



**HAL**  
open science

# Archaea méthanogènes autochtones du microbiote intestinal de la personne âgée : Etude in vitro de leurs fonctions métaboliques dans l'écosystème colique

Nadia Gaci

## ► To cite this version:

Nadia Gaci. Archaea méthanogènes autochtones du microbiote intestinal de la personne âgée : Etude in vitro de leurs fonctions métaboliques dans l'écosystème colique. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1MM02 . tel-04496099

**HAL Id: tel-04496099**

**<https://theses.hal.science/tel-04496099>**

Submitted on 8 Mar 2024

**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.

N° d'ordre : 1

EDSPIC : 1

UNIVERSITÉ D'Auvergne - CLERMONT I

ÉCOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

# Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

**SPÉCIALITÉ : Écologie Microbienne Humaine**

Soutenue le 18 janvier 2016

**Nadia GACI**

ARCHAEA MÉTHANOGENÈS AUTOCHTONES DU MICROBIOTE INTESTINAL

DE LA PERSONNE ÂGÉE :

ÉTUDE *in vitro* DE LEURS FONCTIONS MÉTABOLIQUES

DANS L'ÉCOSYSTÈME COLIQUE

Directeur de thèse :	J. François BRUGÈRE	Maître de Conférences, Uda , France
Rapporteuse :	Emmanuelle MAGUIN	Directrice de recherche, INRA, France
Rapporteur :	Christophe LACROIX	Professeur, ETH, Zürich, Suisse
Examineur :	Bernard OLLIVIER	Directeur de recherche, IRD, AMU, France
Examineur :	Pascal VANDEKERCKOVE	Project manager recherche-innovation, LESAFFRE
Examineur :	Monique ALRIC	Professeur des Universités, Uda, France

Nadia GACI : *Archaea méthanogènes autochtones du microbiote intestinal de la personne âgée : Étude in vitro de leurs fonctions métaboliques dans l'écosystème colique* , © 20 janvier 2017

À ma mère

&

À mon père

&

À mes sœurs et mes frères

...



*"I have not failed 700 times. I have not failed once. I have succeeded in proving that those 700 ways will not work. When I have eliminated the ways that will not work, I will find the way that will work."*

**Thomas Edison**, about creating the light bulb.

## RÉSUMÉ DE THÈSE

Le microbiote intestinal humain, bien que considéré comme stable, subit des modifications avec le vieillissement dues à divers paramètres comme le ralentissement du transit, la diminution des sécrétions, ou une mastication moins efficace. Parmi ces modifications est observée une augmentation de la proportion d'archées méthanogènes. Ces dernières, dont le rôle reste méconnu, présentent une faible diversité reconsidérée ces dernières années. Dans cette thèse, nous avons d'une part réévalué la diversité des méthanogènes du tractus gastro-intestinal (TGI) humain et d'autre part reconsidéré leurs capacités métaboliques au sein du microbiote intestinal humain. Dans une première partie, des outils ont été élaborés et évalués afin d'étudier le rôle et l'impact des archées dans le TGI : ainsi, une étude de la présence des archées méthanogènes et de l'évolution du microbiote fécal du rat a été réalisée sur différentes classes d'âge soumises à des conditions nutritionnelles et environnementales contrôlées. Le système *in vitro* « ECSIM » a également été utilisé, pour étudier le rôle du temps de transit (caractérisé le plus souvent comme lent chez les personnes âgées) et l'impact de l'apport et/ou de l'inhibition de l'archée méthanogène majoritaire *Methanobrevibacter smithii*, validant ainsi un modèle d'étude de ces archées méthanogènes. Dans une deuxième partie, le métabolisme de composés méthylés par des archées méthanogènes intestinales humaines a été étudié. Notamment, grâce à des enrichissements culturels, des données génomiques de différents membres de *Methanomassiliicoccales* ont pu être obtenues, et des tests réalisés prouvant une méthanogenèse méthylotrophe H<sub>2</sub>-dépendante. Ces enrichissements ont également permis l'isolement de la première représentante des *Methanomassiliicoccales* du clade digestif, *Methanomethylophilus alvus* *gen. nov., sp. nov.*. Ces résultats procurent de nouveaux modèles d'étude et une réévaluation du rôle fonctionnel des archées méthanogènes dans le TGI humain. Enfin, ils procurent des arguments à l'utilisation d'archées comme probiotiques (« archaeobiotics ») pour la prévention de la triméthylaminurie et des maladies cardiovasculaires.

### MOTS-CLÉS

Archées, méthanogènes, méthanogenèse, *Methanobacteriales*, *Methanomassiliicoccales*, composés méthylés, microbiote intestinal, personne âgée.



## ABSTRACT

Human microbiota although considered to be highly stable undergoes a number of changes with the progression of age due to changes in various parameters such as the slowing of the transit, reduction of secretions or a less efficient chewing. During these transformations an increase in the proportion of methanogenic archaea has been observed in the gut. In earlier years, the diversity of methanogenic archaea have been underestimated. In this study, an attempt has been made to reassess the diversity of methanogens in the gastrointestinal tract (GIT) of humans which partly reconsiders their metabolic capacity within the human intestinal microbiota. Also tools have been developed and evaluated in order to study the role and impact of archaea in the GIT : for example, a study showing the presence of methanogenic archaea and evolution of the fecal microbiota was made on rats of different age groups and subjected to controlled nutritional and environmental conditions. An *in vitro* system "ECSIM" was also used to study the impact of increased transit time (usually in the elderly population) and also the impact of archaea primarily of *Methanobrevibacter smithii* in modulating the gut microbiota, thus validating a model to study these methanogenic archaea. In the second part of the study, metabolism of methylated compounds by intestinal methanogens has been studied. Availability and detailed analysis of genomic data of the different methanogens belonging to the *Methanomassiliicoccales* order gave an evidence of methylotrophic mode of methanogenesis that is H<sub>2</sub>-dependent. These informations have also enabled the isolation of the first representative of the digestive *Methanomassiliicoccales* clade, *Methanomethylophilus alvus* *gen. nov., sp.*. The results obtained during this study will provide new models of study and further reassessment of the functional role of methanogenic archaea in human GIT. Further, they provide an argument for the use of archaea as probiotics ("archaeobiotics") for the prevention of cardiovascular disease and trimethylaminuria.

## KEYWORDS

Archaea, methanogens, methanogenesis, *Methanobacteriales*, *Methanomassiliicoccales*, intestinal microbiota, aging.



## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à mon directeur de thèse Monsieur Jean-François Brugère. Ton esprit critique m'a été très précieux, il m'a permis de repenser mon travail et d'améliorer mes approches scientifiques. Je te remercie également pour les nombreux échanges et conseils qui m'ont beaucoup apporté.

Ensuite, je tiens à exprimer mes plus profonds et sincères remerciements à Madame Monique Alric, directrice de l'EA-CIDAM. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire, merci pour ton aide, tes conseils et tout simplement pour ta présence.

Aussi et surtout, mes remerciements vont à l'ensemble des membres du Jury qui m'honorent de leur présence et qui ont accepté la lourde tâche d'évaluer ce travail.

Ces remerciements s'adressent tout d'abord aux rapporteurs de cette thèse :

À Mme Emmanuelle Maguin, qui suit mon travail depuis un peu plus de quatre ans maintenant, je la remercie fortement pour son soutien, ses conseils scientifiques et personnels tout le long de ces années.

À Mr Christophe Lacroix, je le remercie de me faire partager son expertise sur les systèmes de fermentation *in vitro* et plus récemment sur les méthanogènes du tractus digestif et qui sont sans aucun doute primordiales dans ce travail

En second lieu, mes très vifs remerciements aux examinateurs :

À Mr Bernard Ollivier, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et d'avoir contribué à ma formation, son expertise a été fondamentale dans la réussite de l'isolement de *M. alvus*

À Mr Pascal Vandekerckove, je le remercie de l'intérêt qu'il porte à ce travail avec son double regard scientifique et d'industriel.

Je remercie également Wajdi Ben Hania, de l'équipe MEB, pour m'avoir aidée à finaliser mon travail ainsi que pour sa disponibilité et ses encouragements.

Je souhaite remercier Mr Paul O'Toole, pour la collaboration durant ma thèse et son soutien dans nos recherches. Dans le même laboratoire, je voudrais tout particulièrement remercier Burkhardt, pour sa contribution à l'analyse fonctionnelle des microbiotes de rats, Ian et Hugh pour leur aide dans les analyses bioinformatiques.

Je souhaite également remercier Mme Estelle Pujos, membre de mon comité de thèse.

J'adresse mes profonds remerciements au laboratoire Janvier ainsi qu'à son personnel pour m'avoir fourni les échantillons fécaux pour l'étude du microbiote du rat.

À ma chère équipe :

À Guillaume, très doué et humble avec ça! Je te dois tout mon savoir sur la culture anaérobie des archées. Je te remercie pour ton aide et surtout pour ta disponibilité. À Prem, cela fait maintenant un an qu'on travaille ensemble, sache que j'ai apprécié tous les moments qu'on a passé ensemble et j'espère que tu penseras à moi quand tu auras le prix Nobel. À William, merci pour tout ce que tu m'as appris, je te dois beaucoup. Je garde en mémoire toutes nos journées passées avec les mannekin pis. À Sylvain, merci d'être ce que tu es.

J'adresse des remerciements considérables à l'ensemble de l'équipe EA-CIDAM, pour n'oublier personne, je ne citerai pas de noms. Sachez que j'ai été heureuse de partager cette aventure avec vous.

Aux membres du laboratoire LMGE, qui nous ont accueillis avec tellement de sympathie, particulièrement l'équipe AFYREN.

Merci à mes meilleurs amis qui ont rendu ma vie plus joyeuse.

Merci à toutes celles et ceux qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>I.1 ARCHÉES MÉTHANOGENÈS</b>	<b>5</b>
I.1.1 ARCHAEA : un domaine du vivant à part entière . . . . .	5
I.1.1.1 Dénominations variables : bref historique de la classification des archées	5
I.1.1.2 Phylogénie et organisation interne du domaine ARCHAEA . . . . .	6
I.1.1.3 Caractéristiques des archées . . . . .	9
I.1.2 Méthanogenèse et archées méthanogènes . . . . .	15
I.1.2.1 Méthane, un gaz impliqué dans le réchauffement global de la planète . .	15
I.1.2.2 Trois voies métaboliques possibles à la méthanogenèse . . . . .	18
I.1.2.3 Usage d'un acide aminé rare, la pyrrolysine . . . . .	21
I.1.2.4 Diversité taxinomique des méthanogènes . . . . .	28
I.1.2.5 Représentation environnementale des méthanogènes . . . . .	28
<b>I.2 ARCHÉES MÉTHANOGENÈS ET MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN</b>	<b>35</b>
I.2.1 Microbiote digestif humain . . . . .	36
I.2.1.1 Diversité et distribution . . . . .	36
I.2.1.2 Ontogénie du microbiote digestif . . . . .	37
I.2.1.3 Fonctions du microbiote intestinal humain . . . . .	39
I.2.2 Archées méthanogènes du microbiote intestinal . . . . .	44
I.2.2.1 Outils de détection des archées méthanogènes dans le microbiote intestinal humain . . . . .	44
I.2.2.2 Diversité et rôle des archées méthanogènes digestives humaines . . . . .	45
I.2.3 Facteurs influençant l'apparition des archées dans le microbiote . . . . .	62
I.2.3.1 Sexe . . . . .	62
I.2.3.2 Alimentation et sécrétions . . . . .	62
I.2.3.3 Temps de transit . . . . .	65
I.2.3.4 Age . . . . .	65
I.2.4 Microbiote intestinal de la personne âgée et archées méthanogènes . . . . .	66
I.2.4.1 Archées méthanogènes et système immunitaire . . . . .	67
<b>II RÉSULTATS</b>	<b>75</b>
<b>II.1 RECHERCHE DE MODÈLES ADAPTÉS A L'ÉTUDE DES ARCHÉES MÉTHANOGENÈS INTESTINALES CHEZ LA PERSONNE AGÉE</b>	<b>77</b>
II.1.1 Modèle <i>in vivo</i> : Étude de l'évolution du microbiote et de sa composante méthanogène tout au long de la vie du rat . . . . .	77
II.1.1.1 Contexte de l'étude . . . . .	77



iI.1.1.2 Matériel et méthodes . . . . .	78
iI.1.1.3 Résultats . . . . .	81
iI.1.1.4 Discussion . . . . .	83
iI.1.1.5 Conclusion et perspectives . . . . .	84
iI.1.2 Modèle <i>in vitro</i> ECSIM . . . . .	85
iI.1.2.1 Optimisation des approches pour la conservation du microbiote fécal : Standardisation des procédures des tests <i>in vitro</i> dans l'ECSIM . . . . .	86
iI.1.2.2 Étude <i>in vitro</i> de l'effet du ralentissement du temps de transit sur l'acti- vité régionale du microbiote colique humain . . . . .	102
iI.1.2.3 Synthèse des résultats . . . . .	103
iI.1.2.4 Élaboration d'un modèle <i>in vitro</i> d'étude des archées méthanogènes dans un environnement intestinal simulé . . . . .	114
iI.1.2.5 Conclusions et perspectives de l'ensemble des études <i>in vitro</i> . . . . .	119
iI.2 CAPACITÉS MÉTABOLIQUES DES MÉTHANOGENÈS DU TRACTUS DIGESTIF : QUELS SUBSTRATS DE MÉTHANOGENÈSE ? . . . . .	121
iI.2.1 Utilisation du méthanol par <i>Mb. smithii</i> ? . . . . .	121
iI.2.1.1 Rappel du contexte et objectif de l'étude . . . . .	121
iI.2.1.2 Matériel et méthodes . . . . .	122
iI.2.1.3 Résultats . . . . .	123
iI.2.2 <i>Methanomassiliicoccales</i> intestinales . . . . .	133
iI.2.2.1 Caractérisation du 7 <sup>e</sup> ordre basée sur des données génomiques de diffé- rents membres intestinaux des <i>Methanomassiliicoccales</i> . . . . .	133
iI.2.2.2 <i>Methanomassiliicoccales</i> , un ordre présentant des lignages environnemen- taux différents . . . . .	134
iI.2.2.3 Capacités métaboliques réelles des <i>Methanomassiliicoccales</i> intestinales : implications dans le tractus digestif humain . . . . .	144
<b>III DISCUSSION</b> . . . . .	155
<b>IV CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES</b> . . . . .	165
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> . . . . .	169
<b>ANNEXES</b> . . . . .	201

## TABLE DES FIGURES

FIGURE I.1.1	Arbre phylogénétique des différents domaines du vivant . . . . .	8
FIGURE I.1.2	Structure des glycérophospholipides constituant les membranes des archées et celles des bactéries et des eucaryotes . . . . .	10
FIGURE I.1.3	Structures et composants des différentes parois observées chez les archées et chez les bactéries à Gram positif et négatif . . . . .	10
FIGURE I.1.4	Distribution taxinomique des composants archéens de la division cellulaire orthologues aux composants eucaryotiques . . . . .	14
FIGURE I.1.5	Arbre phylogénétique des archées méthanogènes . . . . .	16
FIGURE I.1.6	Cycle du méthane dans la biosphère continentale profonde . . . . .	17
FIGURE I.1.7	Différentes voies de la méthanogenèse . . . . .	19
FIGURE I.1.8	Représentation de la formule de la pyrrolysine . . . . .	24
FIGURE I.1.9	Biosynthèse de la pyrrolysine à partir de deux lysines et des produits des gènes <i>pylB</i> , <i>pylC</i> et <i>pylD</i> . . . . .	24
FIGURE I.1.10	Organisation du système Pyl chez différentes souches séquencées . . . . .	26
FIGURE I.1.11	Structure secondaire de l'ARNt-Pyl . . . . .	27
FIGURE I.1.12	Insertion co-translationnelle de la pyrrolysine . . . . .	27
FIGURE I.2.1	Variations quantitative et qualitative de la composition du microbiote digestif . . . . .	38
FIGURE I.2.2	Variation temporelle du microbiote intestinal . . . . .	38
FIGURE I.2.3	Fermentation dans le tractus digestif . . . . .	40
FIGURE I.2.4	Protéolyse dans le tractus digestif . . . . .	43
FIGURE I.2.5	Hydrogénéotrophes du microbiote intestinal . . . . .	64
FIGURE I.2.6	Interactions potentielles entre les archées méthanogènes et le système immunitaire humain. . . . .	69
FIGURE II.1.1	Analyse en coordonnées principales des profils microbiens . . . . .	82
FIGURE II.1.2	Production des AGCCs fécaux chez les rats de différentes classes d'âge . . . . .	82
FIGURE II.2.1	Organisation des gènes impliqués dans l'utilisation du méthanol . . . . .	124
FIGURE II.2.2	Production de méthane par <i>Mb. smithii</i> DSM 861 cultivée en présence de concentrations croissantes de méthanol et d'H <sub>2</sub> . . . . .	126
FIGURE II.2.3	Consommation du méthanol par <i>Mb. smithii</i> DSM 861 . . . . .	126
FIGURE II.2.4	Variation de l'expression de gènes de la méthanogenèse de <i>Mb. Smithii</i> DSM 861 cultivée en présence d'H <sub>2</sub> et de concentration croissante de méthanol . . . . .	128

FIGURE II.2.5	Croissance de différentes souches de <i>Mb. smithii</i> en présence du méthanol et dépendance en H <sub>2</sub> . . . . .	128
FIGURE II.2.6	Croissance de différentes souches de <i>Mb. smithii</i> en présence de pectine et d'H <sub>2</sub> . . . . .	130
FIGURE II.2.7	Expression des gènes <i>mtaB</i> and <i>mcrA</i> . . . . .	130
FIGURE II.2.8	Diversité des <i>Methanomassiliicoccales</i> et leurs relations évolutives au sein du lignage <i>Thermoplasmata</i> . . . . .	135
FIGURE II.2.9	Relations phylogénétiques des archées méthanogènes et caractéristiques des <i>Methanomassiliicoccales</i> . . . . .	138
FIGURE II.2.10	Organisation des gènes impliqués dans l'utilisation des substrats méthylés (méthanol ; MMA ; DMA ; TMA et DMS) . . . . .	139
FIGURE II.2.11	Croissance de <i>Mmc. luminyensis</i> en présence de substrats méthylés (méthanol, MMA, DMA, TMA, choline, bétaine, DMS, DMT) . . . . .	139
FIGURE II.2.12	Origine et métabolisme du TMA dans l'intestin humain . . . . .	148
FIGURE II.2.13	Croissance et production de méthane par <i>Ca. Mmp. alvus</i> cultivée en consortium en présence de méthanol, MMA et TMA . . . . .	152
FIGURE II.2.14	<i>Methanomethylophilus alvus</i> MA06, <i>gen. nov, sp. nov.</i> , observée au microscope électronique en transmission, coloration négative . . . . .	152
FIGURE III.0.15	Rôle proposé des méthanogènes dans le tractus digestif . . . . .	164

## LISTE DES TABLEAUX

TABLE I.1.1	Protéines présentes chez les différents domaines du vivant impliquées dans la réplication de l'ADN . . . . .	13
TABLE I.1.2	Énergie libérée et microorganismes typiques des différentes réactions de méthanogenèse existantes . . . . .	22
TABLE I.1.3	Propriétés des groupes taxonomiques majeurs de méthanogènes . . . . .	32
TABLE II.1.1	Prospection des méthanogènes digestifs dans les fèces de rat par PCR et PCR quantitative . . . . .	80
TABLE II.2.1	Gènes impliqués ou suspectés être impliqués dans la méthanogenèse méthylotrophe : partie 1 . . . . .	141
TABLE II.2.2	Gènes impliqués ou suspectés être impliqués dans la méthanogenèse méthylotrophe : partie 2 . . . . .	142
TABLE II.2.3	Gènes impliqués ou suspectés être impliqués dans la méthanogenèse méthylotrophe : partie 3 . . . . .	143
TABLE III.0.4	Amorces pour l'amplification des gènes de la méthanogenèse méthylotrophe de <i>Mmc. luminyensis</i> . . . . .	160

## ABRÉVIATIONS

$\mu\text{M}$	micro molaire
ACP	Analyse en Composante Principale
Ack	Acétate kinase
Acs	Acétyl-coenzyme A synthétase
ADN	Acide Déoxyribonucléique
ADNr	Acide Déoxyribonucléique ribosomal
AGCC	Acide Gras à Courte Chaine
AMO	Anaerobic Methane Oxidizer
AMP	Adenosine Monophosphate
AMPak	Adenosine Monophosphate activated protein kinase
ANME	Anaérobies méthanotrophes
AOA	Ammonia-Oxidizing Archaea
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomal
CCR	Cancer Colorectal
CDV	Cell Division System
CH <sub>4</sub>	Méthane
CH <sub>3</sub>	Méthyle
CoM	Coenzyme M
CO	Monoxyde de carbone
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse

- CY<sub>3</sub> Cyanine 3
- CY<sub>5</sub> Cyanine 5
- Da Dalton
- dNTP Désoxynucléotide Triphosphate
- ddNTP Didésoxynucléotide Triphosphate
- DMA Diméthylamine
- DMS Diméthyl-Sulfide
- DO Densité Optique
- DPANN Ultrasmallarchées : *Diapherotrites Parvoarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanohaloarchaeota*, *Pacearchaeota*, *Woesearchaeota*, *Micrarchaeota*
- ECSIM Environmental Control System for Intestinal Microbiota
- <sub>3</sub>S-ECSIM Three Stage-ECSIM
- P-ECSIM Proximal ECSIM
- ESCRT Endosomal Sorting Complex Required for Transport
- Fhs Formyltétrahydrofolate synthétase
- FMO<sub>3</sub> Flavine Mono-Oxygénase
- Formyl-H<sub>4</sub>MPT Formyl-tétrahydrométhanoptérine
- Formyl-MF Formyl-méthanofurane
- g Gramme
- GINs complexe protéique d'initiation et d'assemblage de la fourche de réplication
- h Heure
- H<sub>2</sub> Dihydrogène
- H<sub>2</sub>S Sulfure d'hydrogène
- HITChip Human Intestinal Tract Chip
- HuGChip Human Gut Chip
- H<sub>4</sub>MPT Tétrahydrométhanoptérine
- IgA Immunoglobuline A

**IMC** Indice de Masse Corporel

**ITS** Internal Transcribed Spacer

**J** Jour

**LC-MS** Chromatographie Liquide couplée à de la Spectrométrie de Masse

**MAMPS** Microorganism-Associated Molecular Patterns

**Mb** mégabase

**MCM** Minichromosome maintenance

**MCR** Méthyl-coenzyme M réductase

**MICI** Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales

**mL** millilitre

**mM** millimolaire

**MMA** Monométhylamine

**MT** Méthyltransférase

**N<sub>2</sub>** Diazote

**NGS** Next Generation Sequencing

**NLR** NOD-Like Receptors

**nm** nanomètre

**O<sub>2</sub>** Dioxygène

**OTU** Operational Taxonomic Unit

**PCR** Réaction de polymérisation en chaîne

**ppm** partie par million

**PSA** Polysaccharides A

**Pta** Phosphate acétyltransférase

**Pyl** Pyrrolysine

**qPCR** PCR quantitative

**RC-I** Rice Cluster I

**Se** Sélénium

**SHIME** Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem

**SII** Syndrome de l'Intestin Irritable

**SRB** Bactéries Sulfato-Réductrices

**SSB** Single Stranded DNA Binding protein

**TACK** Ensemble, les *Thaumarchaeota*, les *Aigarchaeota*, les *Crenarchaeota*, et les *Korarchaeota*

**TCA** Tricarboxylic acid cycle

**TLR** Toll-Like Receptors

**TMA** Triméthylamine

**Ub** Ubiquitine

**WhiP** Werner helicase interacting Protein

**We** Tungstate





## INTRODUCTION

L'organisme humain cohabite avec une quantité importante de microorganismes qui colonisent ses surfaces et certaines de ses cavités. Le microbiote intestinal est la communauté microbienne la plus abondante dont la présence influence profondément la biologie de l'Homme. Il représente dix fois plus de cellules que celles strictement humaines [1]. Le séquençage exhaustif des ADNr 16S de selles humaines a permis de montrer que le microbiote intestinal est majoritairement composé de microorganismes anaérobies et non cultivables, dominé par les bactéries des phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* [2, 3]. L'évolution des techniques de séquençages autorise maintenant les séquençages de masse, notamment d'amplicons 16S microbiens [4] ou de l'ADN microbien dans son ensemble, le métagénome [5]. Ces approches révolutionnaires ont permis l'analyse et la quantification des communautés microbiennes complexes [4], et dans le cas du microbiote intestinal humain, elles ont montré que de nombreuses espèces bactériennes sont partagées entre les individus, mais que l'ensemble est spécifique à chacun. Une étude basée sur des échantillons fécaux d'une cohorte de 124 adultes européens a permis de répertorier plus de 3,3 millions de gènes microbiens différents [6]. Cette dernière étude a montré par ailleurs que près de 40 % des gènes du microbiote de chaque individu étaient partagés chez au moins la moitié des individus. En termes de bactéries, 57 espèces ont été retrouvées dans plus de 90 % de la population analysée. La partie variable du microbiote intestinal chez les différents individus dépendrait du régime alimentaire [7], du sexe [8], et également de l'âge [9, 8], induisant à la fois des changements quantitatifs et qualitatifs dans sa composition [6]. Lors du vieillissement, de nouveaux équilibres physiologiques se mettent en place et semblent induire un remaniement du microbiote. Ce dernier se traduit par une diminution des groupes bactériens impliqués dans la fermentation glucidique et une augmentation d'autres impliqués dans la protéolyse [10, 11], en parallèle à une augmentation de la proportion d'archées méthanogènes [12, 13, 14]. Les deux principaux méthanogènes retrouvés chez l'Homme sont des *Methanobacteriales*, les espèces *Methanobrevibacter smithii* (*Mb. smithii*) et *Methanosphaera stadtmanae* (*Ms. stadtmanae*). Ces espèces semblent avoir un effet immunomodulateur [15] et être associées à de nombreuses maladies, notamment l'obésité, les cancers colorectaux ou la constipation. La bibliographie révèle néanmoins que ces associations sont controversées. Ces deux archées méthanogènes possèdent un métabolisme de méthanisation différent. L'espèce *Mb. smithii*, retrouvée chez plus de la moitié de la population, réduit le CO<sub>2</sub> par l'H<sub>2</sub> alors que l'espèce *Ms. stadtmanae*, retrouvée chez un tiers de la population, réduit le méthanol (méthylotrophie), tout en nécessitant également de l'H<sub>2</sub> pour la production de méthane CH<sub>4</sub>. En 2008, au sein de notre laboratoire, Mihajlovski et al ont mis en évidence et identifié dans des selles humaines les membres d'un septième ordre d'archées méthanogènes, nommées officiellement maintenant ordre de *Methanomassiliicoccales* [16]. De-

puis, chez l'Homme, 3 génomes ont été obtenus : *Methanomassiliicoccus luminyensis*, *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*, *Candidatus Methanomethylophilus alvus*. Les membres de cet ordre semblent davantage présents (prévalence et quantité) chez les personnes âgées [17]. L'adaptation à un tel environnement implique la présence de capacités de résistance à l'acidité gastrique, aux sels biliaires et à la concurrence des autres microorganismes du microbiote intestinal. Ces informations justifient la nécessité d'une meilleure connaissance de l'impact des archées dans la physiologie digestive.

