM workflow to analyze raw sequences.

This workflow takes as input a dataset of raw shotgun sequences (in FastQ format) from microbiota, preprocess it (yellow boxes), extracts taxonomic (red boxes) and functional (purple boxes) assignments and combines them (green boxes).

Image available under CC-BY license (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5371396.v3>)

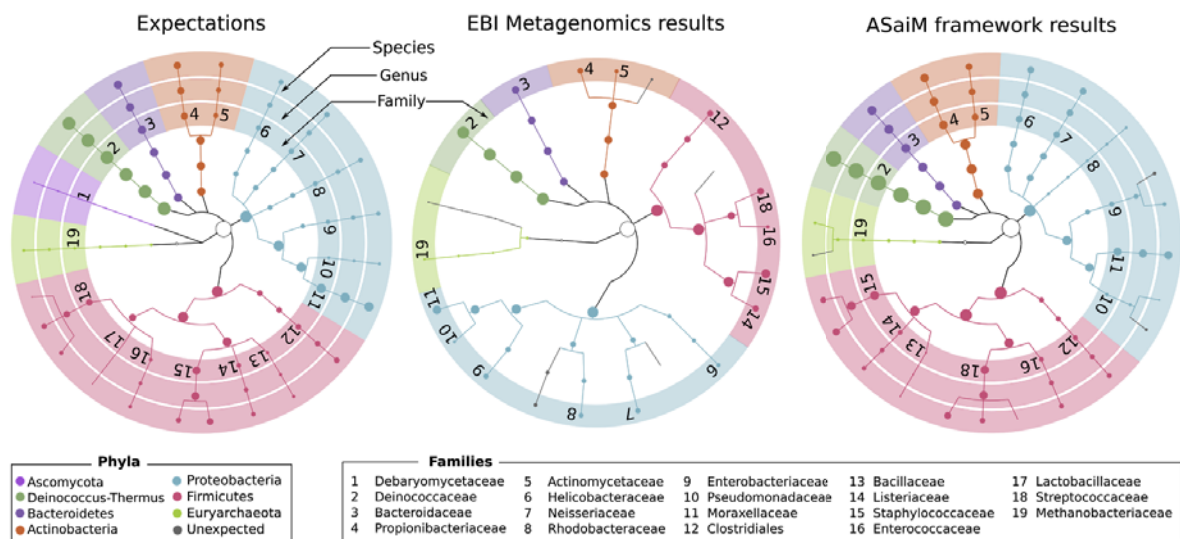


Figure 2: Comparisons of the community structure for SRR072233.

This figure compares the community structure between the expectations (mapping of the sequences on the expected genomes), data found on EBI Metagenomics database (extracted with the EBI Metagenomics pipeline) and the results of the main ASaiM workflow (Figure 1).

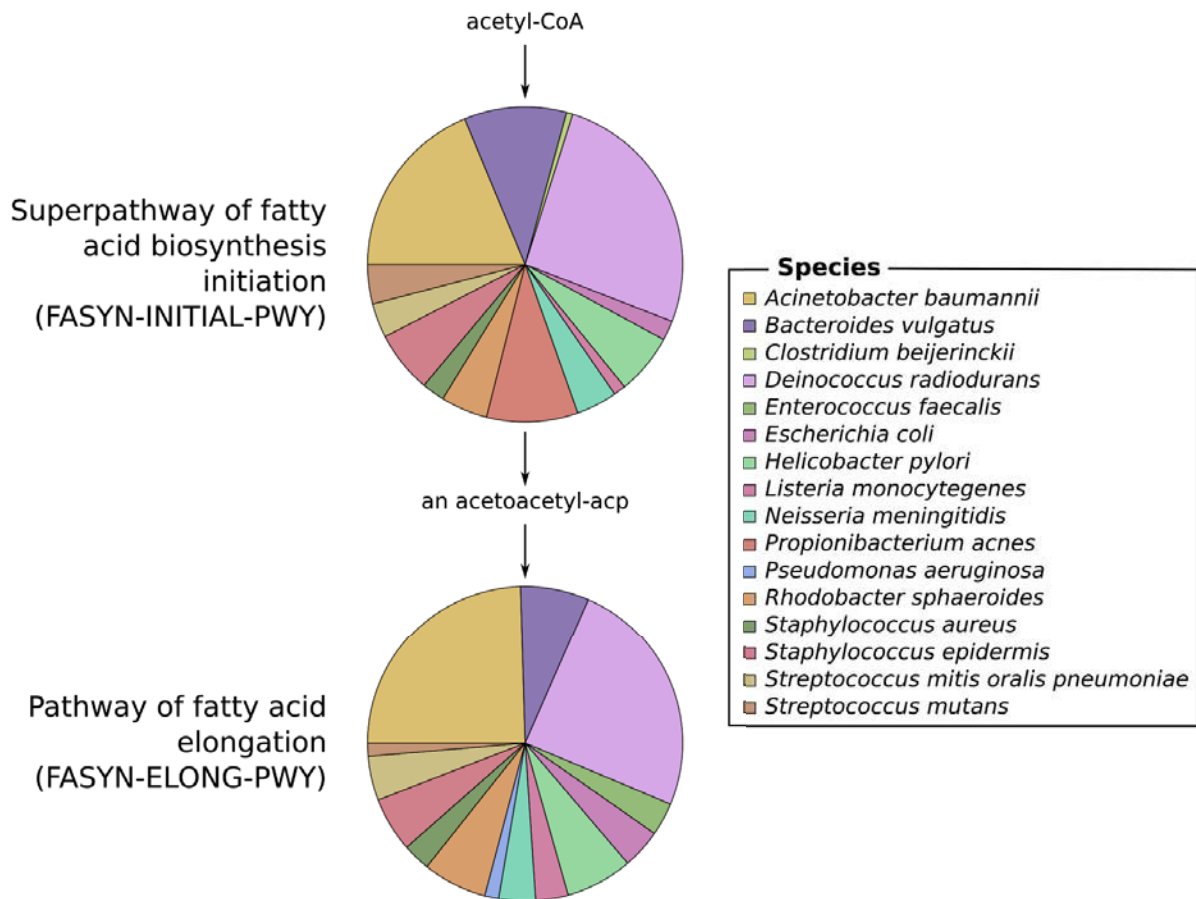


Figure 3: Example of an investigation of the relation between community structure and functions.

The involved species and their relative involvement in fatty acid biosynthesis pathways have been extracted with ASaiM workflow (Figure 1) for SRR072233