La première partie de cette thèse présentera l'historique tumultueux de l'apparition du domaine des archées (ARCHAEA) en tant que tel, plus particulièrement sous l'angle de leurs caractéristiques ainsi que de leur diversité écologique. Seront abordées sous forme de revue, les différentes technologies de détection palliant aux problèmes dont fait l'objet l'étude des archées [18]. La troisième partie exposera la place des méthanogènes dans l'écosystème digestif et les liens avec le vieillissement. Cela permettra de dégager les points à étudier et de mettre en exergue les premiers objectifs à atteindre pour définir le rôle des archées dans l'écosystème digestif.

Les travaux de thèse seront exposés dans les chapitres suivants : ils concernent en premier lieu, l'évaluation de la pertinence de deux systèmes, i) *in vivo* (modèle rat) et ii) *in vitro* (3S-ECSIM) pour l'étude du microbiote lors du vieillissement. L'influence d'une archée méthanogène sera étudiée au sein du système *in vitro* mettant en évidence les associations archéennes avec les autres composantes du microbiote.

Dans un second lieu, les propriétés métaboliques (substrats de méthanogenèse) d'archées méthanogènes seront étudiés, notamment par l'analyse des génomes du nouvel ordre des *Methanomassiliicoccales*, et des multiples voies possibles de la méthanogenèse méthylotrophe. Il présentera également le système d'encodage de la pyrrolysine chez ces organismes.

Première partie

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



## CHAPITRE I.1

### ARCHÉES MÉTHANOGENÈS

Les archées ont longtemps été considérées comme des organismes extrémophiles car retrouvées dans des environnements inhospitaliers : cette extrémophilie regroupe à la fois l'hyperthermophilie (geysers volcaniques), la psychrophilie (eaux glaciales et profondeurs océaniques), l'halophilie (milieux à haute concentrations de NaCl), l'alcalophilie ou l'acidophilie pour les archées supportant des pH extrêmes pouvant atteindre 0 ou 12 [19]. Cependant, les archées ne sont pas toutes des habitantes des environnements extrêmes et de plus en plus d'espèces mésophiles sont découvertes. Celles-ci vivent dans des environnements plus communs tels que les sols, les eaux usées, les marais, les océans, les milieux pélagiques et même le tractus digestif de nombreux animaux, dont l'Homme [20]. Elles représentent plus de 20 % des procaryotes océaniques et sont probablement les organismes les plus abondants des sédiments du sous-sol et des habitats marins géothermiques [21].

#### I.1.1 ARCHAEA : UN DOMAINE DU VIVANT À PART ENTIÈRE

Les archées forment actuellement et de manière consensuelle un domaine du vivant à part entière, dénommé ARCHAEA, aux côtés des domaines BACTERIA et EUCARYA (également appelé EUKARYOTA). Leur place dans le vivant a souvent été soumise à modifications selon l'avancée des connaissances et il est probable que des évolutions importantes interviennent encore dans les années futures.

##### I.1.1.1 *Dénominations variables : bref historique de la classification des archées*

Les archées ont longtemps été assimilées aux bactéries et répertoriées parmi les procaryotes dans une première classification dichotomique basée sur le caractère unicellulaire, la biochimie et le métabolisme de ces microorganismes [22]. Plus récemment, le séquençage des gènes de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S ou ssu rRNA gene) a permis d'identifier d'importantes différences génétiques, ce qui a induit une nouvelle classification distinguant les *Archaeobacteria* comme troisième domaine du vivant, aux côtés des Eucaryotes et Eubactéries [23]. En 1987, Woese a mis en évidence des caractéristiques semblables aux eucaryotes, ce qui va par la suite

étayer l'hypothèse d'une évolution plus proche de celle des eucaryotes, les éloignant des bactéries. Ainsi, pour marquer cette distinction, les Archaeobacteria seront rebaptisées ARCHAEA [24, 25, 26]. Les caractérisations biochimiques, génétiques et génomiques ultérieures appuient la présence d'un troisième domaine [27, 28, 29]. La théorie endosymbiotique à l'origine de l'acquisition d'organelles chez les eucaryotes indique un rôle majeur des  $\alpha$ -protéobactéries et la prépondérance de gènes d'origine bactérienne chez les eucaryotes, comme le reflètent en particulier les génomes mitochondriaux ou leurs dérivés, semant un doute dans la parenté ARCHAEA-EUCARYA [30, 31]. Cependant, bien que le nombre de gènes d'origine bactérienne ( $\alpha$ -protéobactéries) chez les eucaryotes soit beaucoup plus important, le patrimoine archéen des eucaryotes comprend la plupart des gènes universels, hautement conservés, traduisant apparemment une tendance verticale dans l'évolution ARCHAEA-EUCARYA [32]. Les constructions phylogénomiques (constructions phylogénétiques basées sur un grand nombre de séquences ; [33], à partir des gènes conservés, avancent même une théorie selon laquelle il n'y aurait que deux grands domaines : les BACTERIA et les ARCHAEA. Ce seraient même des événements d'endosymbiose entre les archées et les bactéries qui auraient donné naissance aux eucaryotes [33]. Ce scénario qu'on pensait peu probable en vue de la présence de caractéristiques biochimiques, métaboliques et structurales propres aux archées, prend aujourd'hui plus d'ampleur. En effet, les dernières analyses phylogénomiques indiquent une émergence des eucaryotes à partir du rayonnement d'archées récemment mises en évidence, membres du superphylum (TACK) comprenant les *Thaumarchaeota*, les *Aigarchaeota*, les *Crenarchaeota*, et les *Korarchaeota* [34]. Plus récemment encore, de nouvelles études phylogénomiques ont montré un groupe monophylétique comprenant ensemble le phylum archéen candidat *Lokiarchaeota* et les eucaryotes, remettant en question la notion même du domaine EUKARYA. Le phylum *Lokiarchaeota* porte en effet des protéines eucaryotique supportant l'hypothèse d'un ancêtre archéen aux eucaryotes [35] et suggérant un remodelage de la membrane plasmique chez ces derniers. En conclusion, il se pourrait donc que notre vision de l'évolution du troisième domaine de la vie, ainsi que celle de l'apparition des eucaryotes soit à reconsidérer dans les années à venir.

#### 1.1.1.2 Phylogénie et organisation interne du domaine ARCHAEA

On compte aujourd'hui plus de 400 génomes complets ou presque d'archées disponibles dans les bases de données : 75 % d'entre eux ont été obtenus durant les quatre dernières années [21]. Les premières séquences ont été obtenues à partir de techniques de biologie classique (culture pure, co-culture ou culture enrichie). Les nouvelles méthodologies (la métagénomique et la génomique unicellulaire) ont permis la découverte de lignées d'archées à un rythme accéléré, détectant les archées non cultivables ou celles en abondance extrêmement faible. Le domaine des archées était initialement divisé en deux groupes sur la base d'une phylogénie de l'ARN 16S d'archées cultivées, (i) le phylum *Euryarchaeota* comprenant des microorganismes halophiles extrêmes, thermophiles, thermoacidophiles [36] et (ii) le phylum *Crenarchaeota* comprenant la majorité des archées hyper-thermophiles et la majorité de celles découvertes en milieu marin [37]. Ces deux grands phyla étaient séparés par une grande dis-

tance évolutive. Les protéines ribosomiques habituellement utilisées, n'étant plus suffisantes pour les études phylogénétiques, laissent des interrogations concernant d'importantes relations de parenté. Pour résoudre les noeuds phylogénétiques, de nouvelles méthodes plus sophistiquées ont été élaborées. L'approche phylogénomique (analyse simultanée pouvant se baser sur les séquences d'une centaine de gènes ou de protéines) sur des séquences conservées a contribué à décrire de nouvelles lignées majeures. Ces techniques ont fait apparaître de nouveaux embranchements tels que les *Korarchaeota*, un groupe d'archées anaérobies hyperthermophiles encore mal caractérisé [38] et les *Thaumarchaeota*, un groupe marin mésophile précédemment inclus dans les *Crenarchaeota* [39]. En 2011, le génome assemblé de *Caldiar-  
chaenum subterraneum* réalisé uniquement à partir de données métagénomiques a été proposé pour représenter le phylum des *Aigarchaeota* [40], un groupe très proche des *Thaumarchaeota*. Ensemble, les *Thaumarchaeota*, les *Aigarchaeota*, les *Crenarchaeota*, et les *Korarchaeota* sont regroupés en un superembranchement monophylétique dénommé "TACK" [41].

Une analyse phylogénétique de Petitjean et al (2015) sur 38 protéines conservées et 32 autres ribosomiques, en prenant les bactéries comme groupe externe, a permis de placer la racine de l'arbre phylogénétique entre les *Euryarchaeota*, d'une part, et les TACK d'autre part [42]. Ce nouvel enracinement a amené à proposer la création du nouveau phylum "*Proteoarchaeota*" contenant les quatre phyla du superphylum TACK, à présent rétrogradés en classes. D'autres classifications ont également été proposées, telles que le phylum *Bathyarchaeota*, fréquemment détecté dans les sédiments profonds, ou l'embranchement des *Lokiarchaeota*, identifié dans des sédiments hémipélagiques et glacio-marins [43]. La métagénomique et la génomique unicellulaire ont également aidé à mettre en évidence des nano-archées, appelées ainsi en raison de leur taille, à la fois morphologique (400 à 500 nm) et génomique (550 à 1200 gènes), très faible. Parmi celles-ci figurent les *Nanoarchaeota*, les *Parvarchaeota*, les *Aenigmarchaeota*, les *Diapherotrites*, les *Nanohaloarchaeota*, les *Pacearchaeota*, les *Woesearchaeota*, et les *Micrarchaeota* (Figure I.1.1) [44]. Ces organismes sont regroupés dans le groupe des « ultra-small » archées, également dénommé clade "DPANN" [44]. De par la simplicité d'organisation génomique, ils pourraient représenter des vestiges très anciens de la lignée des archées, permettant de concevoir l'archée ancestrale originelle. Cependant, leur placement phylogénétique est encore très discuté, leur profonde position de ramification pouvant être le résultat d'artefacts de reconstructions phylogénétiques. Ces artefacts seraient dus à l'inhabituelle taille de séquences à analyser combinée à leur rapidité d'évolution (Figure I.1.1) [21].



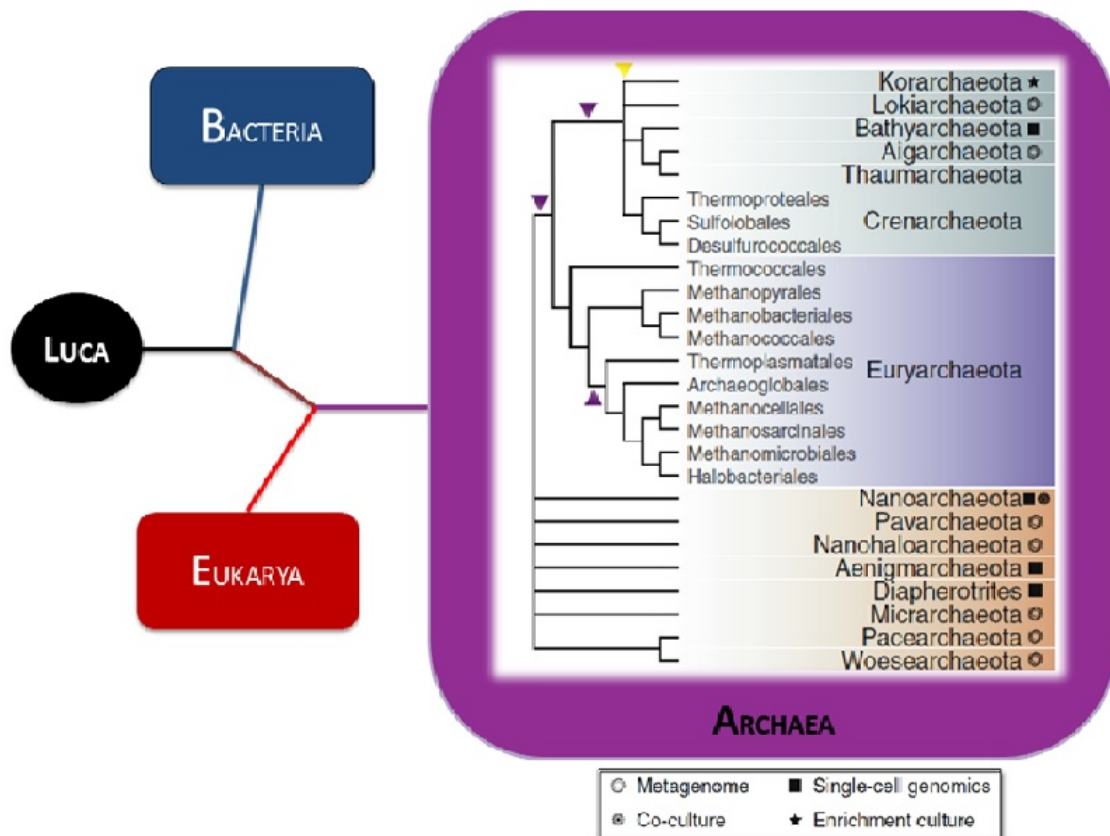


FIGURE I.1.1: Arbre phylogénétique des différents domaines du vivant  
 Sur la base d'analyses de l'ARNr 16S, le domaine des ARCHAEA est indépendant des domaines EUKARYA et BACTERIA. Les différents phyla existant des ARCHAEA sont représentés ici : le superphylum "TACK" (vert), le phylum des *Euryarchaeota* (violet), les lignées de taille nanométrique formant le superphylum "DPANN" (nuances orange). Ces derniers présentent une polytomie (multiples ramifications apparemment simultanées) traduisant des positions phylogénétiques incertaines. L'arbre est déraciné et les triangles violets indiquent les hypothèses privilégiées concernant la position de la racine entre les archées. Le triangle jaune suggère un point de branchement possible pour la lignée eucaryote (soit sœur du supergroupe TACK, ou à l'intérieur, éventuellement sœur des *Lokiarchaeota*). Les symboles au pied de l'arbre, indiquent le type de méthode de collecte d'ADN utilisée pour déterminer la séquence du génome (métagénome, co-culture, la génomique unicellulaire ou culture d'enrichissement), à moins que la culture pure ait été utilisée pour au moins un organisme représentatif (pas de symbole). Les lignées supplémentaires récemment découvertes (diversité fondée sur l'ARNr 16S seul), sans de nombreuses données génomiques disponibles, ne sont pas représentées ici [21].

### I.1.1.3 *Caractéristiques des archées*

Les archées ont une structure cellulaire procaryotique, anucléée, d'apparence semblable aux bactéries. Comme ces dernières, elles sont retrouvées sous différentes formes (coques, spirilles, bacilles ou formes irrégulières) isolées, par paire ou regroupées en amas et peuvent parfois être mobiles [45]. Par ailleurs, elles peuvent apparaître Gram positif ou négatif au sein du même genre. Néanmoins, elles présentent des différences importantes avec les autres domaines du vivant.

#### I.1.1.3.1 *Membranes et parois des archées*

La composition chimique et l'organisation de l'enveloppe cellulaire est l'une des principales caractéristiques observées chez les archées. Les membranes cellulaires sont constituées d'une double couche de molécules appelées glycérophospholipides. Ces molécules possèdent une partie polaire, hydrophile (groupement phosphate), et une partie apolaire, hydrophobe (chaîne aliphatique). Les membranes cellulaires des archées présentent des caractéristiques uniques, très différentes de celles retrouvées dans les autres formes du vivant. Chez les bactéries et les eucaryotes, les glycérophospholipides sont constitués d'acides gras reliés au D-glycérol par des liaisons esters. Chez les archées, les acides gras sont remplacés par des isoprénols. Ces derniers viennent se fixer par le biais de liaisons éthers à une molécule de glycérol en configuration L (Figure I.1.2) [46, 47]. Leur membrane est composée, le plus souvent, d'une monocouche phospholipidique tétra-éther qui confère une meilleure stabilité, aidant à supporter des conditions extrêmes [48, 49, 50, 51]. Au niveau pariétal, les archées se caractérisent également par l'absence de peptidoglycanes, à la place duquel sont retrouvées des pseudo-muréines ou des sous-unités protéiques : ceci confère aux archées des résistances aux antibiotiques interférant dans la synthèse de la paroi bactérienne (Figure I.1.3) [52, 45, 52].

#### I.1.1.3.2 *Machinerie de réplication du génome*

Seuls quelques éléments du système de traitement de l'information génétique des archées sont partagés uniquement avec les bactéries, telles que la topologie circulaire du chromosome, une taille de génome réduite, la présence d'unités de transcription polycistronique ou de séquences Shine-Dalgarno dans l'ARNm au lieu de séquences de Kozak [53, 54].

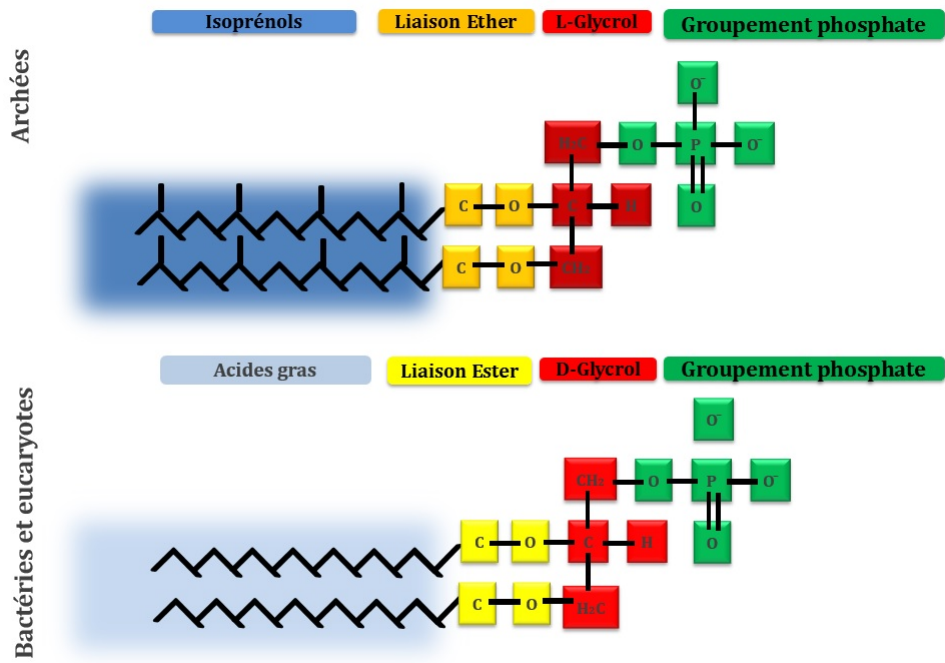


FIGURE I.1.2: Structure des glycérophospholipides constituant les membranes des archées et celles des bactéries et des eucaryotes

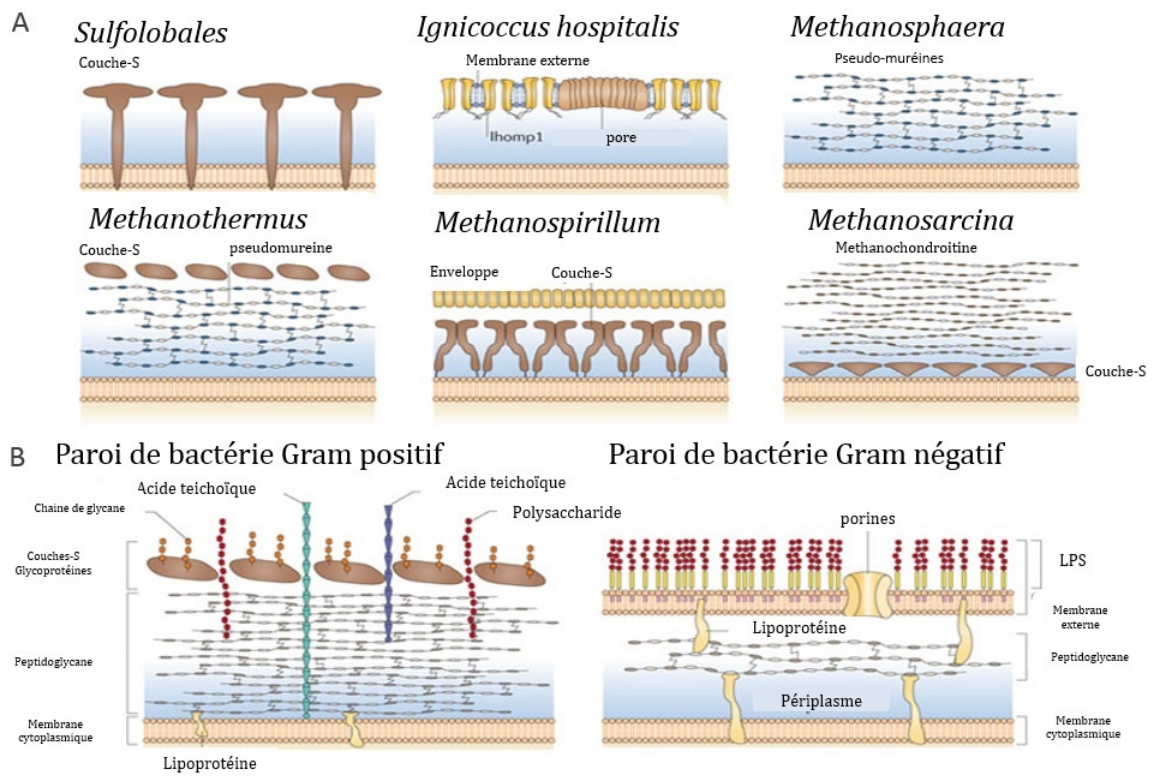


FIGURE I.1.3: Structures et composants des différentes parois observées chez les archées et chez les bactéries à Gram positif et négatif

La machinerie de réplication des archées est quant à elle différente des deux autres domaines, bien que globalement beaucoup plus proche de celle observée chez les eucaryotes (Tableau I.1.1). C'est suite au séquençage de *Methanocaldococcus jannaschii*, euryarchaeote méthanogène de l'ordre des *Methanomicrococcales*, que les analyses génomiques ont introduit les premières données sur la réplication de l'ADN chez les archées [55, 56]. Les résultats ont révélé la présence de grandes similitudes avec les molécules intervenant dans la machinerie de réplication des eucaryotes, parfaitement distincte de celle des bactéries. Au cours des dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de la biochimie des protéines impliquées dans la réplication des archées, notamment la caractérisation de la première origine de réplication de l'ADN chez l'archée *Pyrococcus abyssi* [57]. Depuis, un certain nombre de structures a été décrit, donnant des indications importantes sur les mécanismes de réplication de l'ADN, à la fois chez les archées et les eucaryotes (Tableau I.1.1, [58]). En effet, le premier complexe qui a attiré l'attention sur cette ressemblance est celui de la reconnaissance de l'origine de réplication : il comprend le complexe Cdc6 et GINS (protéines initiatrices et d'assemblage de la fourche de réplication) suivi de l'ensemble des composants intervenant dans la réplication tels que le complexe MCM (MiniChromosome Maintenance), complexe ADN hélicase impliqué à la fois dans l'initiation et l'étape d'élongation de la réplication de l'ADN [59, 60]. Des différences importantes sont néanmoins rencontrées au sein du domaine, comme l'absence de la protéine WhiP (Werner helicase interacting protein, impliquée dans le chargement de l'hélicase sur l'ADN) qui n'est conservée que chez les *Crenarchaeota*, l'absence chez les *Euryarchaeota* des gènes codant les protéines Gins 15 et Gins 23 (impliquées dans l'initiation de la réplication) ou de la protéine SSB (Single Stranded DNA Binding protein) présente chez certains taxons du phylum *Euryarchaeota*. Par ailleurs, la topoisomérase VI absente des *Thermoplasmatales* (un ordre euryarchaeote) y est remplacée par une ADN gyrase. Une synthèse des facteurs impliqués dans la réplication de l'ADN inter et intra-domaine est présentée dans le Tableau I.1.1. Celui-ci permet de comprendre l'étendue de la ressemblance de ces facteurs entre les archées et les eucaryotes [61]. Cette ressemblance couplée à la facilité de l'étude des archées (microorganismes unicellulaires) a permis d'avoir un modèle simplifié pour l'étude de la réplication chez les eucaryotes, avec des principes fondamentaux identiques quant au mode de réplication (l'initiation, l'élongation et la terminaison), mais des mécanismes différents d'un domaine à l'autre. Pour résumer de manière caricaturale, la réplication de l'ADN chez les archées peut être considérée catalysée par des protéines eucaryotes dans un contexte bactérien [62]. Néanmoins, il existe des caractéristiques spécifiques aux archées qui ajoutent à la complexité telle la présence de l'ADN polymérase D non retrouvée dans les autres domaines du vivant [63].

#### I.1.1.3.3 *Cytosquelette et division cellulaire*

La similarité de séquence entre les protéines MreB / FtsA et FtsZ (protéines de cloisonnement, homologues éloignées de l'actine et de la tubuline) bactériennes et archéennes et les composants du cytosquelette eucaryote est initialement apparue plutôt faible, voire inexistante [64]. Cependant, l'hypothèse d'une origine archéenne aux eucaryotes repose sur l'intervention de filaments d'actine dans le processus indispensable de l'internalisation d'un endosymbiote proto-mitochondrial [65], car ces filaments détiennent un rôle clé dans la phagocytose. Des protéines détenant un niveau de similarité de séquence élevé ainsi qu'une proximité phylogénétique aux actines eucaryotes ont été découvertes chez certaines *Crenarchaeota*. La présence de l'actine est également avérée dans le dernier ancêtre commun du superembranchement TACK [66], permettant d'attribuer une capacité phagocytaire même rudimentaire aux archées [67]. Des orthologues hautement conservés de tubuline chez les archées ont également été découverts dans le génome de plusieurs *Thaumarchaeota*, appelées artubulines. Il semble donc probable que les archées puissent former un cytosquelette de type microtubule [68, 69]. En outre, un système de division (Cdv, pour Cell division system) homologue au complexe de remodelage de la membrane eucaryote ESCRT-III (Endosomal sorting complex required for transport) a été découvert chez les *Sulfolobales* et *Desulfurococcales*, ainsi que chez certaines *Thaumarchaeota* et *Euryarchaeota*. Cette capacité de remodelage est également synonyme d'une grande capacité d'évolution [70].

#### I.1.1.3.4 *Ubiquitinylation et signalisation cellulaire*

L'utilisation de l'ubiquitine (Ub) ou ubiquitinylation forme un réseau central de régulation et de signalisation de la cellule eucaryote. Ce mécanisme contrôle la fonction la dégradation des protéines chez les eucaryotes. Dans cette voie, les protéines sont ciblées pour la dégradation par ligature covalente à l'ubiquitine, une petite protéine hautement conservée. Ce mécanisme joue un rôle important dans la régulation de nombreux processus, y compris la progression du cycle cellulaire, la transduction du signal, la régulation transcriptionnelle et l'endocytose [71]. Il était jusqu'à récemment considéré comme propre aux eucaryotes. L'analyse du génome de *Ca. Caldiarchaeum subterraneum*, premier membre du phylum putatif *Aigarchaeota*, a révélé la présence d'un opéron qui code pour une protéine Ub-like ainsi que des homologues des sous-unités de ce système [40]. L'ensemble de ces données contribue à supporter le scénario proposé par Williams et al. (2013) suggérant une origine archéenne endosymbiotique proto-mitochondriale aux eucaryotes [72]. L'ensemble des systèmes décrits ici est présenté dans la figure I.1.4.

TABLE I.1.1: Protéines présentes chez les différents domaines du vivant impliquées dans la réplication de l'ADN

	Bacteria*	Archaea*	Euryarchaeota	Thaumarchaeota	Eukarya*
Initiation		Crenarchaeota	<i>Euryarchaeota</i>		
Proteine initiateur	DnaA	Cdc6/Orc1	Cdc6/Orc1	Cdc6/Orc1	ORC1-6, Cdc6
Hélicase	DnaB(5' vers 3')	MCM(3' vers 5')	MCM(3' vers 5')	MCM(3' vers 5')	MCM2-7 (3' vers 5')
Chargeur de l'hélicase	DnaC	Whip	-	-	Cdt1
Assemblage de la fourche	-	GIN5	GIN5	GIN5	GIN5, Mcm10, Cdc45, Sld2, Sld3, Dpb11
Kinases	-	-	-	-	Cdc7-Dbf4, CDK-cyclin
Elongation					
Synthèse ADN					
Hélicase	DnaB	MCM	MCM	MCM	MCM2-7
ADN primase	DnaG	PriSL	PriSL	PriSL	Complexe Pol $\alpha$ -PriSL
Proteine fixant l'ADN (sb)	SSB	SSB RPA	RPASSB	RPA SSB	RPA
Topoisomérase	Topo IV	Topo VI	Topo VI (ADN gyrase)	Topo VI Topo IB	Topo IB Topo II
Polymérase réplicatives	Pol III, PolC	PolB PolD	PolB, PolD	PolB, PolD	Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$
Facteur de processivité	Sous-unité $\beta$	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA
Proteine chargeant le facteur de processivité	Complexe $\gamma$	RFC	RFC	RFC	RFC
Maturation des fragments d'Okazaki					
Polymérase	Pol I	?	?	?	Pol $\delta$
Nucléase ARN	Pol I RNase HIII ?	RNase HIII ?	RNase HIII ?	RNase HIII ?	RNase HIII ?
Endonucléase ADN	FEN-1	FEN-1 (Dna2)	FEN-1	FEN-1	FEN-1 (Dna2)
Hélicase	-	-	(Dna2)	-	Dna2, Pif1
ADN ligase	NAD-ligase	ATP-ligase	ATP-ligase	ATP-ligase	ATP-ligase



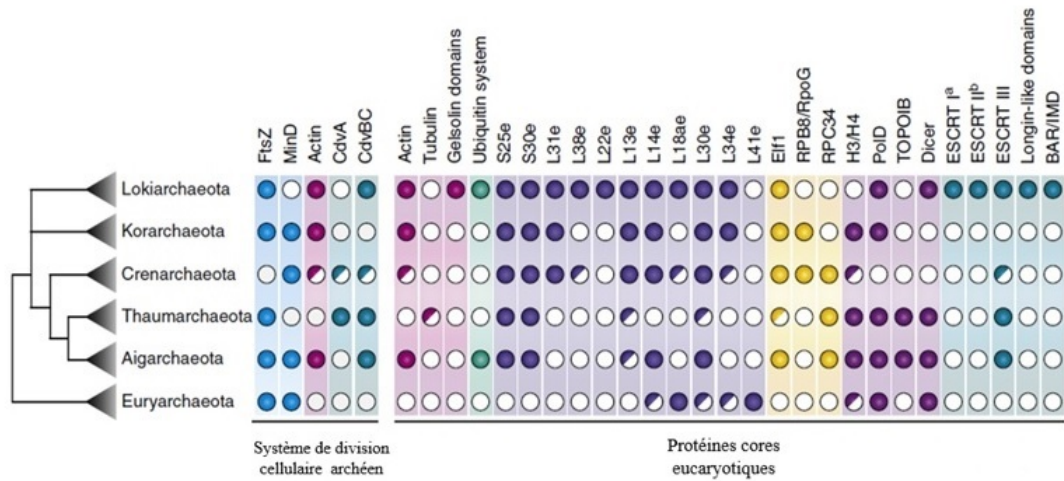


FIGURE I.1.4: Distribution taxinomique des composants archéens de la division cellulaire orthologues aux composants eucaryotiques

Les composants du système d'actine-tubuline à base de FtsZ sont représentés en bleu, les systèmes CDV (système de division cellulaire) en rose : les composants de type archéen sont affichés sur la gauche et les protéines de signature eucaryotique sur la droite. Les protéines impliquées dans différents processus biologiques sont indiquées en haut, à savoir dans la détermination de la forme cellulaire (rose), dans le recyclage de protéines (vert), dans la traduction (violet), la transcription (jaune), l'empaquetage de l'ADN, sa réplication et sa réparation (rose-violet), dans la division cellulaire, la formation de vésicules et le remodelage de la membrane (turquoise). Certains composants apparaissent dans les deux catégories. Les cercles de couleur indiquent la présence d'homologues dans tous les membres d'une lignée, alors que les cercles à moitié remplis représentent la distribution inégale et les vides représentent l'absence d'homologues [21].

Au-delà de ces caractéristiques, et de la même manière que les bactéries et les eucaryotes, les archées présentent de très grandes différences de métabolisme entre elles. Cependant, c'est dans ce seul domaine du vivant que l'on trouve des représentants capables d'un métabolisme particulier permettant l'acquisition d'énergie nécessaire à la vie de ces organismes : la méthanogenèse. Un métabolisme étroitement lié à la méthanogenèse est également retrouvé dans ce domaine, utilisant une machinerie similaire mais dans le sens inverse, qui permet l'oxydation du méthane en anaérobiose. Les archées responsables sont nommées les anaérobies méthanotrophes (ANME). Une attention plus particulière est portée dans le chapitre suivant aux archées méthanogènes et aux voies de la méthanogenèse.

### I.1.2 MÉTHANOGENÈSE ET ARCHÉES MÉTHANOGENÈS

La méthanogenèse est un ensemble de voies métaboliques conduisant à la production du méthane ( $\text{CH}_4$ ) à des fins énergétiques pour la cellule. Ce métabolisme n'a été observé que chez certaines archées appelées archées méthanogènes, bien que certaines bactéries puissent également produire du méthane secondairement lors de fermentations (par exemple *Helicobacter pylori* présent dans le tractus digestif humain). L'origine de la méthanogenèse reste archéenne et remonterait à l'apparition des *Euryarchaeota* [73, 74, 75, 76, 53]. En effet, les archées méthanogènes font toute partie de phylum des *Euryarchaeota* et sont réparties en 7 ordres taxinomiques : *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales* et plus récemment les *Methanomassiliococcales* [77, 78, 79, 13, 80]. Ces méthanogènes sont retrouvés dans des milieux très divers, tous anaérobies et où les sulfates sont le plus souvent rares, tels que les sédiments marins, les tourbières, les déserts chauds et secs. Ils sont également présents dans les systèmes digestifs de nombreux animaux, notamment ceux des mammifères et en particulier des ruminants, mais également celui de l'Homme [81].

#### I.1.2.1 Méthane, un gaz impliqué dans le réchauffement global de la planète

Les méthanogènes attirent l'attention par leur contribution au processus du réchauffement climatique. Dans la biosphère, le  $\text{CH}_4$  est produit de façon abiotique mais également biotique par la digestion anaérobie de la matière organique. Les différents événements conduisant à la genèse du  $\text{CH}_4$  sont illustrés sur la figure I.1.6. On estime jusqu'à 50 % les émissions de méthane dues aux activités humaines (agriculture et élevage, IPCC, 2006). Ce phénomène de méthanisation aide à la reminéralisation du carbone organique et contribue ainsi à la reconstitution de la biomasse. Le  $\text{CH}_4$  est l'un des principaux gaz à effet de serre, dont l'impact est 21 fois plus important sur le réchauffement climatique que celui du gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ), impact aggravé par son temps de vie dans l'atmosphère qui est estimé entre 8 et 12 ans [82]. Le  $\text{CH}_4$  est également un précurseur dans l'apparition de polluants atmosphériques toxiques tels que l'azote troposphérique (CITEPA, 2013).



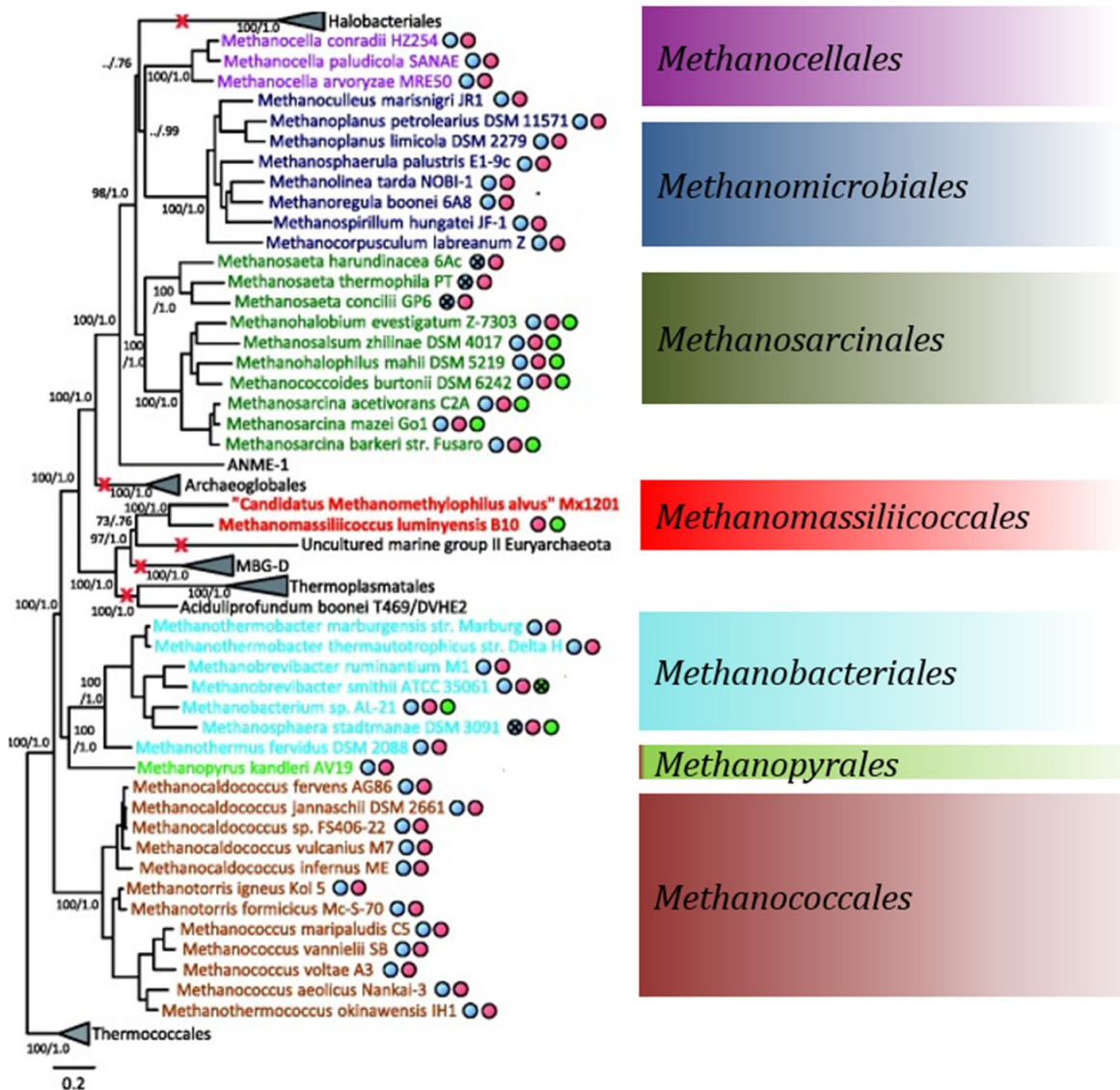


FIGURE I.1.5: Arbre phylogénétique des archées méthanogènes

Arbre phylogénétique des archées méthanogènes réalisé par la concaténation de 57 protéines ribosomales [83]

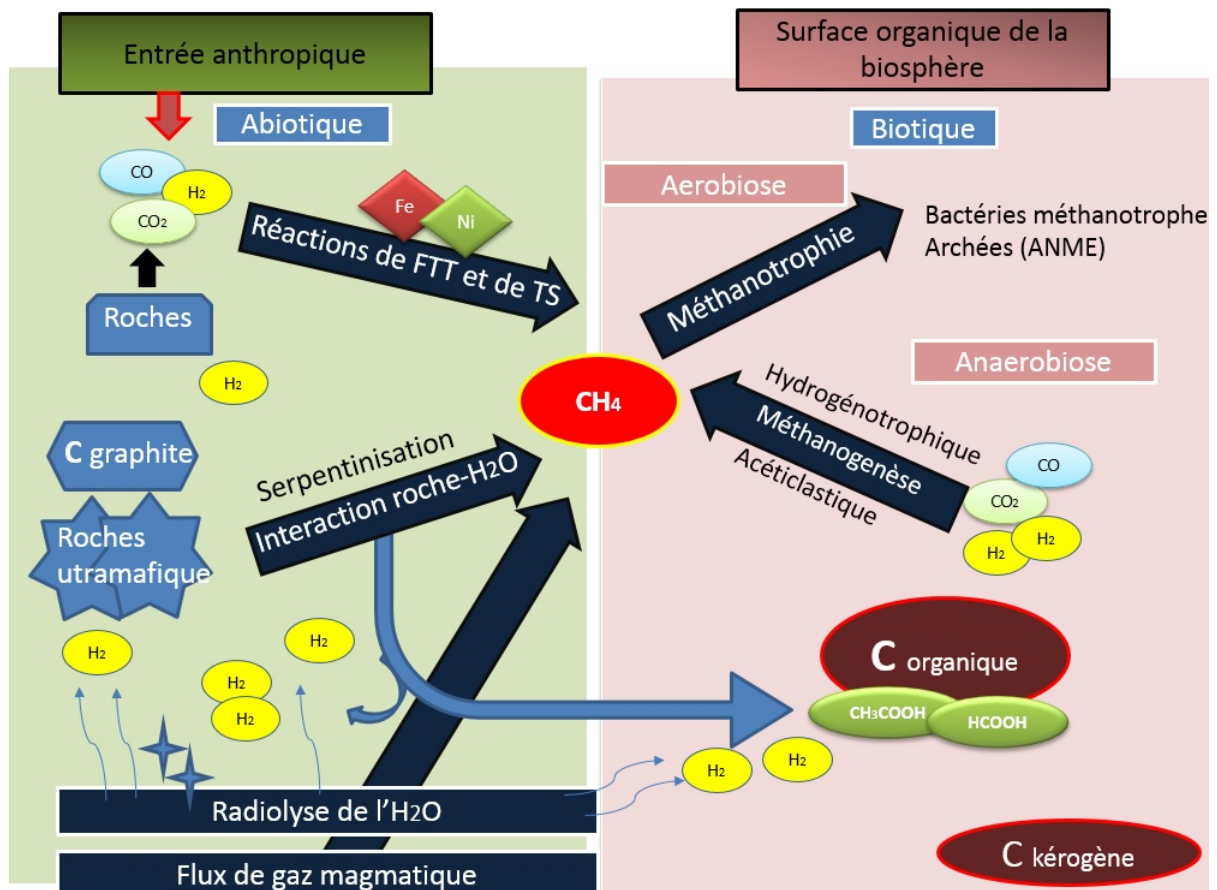


FIGURE I.1.6: Cycle du méthane dans la biosphère continentale profonde

Le méthane de la biosphère provient soit de réactions abiotiques à basse température ou d'activités biotiques d'origine microbienne. De manière abiotique, le  $\text{CH}_4$  est essentiellement issu des flux magmatiques gazeux, de réaction de serpentinisation (production de serpentine et de magnétite à partir de minéraux hydratés) ainsi que des réactions de Fisher-Tropsch (catalyse de  $\text{CO}$  et de  $\text{H}_2$  en vue de les convertir en hydrocarbure) ou de Sabatier (réaction du  $\text{H}_2$  avec du  $\text{CO}_2$  à des températures et des pressions élevées en présence de nickel afin de produire du  $\text{CH}_4$ ). De façon biotique, les méthanogènes hydrogénotrophes utilisent le carbone inorganique et les méthanogènes acéticlastiques et méthylotrophes utilisent du carbone organique (formate, acétate..) pour la production du  $\text{CH}_4$ . La consommation de ce dernier peut se faire soit par oxydation aérobie par des bactéries méthylotrophes ou oxydation anaérobie par des archées méthanotrophes (ANME pour anaerobic methanotrophs), dépendant des profondeurs auxquelles les microorganismes se trouvent [84].

Une réduction de son émission est donc souhaitable, et nécessite d'atteindre les secteurs responsables : comprendre les fondamentaux métaboliques de la méthanogenèse pourrait ainsi permettre de mieux maîtriser les émissions de CH<sub>4</sub>, voire dévier la production vers une ingénierie de la méthanisation pour une production maîtrisée de biogaz comme source énergétique pour l'humanité.

#### 1.1.2.2 Trois voies métaboliques possibles à la méthanogenèse

Les archées méthanogènes ont une richesse de métabolites inhabituelle agissant comme cofacteurs et précurseurs nécessaires pour produire le méthane [85]. Trois voies principales de méthanogenèse sont classiquement définies selon les substrats utilisés : la méthanogenèse hydrogénotrophe, la méthanogenèse acétoclastique et la méthanogenèse méthylotrophe [45]. Ces trois voies de méthanogenèse partagent toutes une dernière étape commune, avec la formation d'un hétérodisulfide de deux coenzymes (CoB et CoM) amenant à la libération du méthane sous l'action de la méthyl-coenzyme M réductase (représentée en rouge sur le schéma, Figure I.1.7). Cette enzyme est spécifique à l'ensemble des méthanogènes.

##### 1.1.2.2.1 Méthanogenèse hydrogénotrophe

Les méthanogènes hydrogénotrophes constituent le groupe d'archées méthanogènes le plus diversifié dans la biosphère, puisqu'ils forment 5 des 7 ordres méthanogènes : les *Methanococcales*, les *Methanopyrales*, les *Methanobacterales*, les *Methanomicrobiales* et les *Methanocellales* [86]. Le terme hydrogénotrophe indique que ces archées utilisent le dihydrogène (H<sub>2</sub>) comme donneur d'électrons, mais ce terme ne s'applique qu'aux archées utilisant H<sub>2</sub> comme réducteur du CO<sub>2</sub>, amenant ainsi à la production de méthane. Cependant, comme nous le verrons ultérieurement, il existe d'autres possibilités d'hydrogénotrophie, et pour des raisons de clarté, nous parlerons alors dans ces cas de métabolismes H<sub>2</sub>-dépendants, en l'absence actuelle d'une nouvelle classification métabolique / microbiologique des voies de méthanogenèse. Cette voie de méthanogenèse nécessite sept étapes et fait intervenir plusieurs coenzymes spécifiques (représentées en bleu dans la Figure I.1.7, A). La première étape est catalysée par la formylméthanofurane déshydrogénase permettant la fixation d'une molécule de CO<sub>2</sub>, celle-ci se faisant sur le méthanofurane pour générer le formylméthanofurane (Formyl-MF). Un cofacteur à molybdène est requis pour cette étape. La source d'électrons est la ferrédoxine préalablement réduite par le H<sub>2</sub>. La N-formyltransférase transfère le groupement formyl sur l'azote de son coenzyme, pour former la formyl-tétrahydréméthanoptérine (Formyl-H<sub>4</sub>MPT). Une condensation du formyle donne naissance à la méthényl-tétrahydréméthanoptérine (méthényl-H<sub>4</sub>MPT), réduite en méthylène-H<sub>4</sub>MPT par une déshydrogénase de méthylène-tétrahydréméthanoptérine. La méthylène-H<sub>4</sub>MPT est convertie en méthyl-H<sub>4</sub>MPT par une nouvelle réduction (catalysée par la méthylène-tétrahydréméthanoptérine réductase). Les deux dernières étapes nécessitent l'intervention du coenzyme F<sub>420</sub>, source d'électrons. Ce coenzyme est appelé ainsi du fait de

la fluorescence émise par excitation à 420 nm. Cette propriété permet par ailleurs de visualiser les méthanogènes en microscopie à épifluorescence, bien qu'étant non-totalement spécifique. Ceci aboutit à la formation d'un groupement méthyle sur la tétrahydrométhanoptérine (méthyle-H<sub>4</sub>MPT), groupement qui est ensuite transféré sur le coenzyme M sous l'action de la tétrahydrométhanoptérine S-méthyltransférase, permettant d'une part, la régénération de la tétrahydrométhanoptérine (H<sub>4</sub>MPT) et d'autre part, la formation du méthylcoenzyme M (CH<sub>3</sub>-S-CoM), substrat de l'étape commune à l'ensemble des méthanogènes [87].

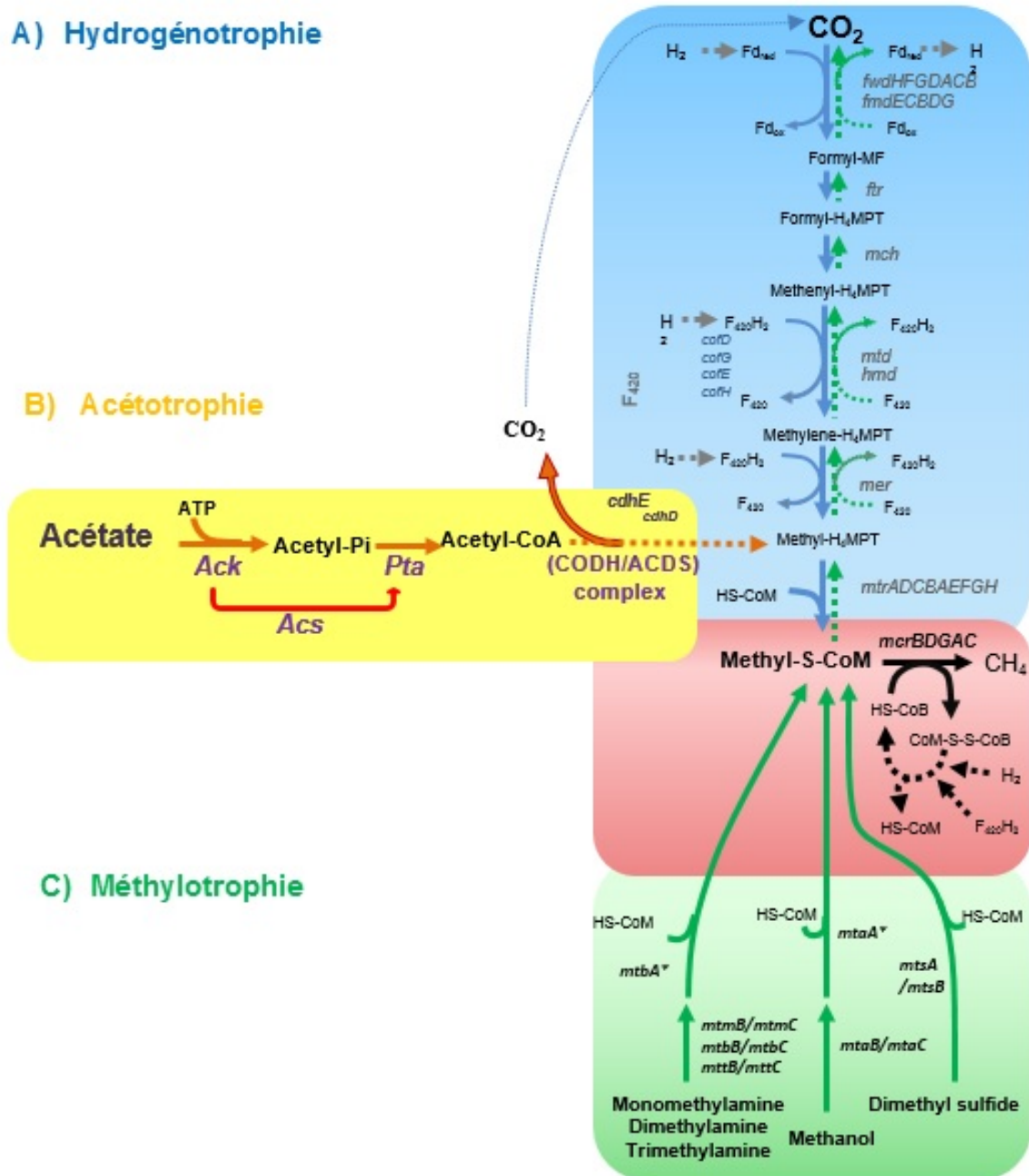


FIGURE I.1.7: Différentes voies de la méthanogénèse

Les différentes voies méthanogènes sont ici représentées, en bleu la voie hydrogénéotrophe, en jaune la voie acétoclastique, en vert la voie méthylotrophe. En rouge est indiquée la dernière étape de la méthanogénèse, commune à toutes les voies [83].

#### I.1.2.2.2 Méthanogenèse acéticlastique ou acétotrophe

Cette voie est limitée à quelques membres de l'ordre des *Methanosarcinales*, capables de réaliser plusieurs voies de méthanogenèse, les genres *Methanosarcina* et *Methanosaeta*. Ces méthanogènes sont capables de convertir l'acétate en méthane et en CO<sub>2</sub> au cours d'une réaction en quatre étapes. La première consiste au transfert de la fonction acétyl sur le coenzyme A pour former l'acétyl-CoA, selon deux mécanismes possibles, direct ou indirect : l'un s'effectue à l'aide de l'acétyl-coenzyme A synthétase (Acs, flèche rouge, figure I.1.7), le second par un système acétate kinase (Ack) / phosphate acétyltransférase (Pta, flèches oranges, figure I.1.7). Cette étape permet au final un transfert d'un groupement méthyle sur la tétrahydro-méthanoptérine, formant la méthyl-H<sub>4</sub>MPT et libérant une molécule de CO instantanément oxydée en CO<sub>2</sub>. La tétrahydrométhanoptérine S-méthyltransférase va permettre de transférer le méthyle du méthyl-H<sub>4</sub>MPT au coenzyme M et générer le méthyl-coenzyme M (Figure I.1.7, B), tout comme dans la méthanogenèse hydrogénotrophe. La quatrième et dernière étape est celle commune à tous les types de méthanogenèse, et permet la formation du méthane par le complexe MCR. Le CO<sub>2</sub> produit est utilisé pour la voie hydrogénotrophe.

#### I.1.2.2.3 Méthanogenèse méthylotrophe

C'est également au sein de l'ordre des *Methanosarcinales* qu'est retrouvée cette voie alternative à la méthanogenèse, faisant de cet ordre le plus diversifié. A l'exception du genre *Methanosaeta*, l'ensemble des membres est capable de méthanogenèse à partir de divers substrats méthylés en absence d'H<sub>2</sub>. Les substrats de méthanogenèse peuvent être variés et sont des composés en C<sub>1</sub> ("C<sub>1</sub>-compounds"), pouvant contenir plusieurs groupements méthyles (Figure I.1.7, C) [88]. Le groupement méthyle issu de différents types de substrats (méthanol, mono-, di- et tri-méthylamines, diméthyl-sulfide) est pris en charge par le complexe méthyltransférase spécifique au substrat, respectivement MtaBC, MtmBC, MtbBC, MttBC et MtsB. Ces derniers sont des hétérodimères protéiques corrinoïdes dont la première composante (respectivement MtaB/ MtmB / MtbB/ MttB selon le substrat) catalyse le transfert du groupe méthyle du substrat pour le fixer au groupement corrinoïde d'une protéine spécifique de l'origine du donneur de groupement méthyle (MtaC/MtmC/MtxC/MtcC respectivement). Une méthyltransférase spécifique catalyse ensuite le transfert du groupement méthyle au Coenzyme M (MtaA dans le cas du méthanol, MtbA pour les méthylamines, MtsA pour le diméthyl sulfide). Cette méthanogenèse méthylotrophe a également été retrouvée chez d'autres organismes. Jusqu'à peu, elle faisait figure d'exception ailleurs que chez les *Methanosarcinaceae*, notamment chez les *Methanobacteriales* du genre *Methanosphaera*, et en particulier *Ms. stadtmanae* : cette dernière, présente dans le tube digestif de nombreux animaux, a perdu la capacité de réduire le CO<sub>2</sub> en méthane bien qu'elle ait conservé la plupart des gènes dédiés à cette voie [89]. Cependant, chez celle-ci, le mécanisme global nécessite de l'H<sub>2</sub>, afin de permettre la restauration des cofacteurs (en particulier la régénérescence du coenzyme B à partir de l'hétéro-disulfide CoB-S-S-CoM).



Enfin, très récemment, les *Methanomassiliicoccales* étudiées ont également montré une méthanogenèse méthylotrophe vis-à-vis du méthanol, également sous dépendance de l' $H_2$  [90]. L'analyse du premier génome de *Methanomassiliicoccales*, l'espèce candidate *Ca. Methanome thylophilus alvus*, et sa modalité de culture en consortium confirme cette méthylotrophie [91]. De plus, les gènes codant les enzymes et cofacteurs nécessaires aux autres voies de méthanogenèse présentent l'originalité par rapport à l'ensemble des autres méthanogènes étudiés à ce jour, d'être intégralement absents. Ainsi, les *Methanomassiliicoccales* seraient pour l'heure un ordre formé d'espèces uniquement méthylotrophes, en particulier à partir du méthanol comme substrat. La présence dans divers embranchements des *Euryarchaeota* des composants de cette méthanogenèse, couplée à leur analyse phylogénétique sont des arguments pour un ancêtre méthanogène apparu très tôt chez les *Euryarchaeota*, et présentant une méthanogenèse primitive méthylotrophe rudimentaire à partir de méthanol [83]. Les données génomiques initiales de *Ca. Mmp. alvus* ont également révélé la capacité génétique d'utiliser d'autres composés méthylés tels que les méthylamines et le diméthyl-sulfide comme substrats de méthanogenèse [91]. Des études menées par Poulsen et coll. en 2013, ainsi que celles menées au sein du laboratoire, suggèrent que des membres de cet ordre seraient effectivement capables d'utiliser les méthylamines comme substrat [92], en plus du méthanol.

En conclusion, il existe trois voies et divers substrats de méthanogenèse, métabolisme rencontré exclusivement chez des *Euryarchaeota*. Des archées méthanogènes hydrogénotrophes peuvent également utiliser des alcools secondaires comme substrats, tels que le 2-propanol, le 2-butanol et le cyclopentanol ou encore l'éthanol [93, 94]. Le formate est également substrat de méthanogenèse, ce substrat rentrant dans la voie dite « hydrogénotrophe » mais permettant le déroulement de cette voie sans  $H_2$ . De plus, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (*Methanobacteriale*) et *Methanosarcina barkeri* (*Methanosarcinale*) peuvent utiliser le CO [95, 96]. Les énergies libres standards des différentes réactions de méthanogenèse existantes et les microorganismes typiques sont résumés dans le Tableau I.1.2 . Ainsi, nous avons pu voir que l'utilisation des méthylamines nécessite des méthyltransférases dédiées. Parmi celles-ci, l'analyse des gènes codant les méthyltransférases B de deux souches de *Methanosarcina barkeri* a mis en évidence la présence d'un codon *ambre* (codon non sens stop de traduction) dans le cadre de lecture des gènes codant les méthyltransférases *mtmB1*, *mtbB1*, *mtbB2*, *mtbB3* et *mttB*. Depuis, la même caractéristique a été mise en évidence pour ces gènes dans d'autres génomes, tels ceux de *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina mazei* et *Methanococcoides burtonii* : la présence d'un triplet *ambre* (TAG) en phase de lecture ouverte semble être un trait conservé dans tous les gènes de méthyltransférases de méthylamines [97, 98]. Cette observation est à la base de la découverte du 22<sup>ème</sup> acide aminé protéinogène, la pyrrolysine.

TABLE I.1.2: Énergie libérée et microorganismes typiques des différentes réactions de méthanogénèse existantes

Réaction globale de la méthanogénèse	Delta G° (KJ/mol de CH <sub>4</sub> )	Les archées concernées
I. Composés non méthylés		
4 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	-135	La plupart des méthanogènes
4 HCOOH → CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	-130 -130	Plusieurs hydrogénotrophes
CO <sub>2</sub> + 4 isopropanol → CH <sub>4</sub> + 4 acétone + 2 H <sub>2</sub> O	-37	Quelques hydrogénotrophes
4 CO + 2 H <sub>2</sub> O → CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub>	-196	<i>Methanothermobacter</i> et <i>Methanosarcina</i>
II. Composés méthylés		
4 CH <sub>3</sub> OH → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	-105	<i>Methanosarcina</i> et autres méthylotrophes
CH <sub>3</sub> OH + H <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	-113	<i>Methanomicrococcus blatticola</i> <i>Methanosphaera spp</i> et <i>Methanomassiliicoccales</i>
2 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> S	-49	Quelques méthylotrophes
4 CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>3</sub>	-75	Quelques méthylotrophes
2 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 NH <sub>3</sub>	-73	Quelques méthylotrophes
4 (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N + 6 H <sub>2</sub> O → 9 CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>3</sub>	-74	Quelques méthylotrophes
4 CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> Cl + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>4</sub> Cl	-74	Quelques méthylotrophes
III. Acétate		
CH <sub>3</sub> COOH → CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>	-33	<i>Methanosarcina</i> et <i>Methanosaeta</i>

### 1.1.2.3 Usage d'un acide aminé rare, la pyrrolysine

D'autres acides aminés que les 20 classiques sont retrouvés dans les protéines. Parmi ceux-ci, certains sont incorporés dès la traduction, et sont donc des acides aminés protéinogènes. Ainsi, la sélénocystéine (SeCys) forme une exception au code génétique "universel", en étant introduit co-traductionnellement. Cet acide aminé est retrouvé chez certaines archées, de même que dans les autres domaines du vivant [99, 100]. Également, un 22<sup>ème</sup> acide aminé protéinogène a été mis en évidence, au départ au sein des archées méthanogènes méthylotrophes, la pyrrolysine [101, 102]. Son nom de nomenclature IUPAC est la N6-[(2R,3R)-3-méthyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-2-ylcarbonyl]-L-lysine. (Figure I.1.8) avec pour code à trois lettres Pyl et O en code à une lettre. Le nom pyrrolysine a été donné en référence à l'amide d'un carboxylate de pyrroline avec un résidu lysyle [103]. Cet acide aminé a été mis en évidence initialement par cristallographie sur la méthyltransférase du groupement méthyle de la monométhylamine MtmB [103], en lieu et place du codon *ambre* UAG sur l'ARNm. La spectrométrie de masse a par la suite confirmé la présence d'une pyrrolysine en configuration L dans les méthyltransférases des trois méthylamines chez *Methanosarcina barkeri* [104]. Le caractère électrophile de l'atome de carbone du groupement imine de Pyl semble jouer un rôle dans l'activation et l'orientation des méthylamines pour le transfert de groupe méthyle à une protéine corrinoïde [105]. Ceci la rend indispensable à l'activité catalytique. L'acide aminé Pyl est restreint à un faible nombre d'organismes mais également à quelques protéines appelées Pyl-protéines. Il est ainsi retrouvé quasi exclusivement au niveau du site actif des enzymes de type méthyltransférases (MT) [104, 98], indiquant une histoire évolutive intimement liée à ce métabolisme de méthanogenèse méthylotrophe à partir de ces substrats méthylés. Il est présent chez 24 archées méthanogènes de la famille des *Methanosarcinaceae*, et vient d'être également suspecté chez des membres des *Methanomassiliicoccales* où les gènes nécessaires à sa synthèse et à son incorporation protéique sont également retrouvés [91]. Il est également retrouvé chez quelques bactéries anaérobies, appartenant au phylum des *Firmicutes* et chez l' $\alpha$ -protéobactérie *Bilophila wadsworthia* [106]. Son origine reste inconnue, mais il est communément admis qu'il s'agit d'un acide aminé très ancien du vivant, perdu au cours de l'évolution. Pour certains, il pourrait même s'agir d'un vestige antérieur à LUCA (Last Unique Common Ancestor), cellule à l'origine de toutes les lignées cellulaires actuelles. La(es) cellule(s) possédant la capacité d'encodage de cet acide aminé aurai(en)t coexisté avec LUCA. Elle(s) formerai(en)t une lignée qui se serait éteinte au cours de l'évolution, non sans avoir auparavant transmis ce système par transfert génétique latéral à quelques descendants de LUCA, dont potentiellement un ancêtre archéen [107].

#### 1.1.2.3.1 Opéron Pyl et synthèse de la pyrrolysine

Les gènes nécessaires à la synthèse et à l'utilisation de la pyrrolysine sont rassemblés dans une unité fonctionnelle, nommée opéron Pyl, contenant tous les gènes nécessaires aux activités



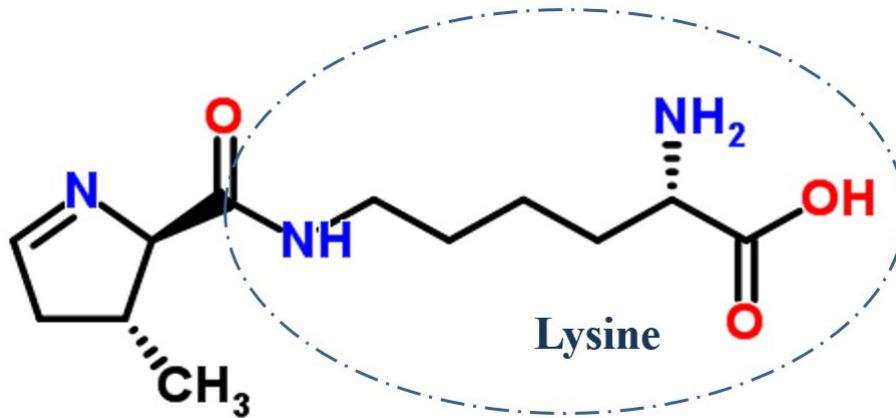


FIGURE I.1.8: Représentation de la formule de la pyrrolysine

Formule de la pyrrolysine avec la partie lysine encerclée [108].

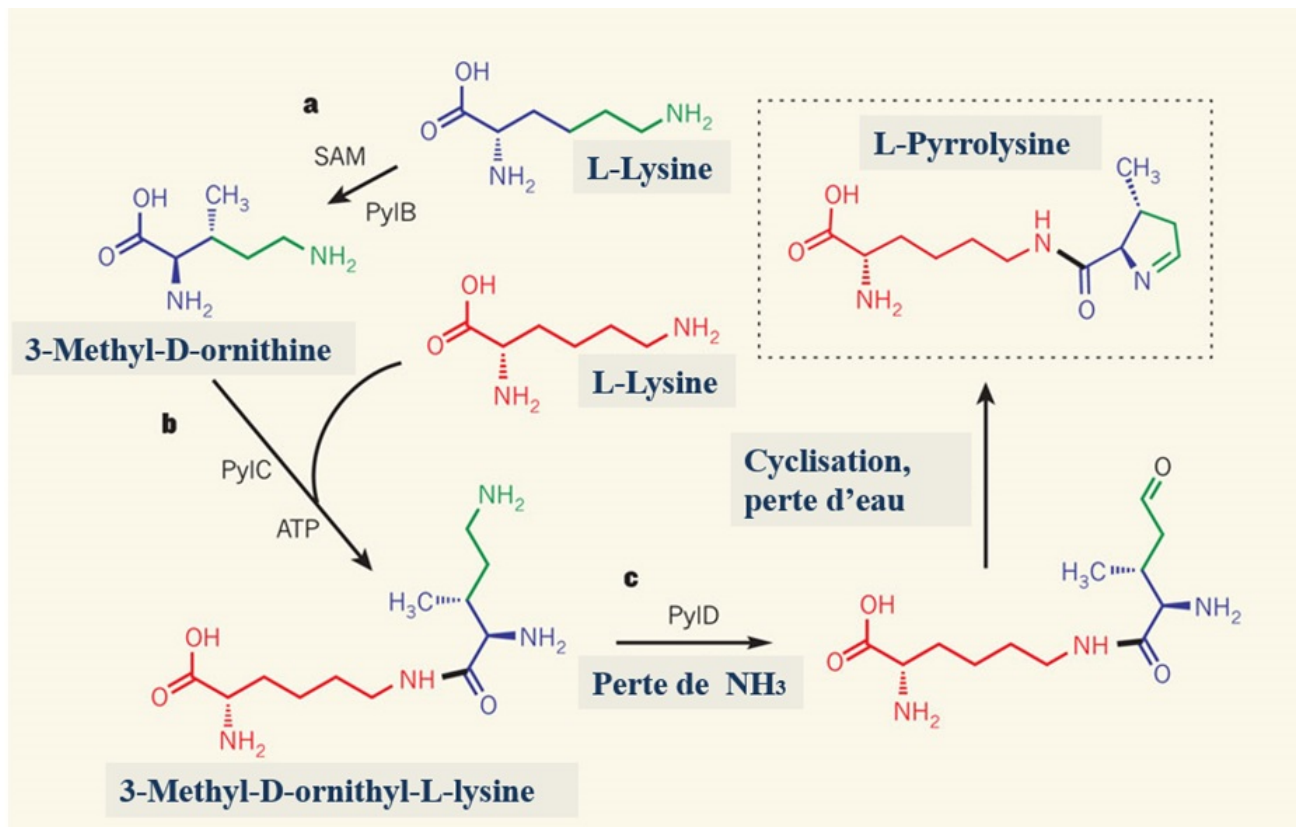


FIGURE I.1.9: Biosynthèse de la pyrrolysine à partir de deux lysines et des produits des gènes *pylB*, *pylC* et *pylD*

La pyrrolysine est formée à partir de deux molécules de lysine. Le produit du gène *pylB*, une lysine mutase-proline-2 méthylase, catalyse la conversion de la lysine en 3-méthyl-D ornithine. Cette dernière est alors combinée à une autre lysine pour former la 3-méthyl-D ornithyl-L-lysine grâce à une pyrrolysine synthétase, ATP-dépendante codée par le gène *pylC*. *PyID* est responsable d'une réaction de déamination oxydative, permettant de retirer un groupement  $\text{NH}_3$  pour former la 3-méthyl-D-glutamyl-semialdéhyde-L-lysine. La dernière réaction de cette biosynthèse est une cyclisation avec perte d'une molécule d' $\text{H}_2\text{O}$  [109].

et rassemblés sous le terme de « système Pyl ». Ce système est codé par cinq gènes (*pylTSBCD*, Figure I.1.9). Étonnamment, les étapes de synthèse coïncident avec l'ordre des gènes dans le génome de *M. barkeri*. Les différentes étapes sont reprises dans la figure I.1.9 [102, 110]. La synthèse de la pyrrolysine se fait sous l'action de trois enzymes (PylB, PylC et PylD) et a été longtemps discutée : les premières propositions considéraient que la chaîne acyle provenait de la lysine, et que le noyau pyrrol était issu d'autres acides aminés tels que l'isoleucine, l'ornithine, le glutamate, la proline ou la méthionine [111, 112]. Des études récentes ont montré qu'en définitif, Pyl a pour précurseur deux molécules de lysine, c'est-à-dire est synthétisée à partir d'un acide aminé unique, protéinogène classique (Figure I.1.10), [102].

#### 1.1.2.3.2 Incorporation traductionnelle de la pyrrolysine

La pyrrolysine est incorporée au moment de la traduction, comme un acide aminé classique, avec un ARNt spécifique de la pyrrolysine (ARNt-Pyl). Celui-ci est codé par le gène *pylT*. Sa structure (Figure I.1.11) présente des caractéristiques étonnantes, en étant extrêmement courte du fait de boucles raccourcies. Il possède un anticodon spécifique "CAU", permettant de détourner le non-sens stop habituel du codon *ambre*. L'encodage en une pyrrolysine dépendrait également d'un contexte particulier au niveau de l'ARNm dans le ribosome. Ainsi, une conformation particulière de l'ARNm, avec une structure secondaire tige-boucle, nommée PYLIS pour PYrroLYsine Insertion Sequence, est retrouvée chez les ARNm codant des Pyl protéines, tout du moins chez les bactéries [106]. La Pyl libre, nouvellement synthétisée, est accolée sur le bras accepteur de l'ARNt-Pyl par une pyrrolysine ARNt synthétase spécifique, codée par le gène *pylS* chez les *Methanosarcinales* (Figure I.1.9). La partie N-terminale (Nter) est considérée indispensable à la reconnaissance de l'ARNt par l'enzyme pour y lier spécifiquement la pyrrolysine et est codée par un gène propre chez les bactéries, le gène *pylSn* (pour Nter), l'autre constituant de l'ARNt synthétase prenant alors le nom de PylSc (pour Cter) encodé par le gène *pylSc*. Dans la partie résultats de cette thèse, nous reviendrons sur ce système Pyl. En effet, dès 2012, et d'après les données génomiques, ce système Pyl a également été mis en évidence par le laboratoire chez un membre des *Methanomassiliicoccales*, *Ca. Mmp. alvus* [91].

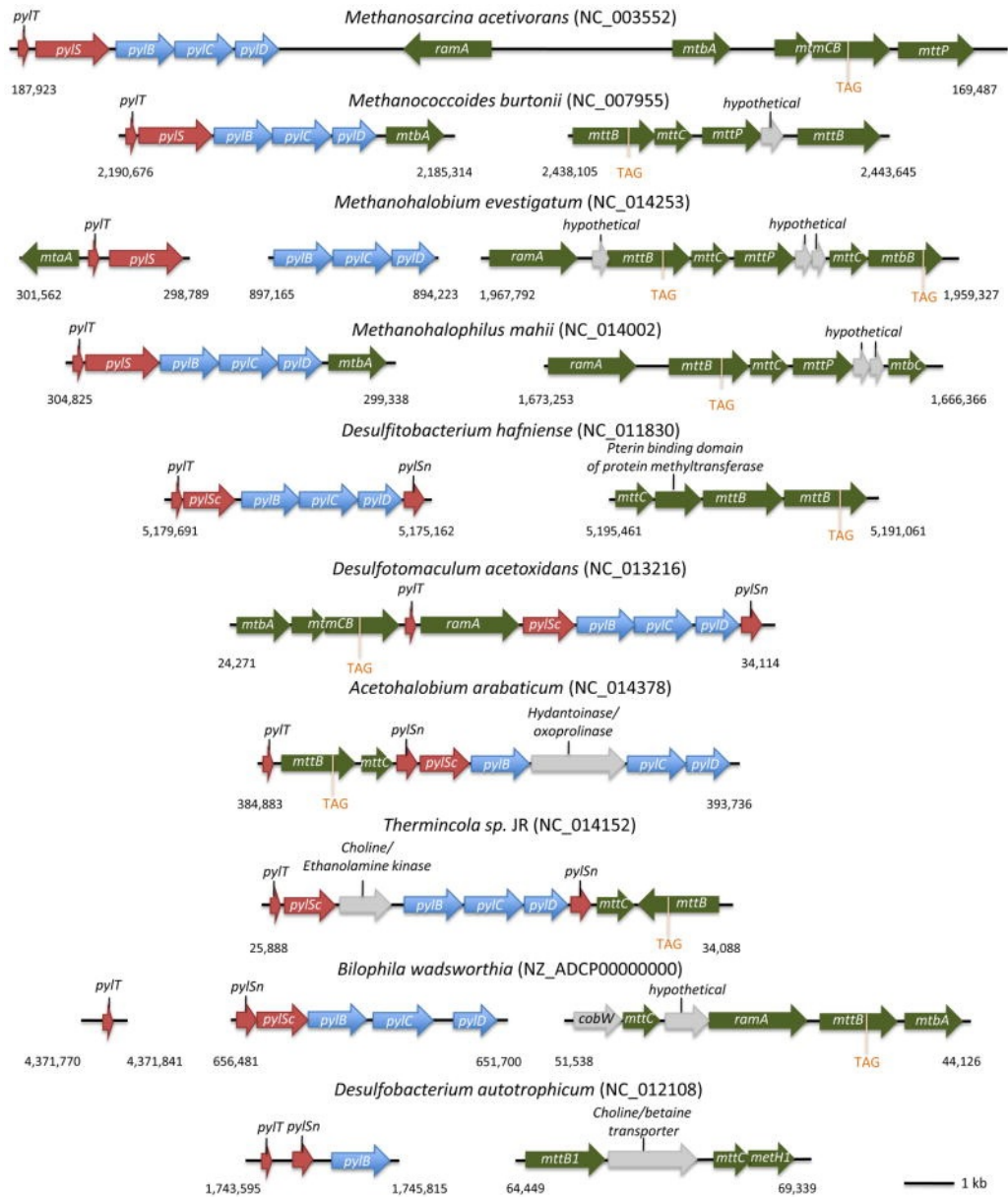


FIGURE I.1.10: Organisation du systèmes Pyl chez différentes souches séquencées  
 Organisation du système Pyl et ses homologues identifiés dans les génomes de souches séquencées. Les couleurs indiquent les fonctions du gène homologue chez *Methanosarcina* spp : bleu, gènes de biosynthèse de la pyrrolysine; rouge, décodage du codon ambre; vert, métabolisme des méthylamines et gris, gènes de fonctions inconnues [110].

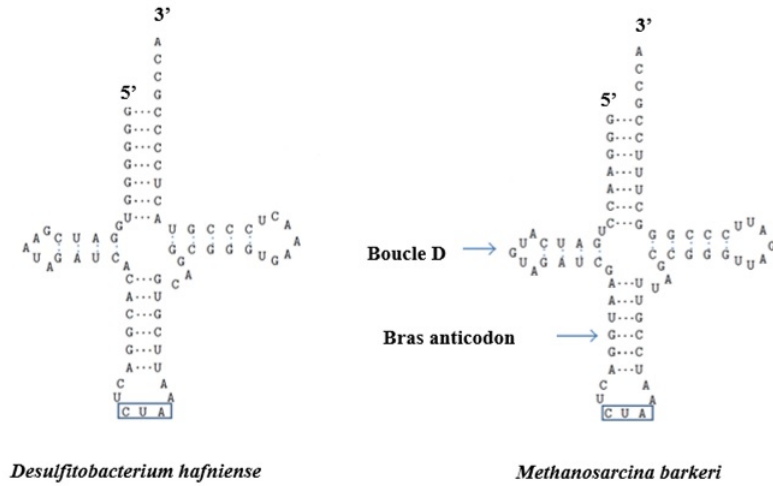


FIGURE I.1.11: Structure secondaire de l'ARNt-Pyl  
 Représentation de la structure secondaire de l'ARNtPyl de la bactérie *Desulfitobacterium hafniense* et de l'archée *Methanosarcinaceae Methanosarcina barkeri*. L'anticodon CUA qui correspond au codon *ambre* est encadré en bleu [110].

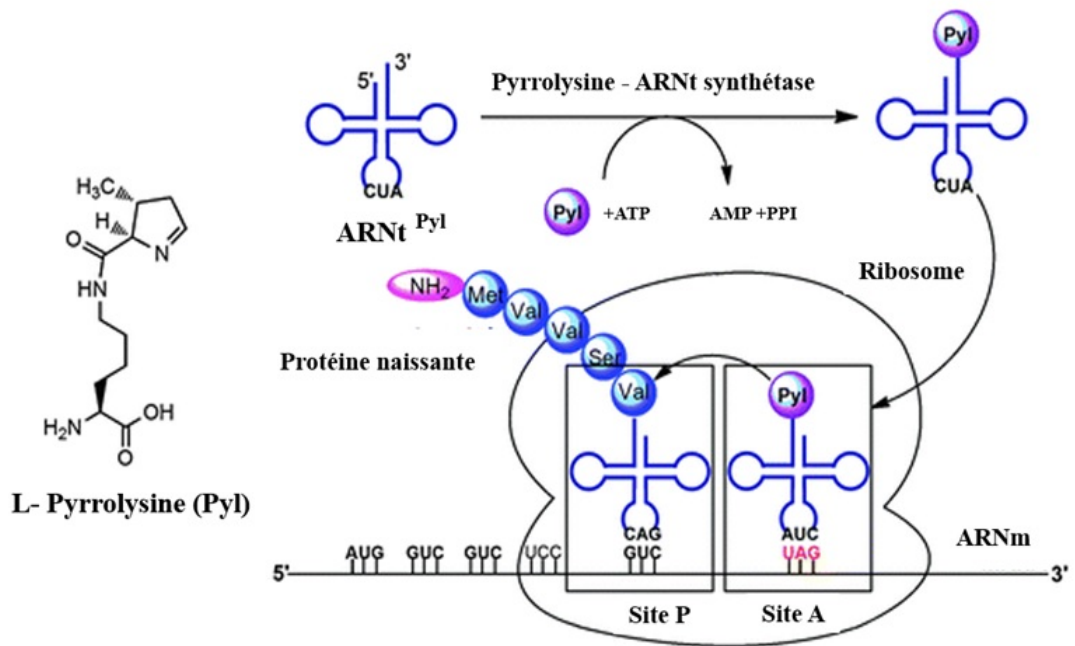


FIGURE I.1.12: Insertion co-traductionnelle de la pyrrolysine  
 Une fois que la pyrrolysine est synthétisée à partir des gènes *pyBCD*, celle-ci est intégrée au niveau de son ARNt spécifique, codé par *pylT*, une amino-acyl ARNt synthétase spécifique codée par le gène *pylS*. Le Pyl-ARNt-CUA est ensuite utilisé pour la traduction au cours de la synthèse protéique au niveau du ribosome [113].

#### I.1.2.4 Diversité taxinomique des méthanogènes

De nouvelles et nombreuses souches d'archées ont été mises en évidence ces dernières années. Ceci est en grande partie dû à l'avènement des techniques de biologie moléculaire [114]. Les sept ordres méthanogènes, tous euryarchéens (*Methanobacteriales*, *Methanocellales*, *Methanococcales*, *Methanomassiliicoccales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* et *Methanopyrales*) regroupent aujourd'hui 16 familles (Figure I.1.5), d'après les données les plus récentes des bases de données du NCBI, dont 9 pour les seuls ordres *Methanosarcinales* et *Methanobacteriales*. Trente-huit genres sont décrits, avec également une diversité plus importante chez ces deux derniers ordres, totalisant à eux 23 genres (NCBI consultation 10/ 2015).

Outre cette taxinomie, particulièrement déterminée sur des caractéristiques phylogénétiques, les méthanogènes sont également classés selon leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques. On définit ainsi 3 classes : la classe I et la classe II, composée respectivement des *Methanopyrales*, *Methanococcales* et *Methanobacteriales* pour l'une et des *Methanomicrobiales* pour l'autre, ne possèdent pas de cytochromes, présentent une capacité d'utilisation de substrats assez restreinte et montrent un cycle des acides tricarboxyliques (TCA) partiel. La classe III formée des seules *Methanosarcinales* possède des cytochromes, une plus large gamme de substrats de méthanogenèse, et un cycle TCA oxydatif partiel, générateur d'énergie [115]. Le classement des *Methanocellales* et des *Methanomassiliicoccales*, de découverte récente, reste à faire dans ce contexte où l'étendue de leur capacité métabolique n'est pas encore totalement connue [116].

#### I.1.2.5 Représentation environnementale des méthanogènes

L'ensemble des genres méthanogènes mentionnés ci-dessus colonise divers environnements anaérobies de la planète. Certains d'entre eux présentent la particularité d'être également des membres des communautés microbiennes associés au tractus digestif des animaux, dont l'Homme (Tableau I.1.3, [86]).

##### I.1.2.5.1 Environnements extra-digestifs

En 1998, Grosskopf et ses collaborateurs considéraient les *Methanosarcinales* et les *Methanomicrobiales* comme les groupes de méthanogènes les plus abondants des échantillons de sédiments prélevés dans divers endroits du monde [117]. Aujourd'hui, il semble toujours en effet que les membres des *Methanosarcinales* soient ceux qui dominent dans les sédiments [118, 119, 120]. Le genre *Methanosarcina* est retrouvé en abondance dans les microcosmes des cultures de riz et des sols anoxiques. Des séquences étroitement liées au méthanogène *Methanosaeta concilii* sont également retrouvées dans les rizières et les sols anoxiques [121]. La prédominance des phylotypes de l'ordre des *Methanosarcinales* est en grande partie due à

leur versatilité métabolique. En effet, l'ordre comprend les méthanogènes les plus polyvalents, capables d'effectuer les trois voies de méthanogenèse (hydrogénotrophie, acétotrophie et méthyliotrophie H<sub>2</sub>-dépendante ou non, cf Figure I.1.7). La seconde raison est la disponibilité du substrat, l'acétate étant très répandu dans les environnements où l'oxygène ainsi que les accepteurs d'électrons alternatifs autres que le CO<sub>2</sub> sont rares. L'utilisation de l'acétate est ainsi la principale source de production de méthane dans ces environnements [121]. Des *Methanocellales* connues auparavant comme le groupe d'archées non cultivées Rice-cluster I (RC-I) sont également retrouvées dans les rizières et les sols anoxiques [122, 123, 116]. Toutes les espèces de ce groupe sont hydrogénotrophes obligatoires et ont été classées dans le genre *Methanocella*, bien que leurs séquences d'ARN ribosomique 16S et des gènes *mcrA* présentent un faible niveau d'identité [122, 123]. En ce qui concerne les *Methanopyrales*, le seul représentant connu à ce jour, *Methanopyrus kandleri*, a été isolé à proximité de sources hydrothermales du golfe de la Californie, à une profondeur de 2000 m en dessous du niveau de la mer et à des températures de 84-110 °C [124]. Les *Methanomicrobiales* [125], quant à elles, sont détectées le plus souvent dans les milieux marins, dans des décharges et dans des réacteurs de traitement des eaux usées [78]. Très récemment, *Candidatus Methanogranum caenicola*, une souche appartenant au nouvel ordre de *Methanomassiliococcales*, a été retrouvée dans des stations de traitement des déchets [80]. Rétrospectivement, des phylotypes étroitement liés à cet ordre sont également signalés par plusieurs études dans divers environnements tels que les sols, les rizières, les lacs, les rivières, les sédiments marins. Cette diversité écologique semble également se refléter au travers de lignages spécifiques au sein de cet ordre [83], avec un lignage apparaissant spécifique des écosystèmes digestifs des animaux, des insectes à l'Homme.

#### 1.1.2.5.2 Archées méthanogènes et environnements digestifs

Les *Methanobacteriales* forment l'ordre le plus fréquemment rencontré dans le tractus digestif des animaux. Certains ruminants peuvent produire jusqu'à 500 litres de méthane par jour [126]. Ce taux ainsi que le microbiote méthanogène varient selon l'alimentation, la zone géographique mais surtout le type d'hôte. Les analyses chez les vaches laitières ont montré que les méthanogènes les plus retrouvées sont des *Methanobacteriales*, à la fois du genre *Methanobrevibacter* (principalement *Mb. ruminantium*) et du genre *Methanosphaera*. Des *Methanosarcinales* y sont également présentes. Sur d'autres terres, les vaches laitières Jersey des États-Unis présentent *Mb. millerae* comme le méthanogène le plus important [127, 128]. Ces variations liées à la zone géographique sont également observées chez d'autres ruminants. Il est rapporté que les buffles d'Inde et du Brésil présentent des différences quant à leur microbiote méthanogène avec respectivement une prédominance de *Methanomicrobium mobile* (94,4 à 97,1 %) [129, 130] et du genre *Methanobrevibacter* (91,5 %) [131]. Cette influence de la zone géographique est en lien étroit avec l'alimentation, celle-ci étant conditionnée par le climat. En effet, chez les bovins non laitiers, les animaux nourris à base de maïs présentent 51 % de *Methanobrevibacter* (majoritairement *Mb. Ruminantium*, 48 %). Les archées affiliées aux *Thermoplasmatales* (probablement des *Methanomassiliococcales*), [92, 83] sont représentés pour près de 40 %. En revanche, chez des animaux nourris avec un régime composé de sous-produits de pommes de terre, les mé-



thanogènes affiliées aux *Thermoplasmatales* sont majoritaires (50 %, [132]). Dans une étude de Morgavi et al. menée en 2015 chez l'agneau, en complément des *Methanobacteriales* sont également retrouvées les *Methanomassiliicoccales* [133]. Le microbiote méthanogène de ruminants sauvages a également été analysé. Celui-ci permet de déduire que la proximité à l'homme ne semble pas avoir d'influence. Le rumen des rennes de pâturages norvégiens présentent des méthanogènes de type *Methanobrevibacter* (83,3 %) [134], les archées affiliées aux *Thermoplasmatales* (9,3 %) sont moins fréquentes. Ces dernières sont par contre plus répandues (53,6 %) dans le rumen des rennes de l'île déserte Svalbard située dans la mer Arctique [135]. Chez le rhinocéros blanc, des séquences de la *Methanomicrobiale* *Methanocorpusculum-like*, sont majoritaires (60 %), et des séquences de *Methanomassiliicoccus-like* et *Methanosphaera-like* sont également détectées [136].

Les camélidés, à la différence des ruminants, ont des estomacs compartimentés en trois chambres au lieu de quatre. *Methanobrevibacter* y représente également le genre archéen le plus présent, que ce soit pour le dromadaire, le chameau ou l'alpaga [137, 138]. La prédominance des *Methanobacteriales* a également été notée chez les animaux monogastriques (non ruminants). Ainsi, c'est le cas chez les grands animaux herbivores tels que les chevaux, les mules et les ânes qui produisent une quantité significative de méthane, bien qu'inférieure à celle des ruminants [139]. Dans une étude récente menée sur le cheval et le poney, en plus des *Methanomicrobiales* qui forment le groupe le plus abondant dans leur intestin, des séquences affiliées au phylum *Methanomassiliicoccales* ont également été détectées [140].

La période à laquelle se fait l'échantillonnage a également son importance, la disponibilité et la nature de l'alimentation variant selon les saisons. En effet, le microbiote d'animaux plus exotiques tels que les marsupiaux à faible niveau d'émissions de méthane a été analysé. Le microbiote méthanogène de wallabies de l'espèce *Macropus eugenii* est composé de *Methanobrevibacter-like* (quasi exclusivement *Mb. gottschalkii*) (91 %) et seulement 6,3 % de *Thermoplasmatales* (échantillonnage au mois de mai). Cette tendance s'inverse (majorité de *Thermoplasmatales*) quand l'échantillonnage se fait en novembre avec un régime alimentaire conditionné par le changement saisonnier du feuillage [141]. De la même manière qu'auparavant, il est très probable que ces archées déterminées comme des *Thermoplasmatales* (thermophiles aérobies) soient en fait des méthanogènes de l'ordre des *Methanomassiliicoccales*. Cette alimentation semble clairement déterminante pour le type de méthanogène rencontré, comme le révèle le microbiote intestinal de l'orang-outan (*Pongo abelii*) de Sumatra en Indonésie : celui-ci est le seul à présenter *Ms. stadtmanae* comme méthanogène dominant, très probablement du fait de la dégradation accrue de pectines de fruits chez les frugivores entraînant une augmentation des niveaux de méthanol, substrat de méthanogenèse de *Ms. stadtmanae* [142].

Chez le poulet, *Methanobrevibacter woesei* est le méthanogène le plus répandu dans le caecum (96,7 %) [143]. La présence de méthanogènes dans l'intestin des reptiles herbivores a été détectée notamment chez des iguanes en captivité. Les groupes les plus retrouvés sont également des membres de *Methanobacteriales* et des méthanogènes affiliés aux *Thermoplasmatales* [144, 145].

Notons néanmoins qu'une grande partie des séquences obtenues à partir des études mentionnées appartiennent à des méthanogènes non identifiés. De plus, les insectes sont également des porteurs importants de méthanogènes. C'est ainsi le cas des termites xylophages dont le rôle dans la production globale de méthane est loin d'être négligeable à l'échelle de la planète [146]. Récemment, des *Methanomassiliicoccales* y ont été mises en évidence [147]. Chez d'autres insectes, ont également été mis en évidence des méthanogènes. Pour exemple, le cafard abrite la *Methanosarcinale Methanomicrococcus blatticola* [148].

Chez l'Homme et jusqu'à la découverte des *Methanomassiliicoccales*, seules *Mb. smithii*, *Ms. stadtmanae* et *Methanobrevibacter oralis* avaient été identifiées [2]. La nouvelle lignée de méthanogènes *Methanomassiliicoccales* a été mise en évidence dans le laboratoire, sur la base de données de séquence du gène de l'ARNr 16S et du marqueur moléculaire de méthanisation, (*mcrA*) retrouvés dans les selles humaines [13]. Une étude plus détaillée est présentée dans le second chapitre.



TABLE I.1.3: Propriétés des groupes taxonomiques majeurs de méthanogènes

Ordre	Famille	Genre	Substrat de méthanogénèse	T (°C)	Habitat typique	
<i>Methanobacterales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	H <sub>2</sub> , (formate)	37-45	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce, sols marécageux, rumen	
		<i>Methanobrevibacter</i>	H <sub>2</sub> , formate	37-40	Tractus gastro-intestinal des animaux, fermenteurs anaérobies	
	<i>Methanothermobacter</i>	<i>Methanosphaera</i>	H <sub>2</sub> + méthanol	37	Tractus gastro-intestinal des animaux	
		<i>Methanothermobacter</i>	H <sub>2</sub> , (formate)	55-65	Fermenteurs anaérobies	
		<i>Methanothermus</i>	H <sub>2</sub>	80-88	Sources d'eau chaudes	
	<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i>	H <sub>2</sub> , formate	35-40	Sédiments marins
			<i>Methanothermococcus</i>	H <sub>2</sub> , formate	60-65	Sédiments marins de zones géothermales
		<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub>	80-85	Sédiments marins de zones géothermales
			<i>Methanotorris</i>	H <sub>2</sub>	88	Sédiments marins de zones géothermales
			<i>Methanosarcina</i>	(H <sub>2</sub> ), méthamines, Acétate	35-60	Fermenteurs anaérobies, sédiments marins, sédiments d'eau douce, rumen
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanococcoides</i>	méthamines	23-35	Sédiment marins	
		<i>Methanolobium</i>	méthamines	40-55	Sédiments de systèmes Hypersalins	
		<i>Methanolophilus</i>	méthamines	35-40	Sédiments de systèmes Hypersalins	
		<i>Methanobus</i>	méthamines	37	Sédiments de systèmes Hypersalins	
		<i>Methanomethylovorans</i>	méthamines	20-50	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce	
		<i>Methanimiticrococcus</i>	H <sub>2</sub> + méthamines	39	Tractus gastro-intestinales des animaux	
		<i>Methanosalsum</i>	méthamines	35-45	Sédiments de systèmes Hypersalins	
		<i>Methanoseta</i>	Acétate	35-60	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce	

Ordre	Famille	Genre	Substrat de méthanogénèse	T (°C)	Habitat typique
Methanomicrobiales		<i>Methanomicrobium</i>	H <sub>2</sub> , formate	40	Fermenteurs anaérobies, nappes phréatiques, rumen
		<i>Methanoculleus</i>	H <sub>2</sub> , formate	20-55	Fermenteurs anaérobies, sédiments marins, sédiments d'eau douce
	<i>Methanomicrobiaceae</i>			20-55	gisements de pétrole, sources d'eau chaude
		<i>Methanofollis</i>	H <sub>2</sub> , formate	37-40	Fermenteurs anaérobies
		<i>Methanogenium</i>	H <sub>2</sub> , formate	15-57	Sédiments marins, sédiments d'eau douce, riz non décortiqué, tractus gastro-intestinal des animaux
		<i>Methanolacinia</i>	H <sub>2</sub>	40	Sédiments marins
		<i>Methanoplanus</i>	H <sub>2</sub> , formate	32-40	Gisements de pétrole
		<i>Methanospirillum</i>	H <sub>2</sub> , formate	30-37	Fermenteurs anaérobies, sédiments marins
	<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i>	H <sub>2</sub> , formate	30-40	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce
		<i>Methanocalculus</i>	H <sub>2</sub> , formate	30-40	Gisements de pétrole
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub>	98	Sédiments marins de zones géothermales
<i>Methanomassiliicoccales</i>		<i>Methanomassiliicoccus</i>	H <sub>2</sub> + méthanol	37	Tractus gastro-intestinales
		<i>Methanometingylophilus</i>	H <sub>2</sub> + méthanol	37	Tractus gastro-intestinales



## CHAPITRE I.2

### ARCHÉES MÉTHANOGENÈS ET MICROBIOTE INTESTINAL HUMAIN

Les archées, très versatiles, colonisent de nombreux environnements différents. Chez l'Homme comme chez d'autres mammifères, leur présence ne se limite pas au seul microbiote intestinal, elles sont également détectées dans d'autres microbiotes associés aux muqueuses [2, 149, 13, 90]. Au niveau épidermique, peu d'archées semblent mises en évidence, et il y a apparemment une absence de méthanogènes. En effet, les premières études métagénomiques n'ont pas permis la détection d'archées au niveau de la peau humaine [150, 151, 152]. Leur présence n'a été signalée qu'en 2013, par une détection et une quantification basées sur le gène de l'ARNr16 S des archées. Celles-ci représentaient 4,2 % de l'ensemble du microbiome. La plupart des séquences analysées appartenaient au groupe des *Thaumarchaeota*, détectées grâce au marqueur *amoA* qui code pour le site actif de l'ammoniac monooxygénase [153]. Les *Thaumarchaeota* étant généralement trouvées dans le sol et les milieux aquatiques ainsi que dans les usines de traitement des eaux usées [154, 155], leur présence est considérée comme surprenante et soulève la question de l'action de l'ammoniac sur la peau. Ces archées pourraient avoir un rôle de protecteur cutané en influençant la régulation du pH. Par contre, des archées méthanogènes ont été identifiées, pour la première fois chez des sujets souffrant de vaginose bactérienne [156]. Par la suite, des analyses sur des sujets sains ont révélé la présence de près de 2 % d'archées dans des prélèvements vaginaux réalisés sur 12 femmes enceintes [157]. Leur présence a également été détectée chez des personnes saines dans des études plus récentes [158, 159].

C'est au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI) que les archées méthanogènes sont principalement présentes. Avant d'approfondir cet aspect, en particulier au niveau intestinal, signalons qu'elles peuvent être présentes dès la cavité buccale. Le microbiote oral de l'homme a été estimé à  $10^{11}$  cellules par grammes de contenu. L'acidité, les sécrétions buccales, le potentiel redox, la température ainsi que la nature de nutriments apportés permettent de maintenir un écosystème stable [150]. Cependant, la diversité des archées qui colonisent la cavité buccale reste très restreinte. La quantification par PCR quantitative à partir de prélèvements oraux de personnes de 38 à 86 ans montre que le méthanogène *Methanobrevibacter oralis* est le plus abondant [160]. Il présente une prévalence de 30 % (3/10) des individus sains. Une étude rétrospective menée par Nguyen-Hieu et al. (2013) sur l'ensemble des études portant sur la détection des archées à partir de MEDLINE et Pubmed montre des prévalences de *Mb. oralis* bien plus faibles avec seulement 6 % des sujets sains [161]. D'autres méthanogènes que les *Methano-*

*bacteriales* ont également été retrouvées. Il s'agit de méthanogènes décrits comme associées à la lignée des *Thermoplasmatales* [162], qui s'avèrent être des membres des *Methanomassiliicoccales* [83]. Elles sont présentes au niveau des plaques sous-gingivales humaines de patients atteints de parodontite. Cependant, les archées méthanogènes sont surtout connues pour coloniser les voies digestives basses et participent ainsi à l'activité du microbiote intestinal humain.

### 1.2.1 MICROBIOTE DIGESTIF HUMAIN

Le tractus digestif de l'Homme est l'hôte d'un grand nombre de bactéries, de virus, d'eucaryotes unicellulaires, et également d'archées.

#### 1.2.1.1 Diversité et distribution

Le microbiote intestinal humain est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière avec des fonctions essentielles à l'organisme. Il est constitué de  $10^{14}$  bactéries, soit 10 fois plus que les cellules présentes dans le corps humain [1] et représente environ 1,5 kg de matière [163]. Le microbiote intestinal présentent ainsi 70 % de tous les microbes présents dans le corps humain [164]. Les microorganismes qui le composent sont majoritairement des bactéries anaérobies strictes. Aujourd'hui, on dénombre la présence de 50 phyla bactériens avec une prédominance des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* qui constituent à eux seuls 90 % de la population, suivis principalement des *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* et *Cyanobacteria* [2]. Le nombre d'espèces différentes est difficile à appréhender et varie, selon les critères pris en compte, mais on peut considérer un total de 500 à 1000 espèces selon une vision consensuelle [165, 6].

Les microorganismes ne sont pas distribués de façon homogène dans le tractus digestif, à la fois de manière quantitative / qualitative, et de manière longitudinale / transversale. Ainsi, l'abondance microbienne varie et s'amplifie tout le long du tractus digestif, en particulier du fait de conditions physico-chimiques différentes : l'environnement acide de l'estomac ne permet la survie que de  $10^1$  bactéries par gramme de contenu, alors que  $10^3$  bactéries par gramme de contenu sont présentes au niveau du duodénum. Progressivement le microbiote atteint  $10^4$  à  $10^7$  bactéries respectivement dans le jéjunum et l'iléon, et il atteint une densité maximale au niveau du côlon avec environ  $10^{11}$  à  $10^{12}$  cellules par gramme de contenu [166]. Qualitativement, les populations microbiennes diffèrent également entre compartiments : l'intestin grêle est riche en *Bacilli*, *Firmicutes* et *Actinobacteria*, alors que le côlon comporte majoritairement des *Bacteroidetes* et des *Lachnospiraceae*. Les *Firmicutes* y sont également plus fréquents [165]. Au-delà de cette hétérogénéité longitudinale, la composition du microbiote varie également transversalement : l'épithélium intestinal est séparé de la lumière intestinale (le lumen) par une couche épaisse de mucus et chacune des populations microbiennes diffère entre la lu-

mière intestinale, l'interface lumière/mucus, l'intérieur du mucus et la proximité immédiate de l'épithélium [167] (Figure I.2.1).

#### I.2.1.2 *Ontogénie du microbiote digestif*

Le tube digestif du fœtus est considéré comme stérile et sa colonisation microbienne commence dès la naissance. Il dépend notamment du mode d'accouchement (voie basse avec colonisation par passage à travers les voies utérines ou césarienne [168]) et de l'environnement immédiat du nouveau-né [169, 170]. Il est également influencé par l'alimentation initiale (allaitement maternel ou de substitution) [171, 172, 173]. Au cours de la première année de vie, la composition microbienne de l'intestin reste relativement simple mais varie considérablement entre individus, notamment du fait des facteurs susmentionnés. Ce développement apparaît stochastique. Les premières colonisations se font par des bactéries anaérobies facultatives. Les principaux groupes bactériens rencontrés appartiennent à la famille des entérobactéries et aux genres *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* [174]. Ceci permet progressivement l'établissement d'un milieu de plus en plus réducteur et dépourvu d'oxygène, créant ainsi un environnement favorable à l'installation de microorganismes anaérobies stricts. Ce microbiote intestinal évolue continuellement, notamment avec les modifications alimentaires du nouveau-né. À partir de la première année, celui-ci se stabilise et sa composition se rapproche de celle du microbiote mature d'un jeune adulte [175, 176].

La composition du microbiote intestinal d'une personne saine est considérée comme stable avec une capacité de résilience face à des altérations temporaires. Des études récentes semblent également indiquer des modifications rapides de la composition du microbiote sous l'action de différents facteurs exogènes (modifications alimentaires [177]; traitements antibiotiques [178, 179]) qui, tout du moins dans ce dernier cas, ne s'accompagnent pas d'une résilience totale. Ces notions restent dépendantes du niveau de résolution avec lequel le microbiote est analysé. Cependant, il est admis que les variations interindividuelles sont telles qu'elles constituent une empreinte spécifique de l'hôte, liée à des dispositions génétiques [180], au régime alimentaire [181, 182], à l'environnement, aux traitements médicamenteux et à l'âge de l'individu (Figure I.2.2) [183].

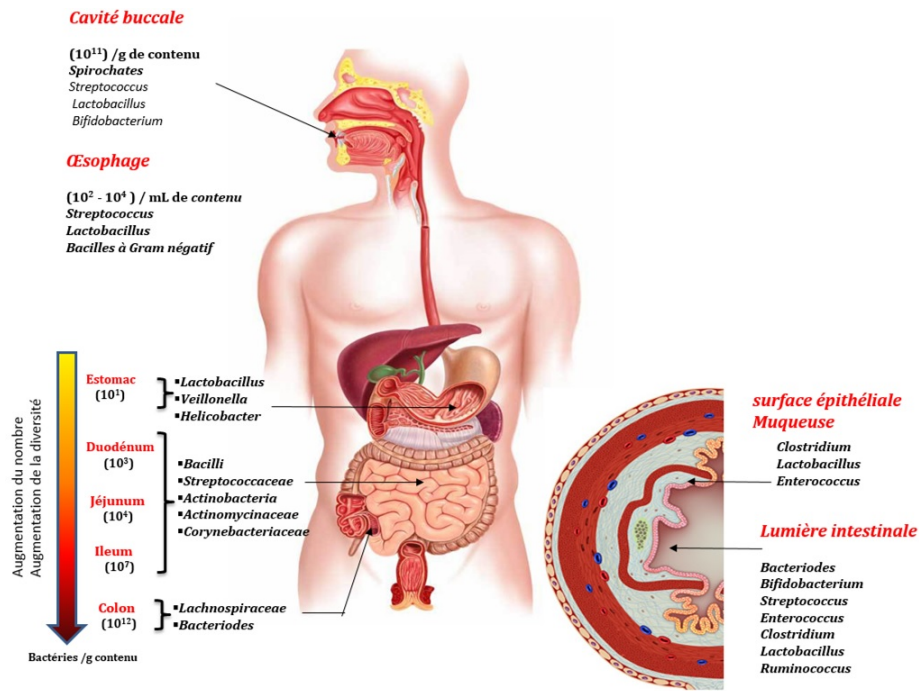


FIGURE I.2.1: Variations quantitative et qualitative de la composition du microbiote digestif

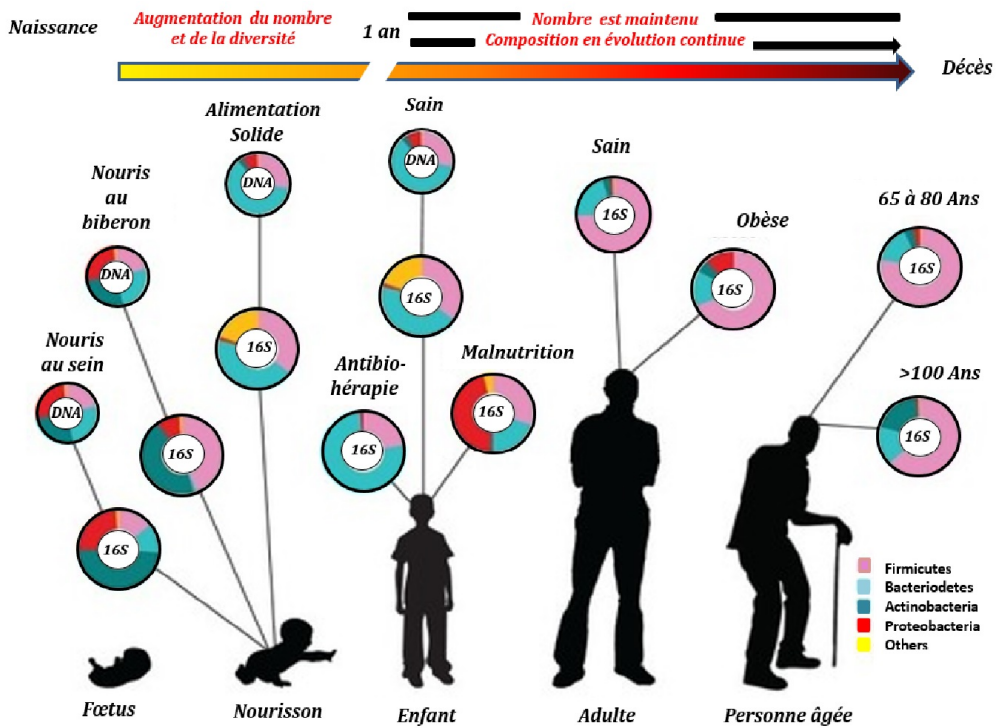


FIGURE I.2.2: Variation temporelle du microbiote intestinal

[183]

### 1.2.1.3 Fonctions du microbiote intestinal humain

Le microbiote revêt une importance capitale en assurant des fonctions essentielles pour l'hôte, principalement au niveau métabolique et pour son immunité.

#### 1.2.1.3.1 Maturation et développement de l'immunité dans la muqueuse intestinale

Le tractus gastro-intestinal (TGI) est la plus grande surface de contact avec l'environnement extérieur. Le tapis dense de microorganismes que constitue le microbiote présente une quantité importante d'antigènes aux cellules immunitaires résidentes. De ce fait, il stimule les récepteurs de reconnaissance des cellules épithéliales intestinales tels ceux de type TLR (Toll-like receptors) et NLR, (NOD-like receptors) [184]. La maturation du système immunitaire est le résultat d'une stimulation incessante par le microbiote intestinal. Alors qu'un déficit d'expansion des populations de lymphocytes est observé chez des souris dépourvues de microbiote (souris "germ free"), un phénotype normal est restitué par l'ajout de polysaccharide A (PSA) de *Bacteroides fragilis* [185]. Il a également été montré qu'une communauté microbienne complexe contenant une proportion importante de bactéries du phylum *Bacteroidetes* est nécessaire à la différenciation des cellules inflammatoires Th17 (effecteurs puissants d'inflammation) dans la lamina propria (LP) au niveau de l'intestin grêle. La différenciation de ces cellules a été associée à la présence de différents groupes bactériens de type *Cytophaga*, *Flavobacter* ou *Bacteroidetes* [186]. Ce constat met en évidence que la présence du tapis bactérien au niveau du TGI est nécessaire pour la maturation et l'éducation du système immunitaire.

La complexité des interactions entre l'hôte et le microbiote nécessite également une coopération entre composants du microbiote pour promouvoir le développement normal du système immunitaire de l'hôte. Par ailleurs, le système immunitaire muqueux doit être tolérant au microbiote pour éviter l'induction de réponses immunitaires excessives et nuisibles, tout en étant en mesure de contrôler la prolifération du microbiote intestinal pour empêcher sa translocation vers des sites systémiques. La prévention d'une réponse immunitaire excessive en réponse aux bactéries commensales est obtenue grâce à la combinaison de trois éléments : i) une séparation physique des bactéries et des cellules hôtes : Johansson et al (2008) ont montré que la couche de mucus recouvrant la muqueuse colique est divisée en deux niveaux, un inférieur dépourvu de bactéries, et un supérieur comportant les membres du microbiote intestinal [187], dynamique ; ii) la modification des fragments antigéniques présents au niveau du microbiote, les rendant moins immunogènes ; iii) une modulation de la réponse immunitaire de l'hôte basée sur la localisation, permettant au microbiote d'être préservé [188, 189]. Cette tolérance peut également être expliquée par la présence de cellules plasmiques résidant au niveau de la muqueuse intestinale qui produisent des IgA sécrétoires (IgAs) permettant le contrôle local de la charge microbienne au niveau du microbiote intestinal [190, 191].



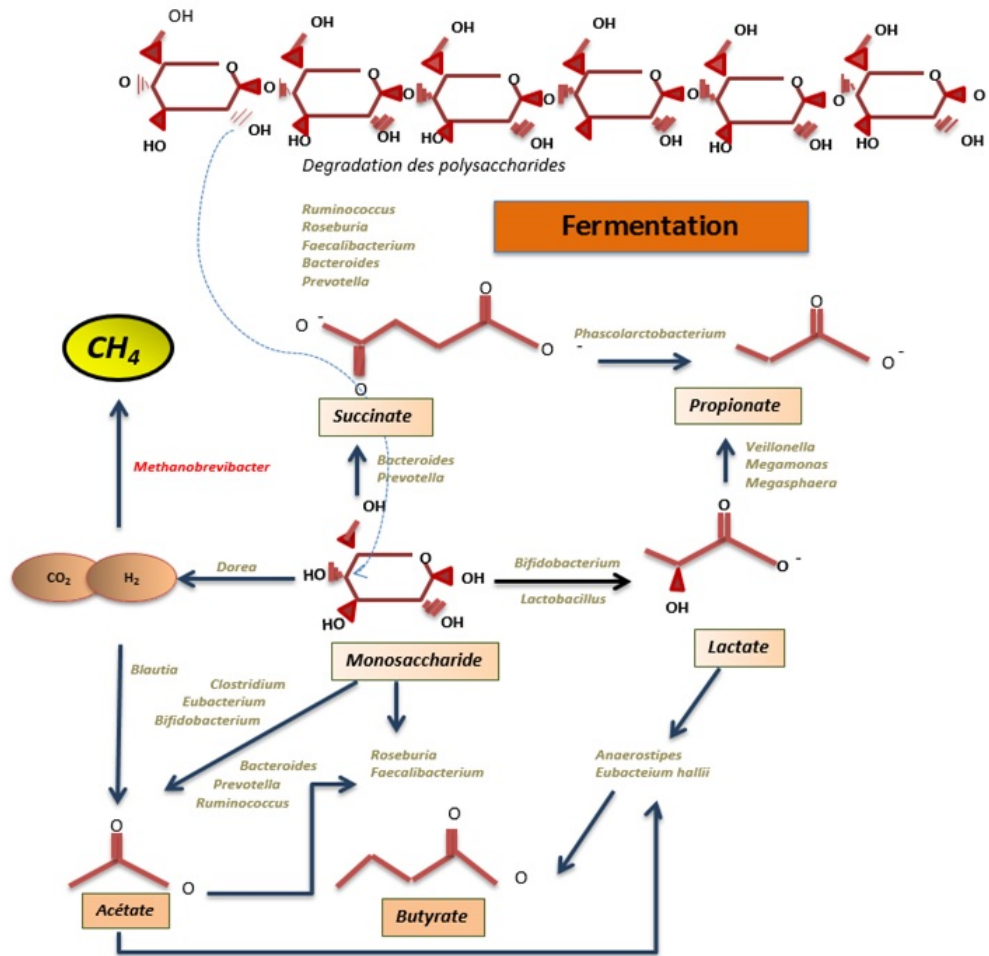


FIGURE I.2.3: Fermentation dans le tractus digestif

Les principales voies de fermentation des glucides ainsi que les acteurs principaux mis en évidence dans le TGI [192, 193].

### 1.2.1.3.2 Protection et effet barrière intestinale

Le microbiote intestinal constitue une barrière physique obstruant l'accès aux agents pathogènes grâce à plusieurs stratégies. En occupant des sites de fixation potentiels de pathogènes, le microbiote consomme les éléments nutritifs nécessaires à leur développement [194]. De plus, il produit des substances antimicrobiennes ou stimule leur production par l'hôte. Ainsi des peptides anti-microbiens produits dans le TGI ont pour rôle de contrôler la composition et la charge du microbiote intestinal. Ils agissent par rupture des structures de surface à la fois des bactéries pathogènes et des commensales [195, 196]. Le rôle protecteur de certaines souches a également été mis en évidence. Il s'agit de souches probiotiques, c'est-à-dire de micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels [197]. Ces souches, telles celles des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont souvent utilisées pour prévenir l'attachement et l'invasion de différentes bactéries pathogènes comme dans le cas d'une infection par *Listeria*. Elles modulent la réponse immunitaire des cellules épithéliales [198]. Certaines souches de *Lactobacillus* se sont également révélées réduire la colonisation *in vivo* des *E. coli* pathogènes via des composés sécrétés [199]. Elles produisent notamment de l'acide lactique qui inhibe la croissance de nombreuses bactéries et possèdent une activité antimicrobienne déstabilisant la membrane bactérienne externe [200].

### 1.2.1.3.3 Nutrition et métabolisme

Le potentiel métabolique du microbiote est 100 fois supérieur à celui de l'homme [1]. Ainsi, le microbiote intestinal est impliqué dans le métabolisme des composés alimentaires (fibres, acides aminés...). L'absorption des glucides simples et des protéines alimentaires hydrolysées en di- et tri-peptides se fait à l'entrée de l'intestin grêle. Les sucres complexes ainsi que les protéines et les peptides résiduels sont hydrolysés et fermentés au niveau du côlon, où le microbiote est le plus dense [201]. La dégradation des sucres complexes tels que la cellulose, l'amidon ou les xylanes est réalisée par les bactéries des genres *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Bacteriodes* ou encore *Prevotella* [202, 203]. Cette dégradation produit des monosaccharides qui seront facilement assimilés et fermentés par le microbiote. Des métabolites intermédiaires tels que le lactate ou le succinate, ainsi que l'ammoniaque sont ensuite formés parallèlement à des métabolites terminaux gazeux ( $H_2$ ,  $CO_2$  et  $CH_4$  principalement). Les hydrates de carbone non absorbés sont transformés en acides gras à chaîne courte (AGCCs), et c'est par cette production que s'exercent des propriétés essentielles pour l'hôte : il s'agit d'une part d'effets trophiques et de défense de la muqueuse intestinale, et d'autre part de rôles prophylactique et thérapeutique, notamment avec effets anti-diarrhéiques (Figure 1.2.3) [204, 205, 193]. Une fois produits, ils sont rapidement absorbés par la muqueuse colique (colonocytes) et contribuent à hauteur de 5 à 10 % des besoins énergétiques de l'hôte. Bien qu'elle ne constitue que 20-25 % des AGCCs produits par le microbiote intestinal, l'oxydation du butyrate représente la source énergétique principale des colonocytes (env. 70 %) [206]. Le butyrate présente également d'autres rôles pour l'hôte, notamment un effet trophique sur l'épithélium

de l'intestin. Il induit également une réponse immunitaire innée de l'hôte contre l'infection, peut inhiber la prolifération des cellules cancéreuses colorectales [207] et interviendrait dans des phénomènes de cicatrisation post-opératoire [208] ainsi que dans les néoplasies colorectales [209]. L'acétate, bien qu'étant l'AGCC majoritairement produit [210] n'est métabolisé qu'à hauteur de 50 % en acides gras à chaîne longue, glutamine et  $\beta$ -hydroxybutyrate [211]. Il est utilisé comme source d'énergie par les cellules de différents tissus d'organes tels que les reins et le coeur [212]. Le troisième AGCC majeur, le propionate, est métabolisé dans le foie. Il présente la propriété de réduire la carcinogénèse des tissus et d'inhiber la lipogénèse (synthèse hépatique du cholestérol) diminuant ainsi le taux de cholestérol circulant [213],(Figure I.2.3).

Contrairement à la fermentation, la putréfaction (dégradation des protéines) produit des molécules basiques, souvent toxiques tels que des composés aminés, de l'ammoniaque, des dérivés phénoliques, d'indoles, du scatole et de l'hydrogène sulfuré [193, 214, 205]. Certains acides aminés conduisent à la production d'AGCCs ramifiés, tels que l'isobutyrate, l'isovalérate et le 2 méthyl-butyrate [215]. Ainsi, leur détection parmi les AGCCs permet de mettre en évidence ce phénomène de putréfaction colique. Au final, la majorité de ces produits de putréfaction est digérée et dégradée dans le foie puis est excrétée dans les urines, ou éliminée dans les selles (Figure I.2.4).

Le microbiote est également capable de moduler l'absorption et le dépôt de lipides alimentaires [216] et adapte ainsi son métabolisme aux conditions intestinales selon la disponibilité des substrats, optimisant l'activité du TGI par l'utilisation des nutriments sélectifs [217]. Chez l'homme, il a été montré que le microbiote est capable de synthétiser la vitamine K de type ménaquinone (MK) ainsi que la plupart des vitamines B hydrosolubles, telles que la biotine, la cobalamine, les folates, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique, la pyridoxine, la riboflavine et la thiamine [218]. Contrairement aux vitamines alimentaires, qui sont absorbées dans la partie proximale de l'intestin grêle, l'absorption prédominante de ces produits microbiens a lieu dans le côlon [219]. Les MK sont produites le plus souvent par des bactéries à Gram positif tels que *Bacteroides fragilis* (MK-10, MK- 11 et MK- 12), *Eubacterium lentum* (MK-6), *Lactococcus lactis ssp. lactis* et *L. lactis ssp. cremoris* (MK-8 et MK-9) [220]. Les vitamines B sont produites plus particulièrement par certaines souches de *Bifidobacterium* [221, 222].

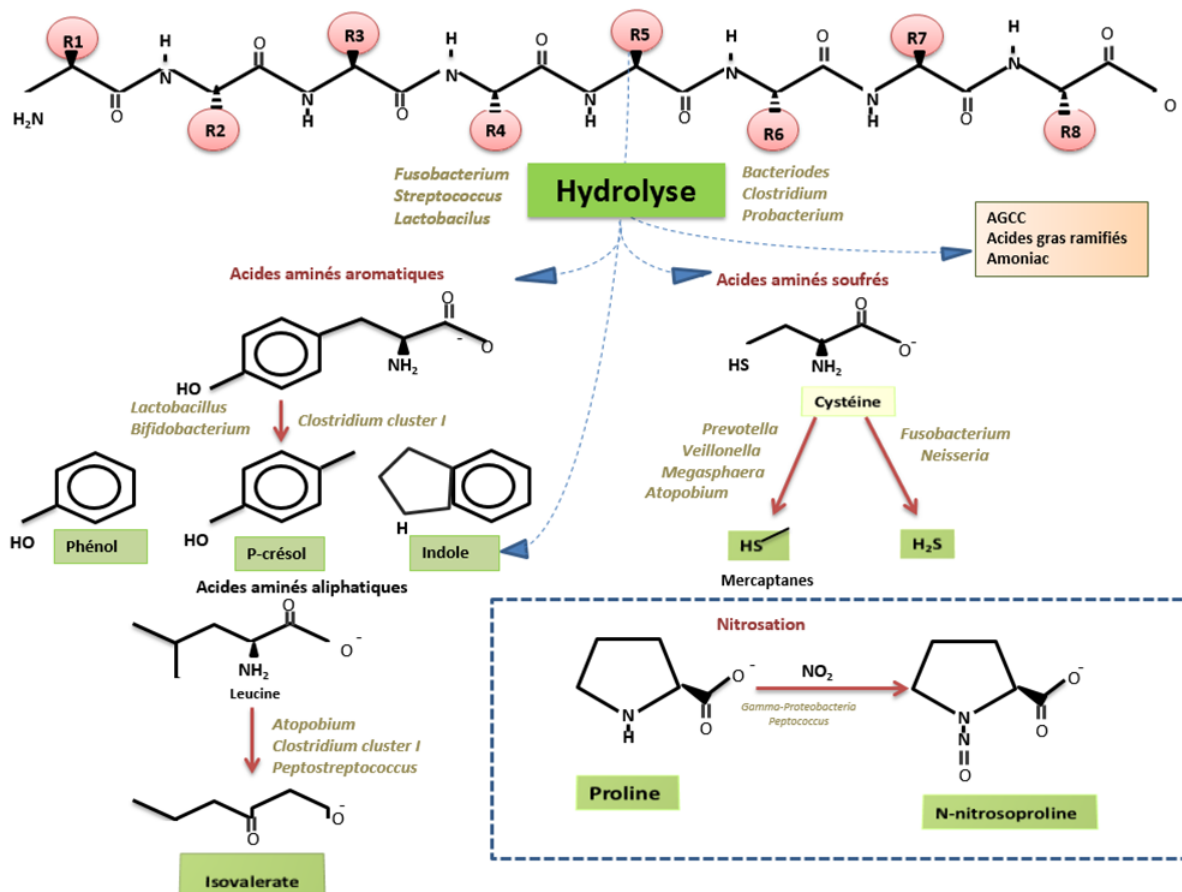


FIGURE I.2.4: Protéolyse dans le tractus digestif

Les principales voies de protéolyse ainsi que les acteurs principaux mis en évidence dans le TGI [192, 193].

## I.2.2 ARCHÉES MÉTHANOGENÈS DU MICROBIOTE INTESTINAL

### I.2.2.1 Outils de détection des archées méthanogènes dans le microbiote intestinal humain

Dans le chapitre précédent, nous avons pu constater que la diversité des méthanogènes est plus importante que celle attendue et qu'elle reste certainement sous-estimée, cela est également le cas dans l'environnement digestif humain, en partie entravée par les limites de la culture microbiologique et des méthodes moléculaires employées : au niveau moléculaire, ces techniques reposent sur des amplifications du gène de l'ARNr 16S ou des gènes clés tel que le gène *mcrA* spécifique aux méthanogènes. Il convient d'y adjoindre maintenant les techniques reposant sur le séquençage à haut débit. Des difficultés restent présentes, liées aux méthodes de détection et aux protocoles d'extraction d'acides nucléiques insuffisamment adaptés aux archées (parois cellulaires rigides, [223, 52]). Les archées peuvent également former des biofilms, notamment dans les selles, entraînant des biais dans les quantifications [224]. Cette mauvaise détection est également liée à l'utilisation d'amorces non spécifiques aux archées et qui souvent croisent avec l'ADN bactérien mais aussi humain, posant problème lors des détections dans des échantillons tels que les biopsies [225]. De nouvelles techniques, des mises aux points sur des protocoles ainsi que de nouveaux marqueurs moléculaires ont été proposés pour une meilleure détection de ces microorganismes. Or, la connaissance de cette diversité est un préambule nécessaire avant de pouvoir adresser la question de leur fonction dans le tube digestif de l'Homme. Dans la revue intitulée « Molecular methods for studying methanogens of the human gastrointestinal tract : current status and future directions », nous énumérons des techniques moléculaires mises en œuvre, leurs limites et biais, ainsi que les difficultés qui sont rencontrées. Nous décrivons les développements futurs possibles des approches afin d'étudier les communautés méthanogènes digestives, dont la faisabilité de certaines sont d'ores et déjà démontrées. Dans cet article, mon travail a plus particulièrement consisté à mettre en relief les différents gènes de la méthanogenèse qui ont /ou pourraient être ciblés pour la détection des méthanogènes. Dans cette revue, il est montré que la détermination du rôle des méthanogènes dans le tractus intestinal implique l'étude plus approfondie de la diversité méthanogène et de leurs relations avec d'autres groupes microbiens. Divers autres facteurs pourraient affecter les communautés microbiennes (génétique de l'hôte, régime alimentaire, âge,...) et nécessitent des études sur des populations bien caractérisées au niveau phénotypique et/ou génétique. Toutefois, les outils moléculaires et l'analyse des résultats obtenus peuvent générer de nombreux biais, et doivent donc être interprétés de manière critique. Par exemple, les études basées sur le séquençage de masse d'amplicons 16S omettent souvent la détection des archées, et l'affiliation taxinomique générée peut s'avérer fautive. Les approches dédiées aux seules archées ou aux seuls méthanogènes peuvent également engendrer des biais. Néanmoins, ces approches moléculaires basées sur l'analyse de l'ADN et des ARN sont actuellement les techniques qui apparaissent les plus fiables et les plus sensibles pour déterminer à la fois la diversité des archées méthanogènes et en déduire de possibles fonctions biologiques. La métagénomique offre des perspectives importantes en permettant la reconstruction de génomes complets. Le

stockage de données, leur mutualisation et les outils bioinformatiques permettant l'analyse de telles quantités de données restent cependant des facteurs limitants. Toutefois, les fonctions biologiques déduites demeurent putatives, les techniques culturales traditionnelles sont obligatoires et doivent être utilisées en conjugaison avec ces techniques bioinformatiques/moléculaires.

Une description plus détaillée de ces méthodes est donnée en annexe 2 , sous forme d'une revue publiée dans le journal « Applied Microbiology and Biotechnology ». (réf : Prem Prashant Chaudhary, **Nadia gaci**, Guillaume Borrel, Paul W. O'toole, Jean-François Brugère. Appl Microbial Biotechnol (2015) 99 :5801-5815

#### 1.2.2.2 Diversité et rôle des archées méthanogènes digestives humaines

La plus grande diversité des archées est localisée au niveau intestinal. Les premières études ont permis de mettre en évidence la nette prédominance de *Mb. smithii*. Cette *Methanobacteriale* fut la première archée isolée de selles humaines [226], suivie peu de temps après par l'isolement de *Ms. stadtmanae*, une autre *Methanobacteriale* [227] présente chez un tiers de la population [228, 17]. Ces archées méthanogènes sont des acteurs clés dans la physiologie métabolique intestinale. Elles augmentent le rendement des fermentations coliques en diminuant la quantité / la pression partielle d'H<sub>2</sub> de par leur hydrogénotropie [229]. De plus, des synergies ont pu être montrées pour l'utilisation (hydrolyse / fermentation) de fibres avec *Bacteroides thetaiotaomicron* [230]. Ceci montre une adaptation de ces archées à l'environnement digestif, également visible à d'autres niveaux par analyse de leurs génomes. Ainsi, l'analyse génomique et transcriptomique de *Mb. smithii* (quand celle-ci a été utilisée en co-culture avec *B. thetaiotaomicron* pour coloniser le TGI de souris gnotobiotiques) a démontré la présence d'un panel de systèmes d'adaptation tels qu'une expression régulée des protéines d'adhésion et la production à sa surface de glycanes, semblables à ceux trouvés dans la muqueuse intestinale [231, 232]. *Ms. stadtmanae* présente également des adaptations à l'habitat intestinal humain, telles que la capacité génétique à synthétiser les antigènes de surface [89]. Plus récemment, le groupe des méthanogènes digestifs s'est agrandi et de nouveaux représentants très différents ont été découverts [233, 13, 17, 90]. C'est d'ailleurs à partir de selles humaines qu'a pu être permise l'identification d'un nouvel ordre méthanogène, connu aujourd'hui sous le nom de *Methanomassiliicoccales* ou septième ordre méthanogène [13, 90, 147, 83, 80] . Des représentants de cet ordre sont principalement rencontrés chez les personnes âgées (25 à 30 %), et sont également présents chez l'adulte, cependant avec une prévalence apparente plus faible [17, 234]. La revue qui suit, publiée dans le journal « World Journal of Gastroenterology » dresse un tableau plus précis des connaissances de la diversité des archées, retrouvées dans le TGI humain. Il présente une étude de la diversité de ces microorganismes, qui vont au-delà des seules archées méthanogènes. À cette étude des connaissances bibliographiques sur le sujet, sont également ajoutées des résultats préliminaires issues de données génomiques sur les archées méthanogènes du TGI. Ceci comprend notamment deux génomes de *Methanomas-*

*siliicoccales* non isolées, *Candidatus Methanomethylophilus alvus* et *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis* [91, 83], en plus de celui de *Mmc. luminyensis*, seule souche isolée jusqu'à présent [90] et celui de diverses souches de *Mb. smithii*. Ces données permettent d'imaginer de nouveaux rôles possibles pour les archées dans l'intestin.



WJG 20<sup>th</sup> Anniversary Special Issues (17): Intestinal microbiota

## Archaea and the human gut: New beginning of an old story

Nadia Gaci, Guillaume Borrel, William Tottey, Paul William O'Toole, Jean-François Brugère

Nadia Gaci, William Tottey, Jean-François Brugère, EA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Guillaume Borrel, Paul William O'Toole, School of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Cork, Ireland

**Author contributions:** Gaci N and Borrel G contributed equally to this work; Gaci N compiled the data concerning methanogens and several human diseases; Borrel G compiled information about the available genomics data and analyzed the presence of the genes coding MtaA, MtaB, MtaC and BSH; Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW and Brugère JF wrote the paper.

**Supported by** PhD Scholarship from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (To Nadia Gaci); Science Foundation Ireland through a postdoctoral grant of the Alimentary Pharmabiotic Centre (to Guillaume Borrel); PhD Scholarship of the European Union (UE) and the Auvergne Council (FEDER) (to William Tottey); Science Foundation Ireland through a Principal Investigator award and by an FHRI award to the ELDERMET project by the Department Agriculture, Fisheries and Marine of the Government of Ireland (to Paul W O'Toole)

**Correspondence to:** Jean-François Brugère, PhD, EA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, 28 Place Henri Dunant, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France. [jf.brugere@udamail.fr](mailto:jf.brugere@udamail.fr)

Telephone: +33-473-178391 Fax: +33-473-178392

Received: March 13, 2014 Revised: May 14, 2014

Accepted: July 22, 2014

Published online: November 21, 2014

## Abstract

Methanogenic archaea are known as human gut inhabitants since more than 30 years ago through the detection of methane in the breath and isolation of two methanogenic species belonging to the order Methanobacteriales, *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospaera stadtmannae*. During the last decade, diversity of archaea encountered in the human gastrointestinal tract (GIT) has been extended by sequence identification and culturing of new strains. Here we provide an updated census of the archaeal diversity associated

with the human GIT and their possible role in the gut physiology and health. We particularly focus on the still poorly characterized 7<sup>th</sup> order of methanogens, the Methanomassiliicoccales, associated to aged population. While also largely distributed in non-GIT environments, our actual knowledge on this novel order of methanogens has been mainly revealed through GIT inhabitants. They enlarge the number of final electron acceptors of the gut metabolites to mono- di- and trimethylamine. Trimethylamine is exclusively a microbiota-derived product of nutrients (lecithin, choline, TMAO, L-carnitine) from normal diet, from which seems originate two diseases, trimethylaminuria (or Fish-Odor Syndrome) and cardiovascular disease through the pro-atherogenic property of its oxidized liver-derived form. This therefore supports interest on these methanogenic species and its use as archaeobiotics, a term coined from the notion of archaea-derived probiotics.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key words:** Human gut microbiota; Methanogens; Methanomassiliicoccus; Methanomethylphilus; Trimethylaminuria; Trimethylamine; Methane; Cardiovascular disease; Archaeobiotics; Probiotics

**Core tip:** Archaea are naturally occurring components of the human gut microbiota, whose biological significance has been recently reevaluated. In this review, an update of the current knowledge about the archaea from the human gut is provided, integrating the new order of methanogens, Methanomassiliicoccales. By its particular metabolism, this lineage is likely a depleting biological agent of a gut microbiota metabolite from diet implied in cardiovascular disease and trimethylaminuria, trimethylamine. The recent provocative proposal of archaea as a new class of probiotics (archaeobiotics) should focus the interest on the third domain of life concerning the gut physiopathology and human health.

Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF. Archaea



and the human gut: New beginning of an old story. *World J Gastroenterol* 2014; 20(43): 16062-16078 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i43/16062.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16062>

## INTRODUCTION

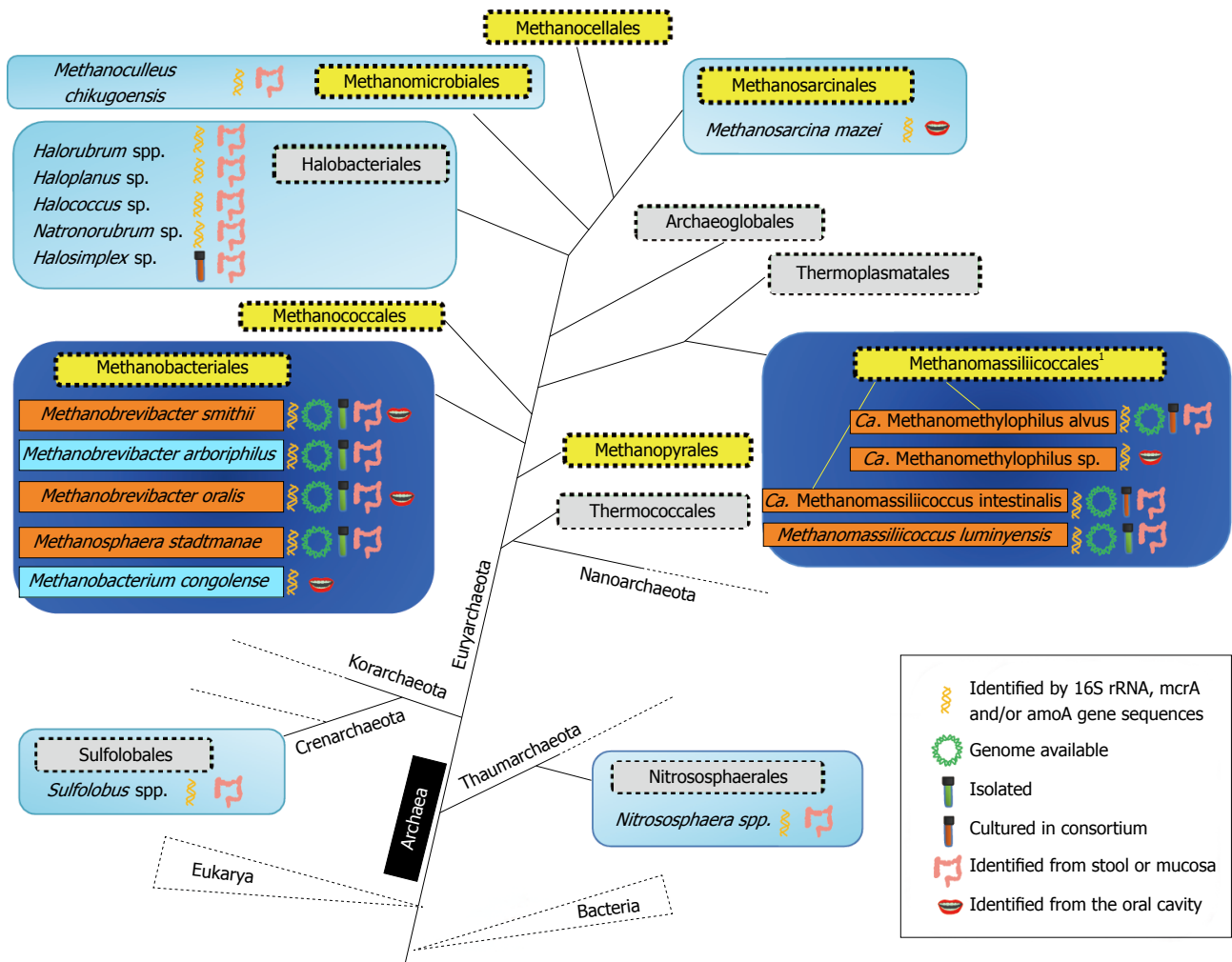
Archaea are unicellular microorganisms which have long been seen as “extreme bacteria”. However, although some are indeed extremophiles (*e.g.*, hyperthermophiles, hyperacidophiles and hyperhalophiles), it is now clear that a large part of them are mesophiles and widespread in the environment<sup>[1,2]</sup>. They form a separate branch of life, the domain Archaea, alongside of the two other domains: Eukarya and Bacteria<sup>[3]</sup>. It has recently been suggested that eukaryotes have appeared within the domain Archaea<sup>[4]</sup>, which nevertheless remains controversial<sup>[5]</sup>. The domain Archaea includes a wide variety of organisms that share properties with both bacteria (various morphologies: coccus, spirillum, bacillus or irregular shapes, presence of a single circular chromosome, lack of introns, similar post-transcriptional modifications) and eukaryotes (similar molecular machinery for DNA replication, RNA transcription and protein translation, presence of histones for chromosomal DNA packaging)<sup>[6]</sup>. It also presents unique characteristics such as lack of peptidoglycan in the cell wall, when present and membrane formed by L-glycerol ethers/isoprenoids chains instead of D-glycerol esters/fatty acids as in the two other domains<sup>[7-9]</sup>. Some of these archaea have a unique and particular metabolism, the methanogenesis. Methanogenic archaea are strict anaerobes that occur in a large range of environments, such as freshwater<sup>[10]</sup> and marine<sup>[11]</sup> sediments, soils<sup>[12,13]</sup> and the gut of numerous animal species<sup>[14,15]</sup>, including humans<sup>[16-18]</sup>. Their physiology and ecology is widely studied for their intrinsic capacity to produce methane which is both an energy source (biogas) in bioreactor<sup>[19]</sup> and a greenhouse gas emitted from natural and anthropic environments, including livestock<sup>[20,21]</sup>. As a recurrent component of the human digestive tract, impact of archaea<sup>[22]</sup> and more particularly methanogens<sup>[23,24]</sup> on human health have been questioned for many years.

Notwithstanding the fact that archaea are also identified in the oral microbiota of human (see<sup>[25]</sup> for a recent review), this article mainly focuses on methanogenic and non-methanogenic archaea in the gut. A concise description of methanogenesis and of the two Methanobacteriales, *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*) and *Methanosphaera stadtmanae* (*M. stadtmanae*) whose occurrence in the human gut is known since three decades is given. In a second part the current knowledge about the archaeal diversity in our gut is presented from recent studies, and a more detailed focus is made on a newly described order of methanogens, the Methanomassiliicoccales, for which physiological and genomics data from human-retrieved strains are now available. Finally we display a census of

the investigated relationships between methanogens and the physiological state of their human host, with a focus on the age relationships, and we discuss the putative implications of the representatives of the Methanomassiliicoccales for human health.

## METHANOGENS, METHANOGENESIS AND THE DIGESTIVE TRACT

Until recently, methanogens were organized into 6 orders (Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanopyrales, Methanocellales) (filled square yellow boxes in Figure 1), all belonging to the phylum Euryarchaeota. A 7<sup>th</sup> order of methanogens phylogenetically related to the Thermoplasmatales was recently proposed on the basis of sequences retrieved from human gut<sup>[26,27]</sup>. Two names were subsequently proposed, Methanoplasmatales<sup>[28]</sup> and Methanomassiliicoccales<sup>[29]</sup>, the latter being now validated by the International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP)<sup>[30]</sup> (Figure 1). Methanogenesis is coupled to different energy conservation systems and represents the sole energetic metabolism of methanogens. For this metabolism, methanogens could only use a limited number of substrates originating from the anaerobic degradation of the organic matter by hydrolytic and fermentative bacteria<sup>[31]</sup>. Methanogens have therefore a terminal position in the microbial trophic chains. According to the metabolic classification used today, one can define the hydrogenotrophic, methylotrophic and acetotrophic (or acetoclastic) class of methanogenesis<sup>[31]</sup>. Most of the methanogens are hydrogenotrophs that use H<sub>2</sub> (and often formate) to reduce CO<sub>2</sub> into methane<sup>[32]</sup>. The methylotrophic methanogens use methylated compounds such as methanol, methylamines and methyl-sulfides, converting the methyl group of these compounds into CH<sub>4</sub> with substrate-specific methyltransferases<sup>[33]</sup>. Reducing equivalents for this methanogenesis are obtained by an additional oxidation of a methyl group into CO<sub>2</sub> through the methyl-oxidation pathway, corresponding to the first steps of the hydrogenotrophic pathway operating in reverse. A variant of this pathway consists in the direct use of H<sub>2</sub> present in the environment as an electron donor, instead of the reducing equivalents produced by the methyl-oxidation pathway. Interestingly, the methanogens restricted to this variant were found to be associated to gut environments (see below). Finally, few archaea affiliated to the Methanosarcinales are able to use acetate as substrate for methanogenesis<sup>[34]</sup>. The methyl-coenzyme M reductase (MCR I or MCR II isoenzyme), responsible for the formation of CH<sub>4</sub> from CH<sub>3</sub>-S-CoM and H-S-CoM, is shared by all methanogens. The alpha-subunit of this enzyme, encoded by *mcrA* (or *mrtA* for the isoenzyme MCR II), is considered as a functional marker of methanogens and is widely used for their specific detection by molecular approaches<sup>[35]</sup>. Owing to the congruence between *mcrA* and 16S rRNA genes based phylogenies<sup>[36]</sup>, *mcrA* is also used to investigate the



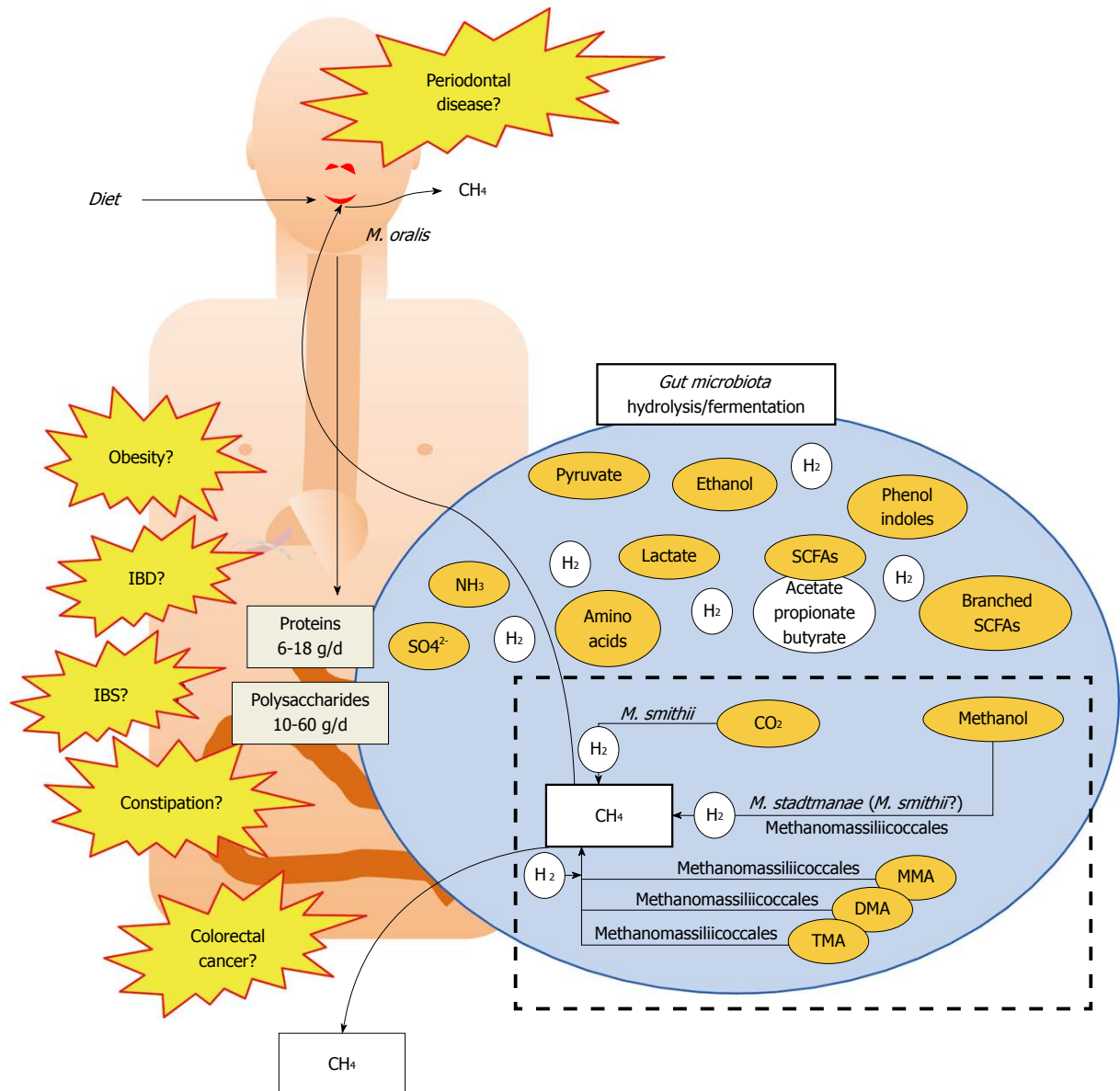
**Figure 1** Archaeal representatives associated to the human digestive tract. A simplified phylogeny of the Archaea (adapted from<sup>[89,148]</sup>) is shown. Taxonomic orders are drawn in filled square boxes, those composed of methanogens in yellow and others in light grey. Orders in which some members have been found in the human digestive tract are indicated in light blue boxes when identified by sequences derived from nested-PCR (or deep sequencing on low yield amplifications for *Nitrososphaera* spp.) or a limited number of studies, and other are indicated in dark blue boxes in which abundant and recurrently reported species are mentioned in orange boxes or light blue when observed from limited number of studies. For the Methanomassiliococcales<sup>(1)</sup>, also referred as Methanoplasmatales in the literature, the repartition of *Methanomassiliococcus* spp. and *Ca. Methanomethylphilus* spp. in two different clades is highlighted by yellow branches (see the text for details).

affiliation and phylogenetic diversity of methanogens in various environments, including the human GIT<sup>[26,27,37-39]</sup>. The digestive tract of animals and especially of ruminants harbors a large variety of methanogens<sup>[40]</sup> with the different types of methanogenesis (hydrogenotroph, methylotroph and acetotroph), even though acetoclastic methanogenesis is considered to be a minor pathway in rumen<sup>[41]</sup> and acetoclastic methanogens were never detected in the human distal gut.

In humans, methanogenesis is mainly H<sub>2</sub>-dependent, for the reduction of CO<sub>2</sub> and for the reduction of methyl-compounds: this H<sub>2</sub> depletion optimizes the fermentation and modifies the metabolic pathways of fermentative bacteria<sup>[17]</sup>. This role is shared with two other types of hydrogenotrophic microorganisms, the reductive acetogenic bacteria (e.g., *Ruminococcus* spp.<sup>[42]</sup>) and the sulfate-reducing bacteria (e.g., *Desulfovibrio* spp.<sup>[43]</sup>). Hydrogenotrophic methanogenesis from CO<sub>2</sub> efficiently decreases the gas partial pressure in the colon by consuming 4 moles of

H<sub>2</sub> and 1 mole of CO<sub>2</sub> to produce 1 mole of CH<sub>4</sub>. The Figure 2 shows the role of the gut methanogens (white filled box) in the overall gut metabolism of nutrients (blue circle).

Specific tests have been developed, such as the “breath-test”<sup>[16]</sup>, in which the presence of methane in breath is synonymous to the presence of methanogenic archaea in the gut (usually after a lactose challenge test). It was determined that the detection of more than 1 ppm of methane in breath *vs* atmospheric concentration (lowest detection capacity) reflects the minimum presence of 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> methanogens per gram of stool<sup>[44,45]</sup>. Using this test, the human population may be divided into two different groups: the methane-producers and the non-methane-producers. A review of the studies based on the methane breath test has stressed the high variability of the prevalence of methane producers in different geographic and ethnic populations<sup>[23]</sup>, ranging from 34% to 87%, with level above 70% observed in rural African



**Figure 2** Simplified representation of the role of methanogens in the gut microbiota metabolism and possible association with diseases. Diet leads to proteins and polysaccharides that enter the gut where they are metabolized by the hydrolytic and fermentative bacteria present in the gut (large blue circle). This produces various compounds (some important being indicated in orange circles), and large amounts of H<sub>2</sub>, which in turn inhibit the fermentation processes. H<sub>2</sub> partial pressure is lowered by hydrogenotrophs, three different types being present in the gut (sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens). Here, only the methanogens are shown, which are either able to use CO<sub>2</sub>, methanol, or methyl-compounds [monomethylamine (MMA); dimethylamine (DMA) and trimethylamine (TMA)] reduced by hydrogen to form methane, found in breath and flatulence. A highlight on the TMA use is given in Figure 3. The presence of methanogens in the mouth is also indicated. Altogether, the presence of methanogens has been linked to several diseases (in yellow) but these remains to be clarified (see Table 2 for further explanations).

populations<sup>[46-48]</sup>.

## M. SMITHII, THE DOMINANT HUMAN GUT METHANOGEN

### Metabolism and adaptations

From the 80s to very recently, only 2 different archaeal species belonging to Methanobacteriales have been identified and isolated from the human gut microbiota, *M. smithii*<sup>[49]</sup> and *M. stadtmanae*<sup>[50]</sup> (formerly named *M. stadtmaniae*). These archaea have a different metabolism

of methanogenesis, *M. smithii* using H<sub>2</sub> (or formate) to reduce CO<sub>2</sub> and *M. stadtmanae* using H<sub>2</sub> to reduce methanol. *M. smithii* is able to colonize the human GIT at least from the cecum to the rectum<sup>[39,51,52]</sup>. Pyxigraphic sampling on 6 individuals and quantification by culture-based approaches has suggested that *M. smithii* preferentially colonizes the distal colon<sup>[51]</sup>. A recent qPCR-based quantification of the hydrogenotrophic microbes associated to the colonic mucosa did not report significant changes in the abundance of methanogens along the colon<sup>[39]</sup>. However, this study also reports that the methanogens would represent a larger proportion of

Table 1 Available genomics data (GenBank, March 2014) from methanogens of the human gut

Species	Strain (DSMZ collection number)	Status <sup>1</sup>	Size (Mb)	GC%	<i>mta</i> <i>ABC</i>	BSH gene	Accession number	Genome reference
Methanobacteriales								
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	PS (DSM 861)	Chromosome	1.85	31.0	1	1	CP000678.1	[54]
	F1 (DSM 2374)	Scaffolds	1.73	31.3	0	1	ABYV000000000	[126]
	ALI (DSM 2375)	Scaffolds	1.71	31.3	1	1	ABYW000000000	[126]
	TS145A	Contigs	1.78	31.1	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AEKU000000000	[55]
	TS145B	Contigs	1.80	31.1	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELL000000000	
	TS146A	Contigs	1.79	31.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELM000000000	
	TS146B	Contigs	1.79	31.1	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELN000000000	
	TS146C	Contigs	1.95	31.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELO000000000	
	TS146D	Contigs	1.71	31.1	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELP000000000	
	TS146E	Contigs	1.95	30.4	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELQ000000000	
	TS147A	Contigs	2.01	30.5	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELR000000000	
	TS147B	Contigs	1.97	30.4	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELS000000000	
	TS147C	Contigs	1.97	30.4	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELT000000000	
	TS94A	Contigs	1.89	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELU000000000	
	TS94B	Contigs	1.89	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELV000000000	
	TS94C	Contigs	1.91	30.3	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELW000000000	
	TS95A	Contigs	1.99	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELX000000000	
	TS95B	Contigs	1.97	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELY000000000	
	TS95C	Contigs	1.98	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AELZ000000000	
	TS95D	Contigs	2.01	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AEMA000000000	
TS96A	Contigs	1.98	30.3	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AEMB000000000		
TS96B	Contigs	1.87	30.2	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AEMC000000000		
TS96C	Contigs	1.82	31.1	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	AEMD000000000		
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	ANOR1	Scaffolds	2.22	25.5	1 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	CBVX000000000	[83]
<i>Methanobrevibacter oralis</i>	JMR01	Scaffolds	2.11	27.8	2	2	CBWS000000000	[63]
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	(DSM 3091)	Chromosome	1.77	27.6	4	1	CP000102	[58]
Methanomassiliococcales								
<i>Methanomassiliococcus luminyensis</i>	B10 (DSM 25720)	Contigs	2.62	60.5	3 <sup>3</sup>	0	CAJE000000000	[88]
<i>Ca. Methanomassiliococcus intestinalis</i>	Issoire-Mx1	Chromosome	1.93	41.3	3 <sup>3</sup>	0	CP005934	[87]
<i>Ca. Methanomethylophilus alvus</i>	Mx1201	Chromosome	1.67	55.6	1 <sup>3</sup>	1	CP004049	[86]

<sup>1</sup>As given by genbank, March 2014; <sup>2</sup>Original analysis from this work: a tblasn of the protein sequence of *mtaA* (YP\_447810), *mtaB* (YP\_447248), *mtaC* (YP\_447249) and the BSH (Bile Salt Hydrolase) gene (YP\_447796) from *Methanosphaera stadtmanae* on the draft genome sequence of *Methanobrevibacter arboriphilus* ANOR1, *Methanobrevibacter oralis* JMR01 and *Methanobrevibacter smithii* strains from<sup>[55]</sup>. <sup>3</sup>Numbers of *mtaBC* genes detected, homologues of *mtaA* genes are also present in the 3 Methanomassiliococcales genomes but their specific implication in either methanol and/or methylamines utilization pathways has not yet been determined.

the hydrogenotrophic microbes in the rectum than in the left and right colon<sup>[39]</sup>. Several important adaptations of *M. smithii* to the human gut environment have been described, using genomics and transcriptomics<sup>[53-57]</sup>. In a humanized gnotobiotic mouse model, *M. smithii* was shown to adapt its gene expression in presence of a dominant gut microbe, *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. thetaiotaomicron*), and to modify the metabolic pathways of this bacteria<sup>[53]</sup>. *M. smithii* strains have also the property to produce glycans mimicking those found in the gut<sup>[54]</sup> and possess a large diversity of adhesion-like proteins whose substrate-related regulation suggests adaptive answers to different niches in the gut<sup>[55]</sup>. *M. smithii* and *M. stadtmanae* have gene to cope with the presence of bile acid, notably the bile acid salts hydrolase gene (BSH)<sup>[54,58]</sup>, with likely a bacterial origin<sup>[59]</sup>. Over 15% of the coding genes of these two species might have been transferred from bacteria, with a large contribution of Firmicutes, a dominant bacterial lineage in the gut<sup>[56,57]</sup>. The putative gut origin of these genes is supported by the observation that 20 of the 22 bacterial OTUs found to be positively associated to *M. smithii* in 136 subjects were affiliated to the Fir-

micutes<sup>[55]</sup>. Several of these genes are involved in transport and surface function and could have facilitated the adaptation of *M. smithii* and *M. stadtmanae* to human GIT environment. *M. smithii* was also shown to be efficient in competition for the nitrogenous nutrient pool<sup>[54]</sup> and have the capacity to use several end-products derived from organic matter degradation in the gut<sup>[54]</sup>. In regard to this last aspect, it is interesting to quote that almost all sequenced human GIT associated methanogens possess the genes *mtaABC* encoding methyl-transferases required for methanol utilization (this study, see Table 1 and below), highlighting the importance of this metabolism for gut methanogens. In the case of *M. stadtmanae*, it is clear that these genes are involved in methanogenesis<sup>[58]</sup>, but their role remains less clear for *Methanobrevibacter* spp.

*M. smithii* does not only occur in the distal gut, but also sparsely in the oral cavity<sup>[60]</sup> and the vagina<sup>[61]</sup>. In the oral cavity, methanogenic archaea are dominated by a third species, *Methanobrevibacter oralis* (*M. oralis*), isolated in the mid 90<sup>[62]</sup> and whose genome was recently sequenced<sup>[63]</sup>. This species have attracted a great attention because its occurrence is strongly related to periodonti-



tis<sup>[24]</sup>. While *M. smithii* and *M. oralis* are phylogenetically close (their 16S rRNA gene share 98% identity), they are clearly specialized on gut and oral cavity, respectively. One aspect of this specialization is supported by the presence of a bile salt hydrolase gene in all sequenced *M. smithii* species but not in the genome of *M. oralis* (this study, see Table 1). Another aspect might rely on the versatility of these two species, *M. oralis* lacking the *mtaABC* genes present in almost all other *M. smithii* strains. Moreover, *M. oralis* is able to reduce CO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub> but not formate for methanogenesis, a difference compared to *M. smithii*<sup>[62]</sup>. Obviously their niche partitioning is probably under dependence of other properties, notably those favoring *M. oralis* over *M. smithii* in the mouth, which will require further investigations.

### Prevalence in the population

In a large analysis of three different individuals gut bacteria and archaea, with samples from different segments of the intestine and feces (cecum; ascending, transverse, distal and sigmoid colon), the cloning/sequencing of 16S rRNA genes<sup>[52]</sup> revealed the presence of archaea in 2 of the 3 individuals. Of the 1534 archaeal clones, all the sequences corresponded to *M. smithii*. This agrees with previous culture-dependent studies<sup>[45,47]</sup> and subsequent culture-independent studies indicating *M. smithii* is the most prevalent and abundant methanogen in the human gut<sup>[26,27,37,44,64]</sup>. Recent metagenomics studies support also this predominance<sup>[65-68]</sup>, even if this kind of studies is prone to difficulties and limitations to correctly attribute nucleic sequences to species: it necessitates more particularly referenced genomes, data that are not always available at the species level for archaea from the gut. The gut microbiota shotgun metagenomics analysis performed on 96 healthy Russian adults indicated that there were variations among individuals, and among populations<sup>[69]</sup>, therefore confirming results from methane breath-tests mentioned above<sup>[23,48,70,71]</sup>: *M. smithii* was the second and third most prevalent prokaryotic species in the microbiota in two of the 96 Russian adults (representing between 11% and 14%), and more globally, Russian adults showed generally a higher level of *M. smithii* than Chinese, Danish and US people, while being lower compared to the Amerindian group<sup>[69]</sup>. Based on a modified method of DNA extraction, Dridi *et al.*<sup>[64]</sup> reported that 95.7% of 700 individuals tested by qPCR were positive for *M. smithii*. However, subsequent studies performed with the same method reported lower levels with 75%-89%<sup>[72]</sup> and 64%<sup>[73]</sup> of individuals positive to *M. smithii*.

Therefore, it seems that *M. smithii* is found in more than 50% of the adult population, forming a highly prevalent microbe of the gut, but remains undetected in some people. Whether the lack of detection is due to a real absence or of a technical threshold remains still unclear, but it is conceivable that the methanogens present at low abundance in some individuals have likely a very low physiological incidence. *M. stadtmanae* shows a lower

prevalence: it has been found approximately in 1 people on 3 to 5 (32.6%<sup>[74]</sup> and 17%-25%<sup>[27]</sup> of the population).

## RECENT EXPANSION OF THE ARCHAEL DIVERSITY ASSOCIATED WITH THE HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT

The advent of molecular methods<sup>[75,76]</sup> has greatly improved our knowledge of the gut microbiota composition. As for bacterial populations, studies based on culture-independent approaches have largely participated to the identification of novel archaeal phylotypes associated to the human GIT. During the last decade, gene sequences retrieved from human oral cavity, colonic mucosa or feces have been affiliated to several taxonomic orders shown in light and dark blue boxes in Figure 1: they represent 1 order within Crenarchaeota and Thaumarchaeota, and 5 within the Euryarchaeota, showing that 3 of the 5 archaeal phyla are represented in the human GIT.

### Large diversity of archaea occurring likely at a low abundance

A set of sequences closely related to *Sulfolobus* species of the phylum Crenarchaeota was obtained by nested PCR on feces of 4 adults<sup>[77]</sup>. Colonization of the gut by these archaea would be particularly surprising considering the acido-thermophilic nature of other known representatives of Crenarchaeota. Sequences affiliated to this phylum were never retrieved in other studies, and therefore their presence may be attributed to an unusual case or to a microorganism in transit. However, some of the “Uncultured Crenarchaeote” sequences of this study (AY887071; AY887074; AY887077; AY887078) are closely related to “*Candidatus Nitrososphaera gargasensis*”<sup>[78]</sup>, a moderately thermophilic ammonium oxidizer of the phylum Thaumarchaeota<sup>[2]</sup>, not yet proposed in 2005. More recently, an investigation on the associations of diet with fungal and archaeal populations by 16S pyrosequencing also revealed the presence of sequences affiliated to the genus *Nitrososphaera*, in low yield amplifications and only in samples without *M. smithii*<sup>[79]</sup>. These sequences were detected in 16 samples from the 96 analyzed. A nested PCR assay targeting the *amoA* gene (encoding the ammonia mono-oxygenase) confirmed this result. The report of sequences affiliated to *Nitrososphaera* in two independent studies argues for their presence, even at low abundance, in the human gut microbiota<sup>[79]</sup>. Their low abundance might be due, for a part to their oxygen requirement for ammonium-oxidation, as reported for other ammonium-oxidizing archaea so far<sup>[80]</sup>.

Non-methanogenic euryarchaeota affiliated to the Halobacteriales were reported by two studies based on nested-PCR. The analysis of fecal samples using the PCR fingerprinting method DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) showed the presence of several se-

quences related to halophilic archaea in healthy Koreans. DNA sequences analyses revealed from 93% to 99% of identity to known Halobacteriales, *Halorubrum koreense*, *Halorubrum alimentarium* and *Halococcus morrhuae*<sup>[81]</sup>. These euryarchaeota are also found in salt-fermented seafood, therefore arguing that they may be related to Korean eating habits<sup>[81]</sup>. The presence of a large diversity (15 phylotypes with a 97.5% similarity cut off on 16S rRNA gene sequences) of haloarchaea was also detected by nested-PCR approaches in colonic mucosa biopsies and, in a lower extent, from feces obtained from German subjects with IBD<sup>[82]</sup>. Parallel detection of archaea in table salts has revealed a high and underestimated diversity of haloarchaea suggesting the possible origin of these archaea, regardless of their transient or persistent status in the human gut<sup>[82]</sup>. Several phylotypes were also detected in pre-endoscopic lavage solutions but were different from those retrieved from the biopsies. Interestingly one haloarchaea related to *Halosimplex* sp. was enriched in a low salt concentration medium (2.5% w/v) inoculated with microbes associated to a biopsy, showing that some of them are viable.

The few studies performed on archaea associated to mucosa have also detected methanogens not previously retrieved from feces samples<sup>[39,82]</sup>, suggesting that mucosa displays an overall larger diversity of archaea than feces, possibly reflecting greater niche heterogeneity and refuges when less adapted to gut conditions compared to *M. smithii* and *M. stadtmanae*. In addition to the haloarchaea, Oxley *et al.*<sup>[82]</sup> have also reported sequences closely related to *Methanobrevibacter arboriphilus* from biopsies of two individuals. A strain of this species was subsequently isolated from a human stool sample and its genome was sequenced<sup>[83]</sup> (Table 1). Clone sequences of *mcrA* closely related to *Methanoculleus chikugoensis*, a hydrogenotrophic methanogen of the order Methanomicrobiales were found associated to the intestinal mucosa<sup>[39]</sup>. As reviewed by Nguyen-Hieu *et al.*<sup>[84]</sup>, several other archaea such as *M. mazei* and *M. congolense* were also sparsely retrieved in the oral cavity.

Overall, this larger diversity suggests new functionalities and putative new archaea-host interactions. However most of these lineages of methanogenic and non-methanogenic archaea were identified from nested-PCR based experiments, suggesting their low abundance and possibly transient status in the human GIT<sup>[39,77,79,81,82]</sup>. This is not the case of sequences affiliated to the recently proposed 7<sup>th</sup> order of methanogens<sup>[26,27,37,38]</sup>.

### **Seventh order of methanogens: From an uncultured Thermoplasmatales-related lineage to the Methanomassiliicoccales**

In 2008, two studies on the human gut methanogens revealed, in addition to sequences attributed to *M. smithii* and *M. stadtmanae*, *mcrA* sequences extremely distant to any other cultured methanogens<sup>[26,37]</sup>. These sequences were associated to the Methanosarcinales order in the study of Scanlan *et al.*<sup>[37]</sup> due to a weak, but higher ho-

mology with sequences of this order than of all others<sup>[37]</sup>. The other study concluded to a clearly distinct and distant evolutionary branch compared to all other methanogens, and postulated for a new order of methanogens<sup>[26]</sup>. In parallel, the investigation of the co-occurring archaeal 16S rRNA genes provided a sequence related to the Thermoplasmatales, only in the sample positive for the atypical *mcrA* sequence<sup>[26]</sup>. The almost strict co-occurrence of Thermoplasmatales-related 16S rRNA sequences and atypical *mcrA* sequences was extended to a larger range of human-associated samples, highlighting also the diversity of this putative new order<sup>[27]</sup>. The final evidences of the existence of these new methanogens phylogenetically related to the Thermoplasmatales were subsequently provided by the culturing of several representatives of this order from human feces samples, either in pure culture (*Methanomassiliicoccus luminyensis*<sup>[85]</sup>) or in consortia (*Ca. Methanomethylophilus alvus*<sup>[86]</sup> and *Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*<sup>[87]</sup>), and the sequencing of their genome<sup>[86-88]</sup> (Table 1). The phylogenetic positioning of these methanogens was confirmed by a phylogenomic approach including 7472 marker positions from 84 Euryarchaeota genomes<sup>[89]</sup>. On the basis of enrichment cultures from hindgut of termites the name of Methanoplasmatales was proposed for this order<sup>[28]</sup>. However, according to the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria<sup>[90]</sup>, the name of Methanomassiliicoccales was then claimed by Iino *et al.*<sup>[29]</sup> in 2013 and subsequently validated by the International Committee on Systematics of Prokaryotes<sup>[30]</sup>. In the human digestive tract, the occurrence of the Methanomassiliicoccales representatives is not restricted to the colon as the 16S rRNA gene sequences of *Ca. M. alvus* shares 97%-98% identity with two 16S rRNA gene sequences retrieved in the oral cavity (FJ458322<sup>[91]</sup>; JQ433705<sup>[38]</sup>). These two sequences derived from oral cavity were almost similar to each other (2 differences on 357 aligned sites), suggesting that they belong to two strains of a same *Ca. Methanomethylophilus* species. In their study, Horz *et al.*<sup>[38]</sup> retrieved it in 10% of the subjects where it was estimated to represent 0.5% of the overall prokaryotic community<sup>[84]</sup>. It is thus likely that some species of Methanomassiliicoccales are more adapted to the oral cavity while others are more adapted to the colonic environment, similarly to the niche partitioning of *M. smithii* and *M. oralis* between the colon and the oral cavity, respectively<sup>[92]</sup>.

## **UNIQUE PROPERTIES OF THE METHANOMASSILIICOCALES IN THE HUMAN GUT**

The only isolated strain of this order, *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10, was obtained from human feces<sup>[85]</sup>. This strain is H<sub>2</sub> and methanol dependent for its methanogenesis<sup>[85]</sup>, like *M. stadtmanae*<sup>[58]</sup>. This is also the case for *Ca. Methanomethylophilus alvus*<sup>[86]</sup> and *Ca. Metha-*

nomassiliococcus intestinalis<sup>[87]</sup>. Other members of the Methanomassiliococcales cultured in consortia from the GIT of higher termites and millipedes<sup>[28]</sup> and from an anaerobic digester sludge<sup>[29]</sup> share the same characteristic. The first genome analyses of *Ca. M. alvus*, *Ca. M. intestinalis* and *M. luminyensis* revealed several fundamental aspects and putative generalized characteristics of this order<sup>[87-89]</sup>. First of all, the genes involved in the CO<sub>2</sub>-reduction/methyl-oxidation pathways are completely absent<sup>[89]</sup>, while the other methanol-using methanogen under dependence of H<sub>2</sub>, *M. stadtmanae*, still possesses most of them. Moreover, the three genomes show the genetic potential to encode an unusual amino acid, pyrrolysine (Pyl) discovered 10 years earlier in *Methanosarcinaceae*<sup>[93-95]</sup>. This 22<sup>nd</sup> proteinogenic amino acid is derived from lysine which is then incorporated into proteins by a specific genetic code during the translation, and relies on the *amber* stop codon suppression through specific tRNAs<sup>[94]</sup>. This strange event in the evolution of the genetic code is restricted to a few bacteria and methanogenic archaea from the *Methanosarcinaceae* family. In the Methanomassiliococcales, this seems followed by a specific evolution, with consequences for the entire genome (very low use of *amber* codon UAG as translation stop signal, regardless of GC%) (Borrel *et al.*<sup>[95]</sup>).

#### **Adding methylamines to the list of valuable electron acceptors in the human gut**

Pyrrolysine is an essential component of the catalytic site of the methyltransferase which is involved in the methylotrophic methanogenesis from methylated amines [monomethylamine (MMA), dimethylamine (DMA) and trimethylamine (TMA)]. The genes for these methyltransferases (respectively *mtmB*, *mtbB* and *mttB*) are present in the three genomes, their open reading frame being interrupted by an *amber* stop codon<sup>[86,87,95,96]</sup>, as observed in the *Methanosarcinaceae*<sup>[94]</sup>. The detection of *mttB* transcripts, having an *amber* stop codon presumably coding for Pyl has also been demonstrated in inhabitants of the cattle rumen belonging to the Methanomassiliococcales (the Rumen Cluster C, RCC cluster<sup>[97]</sup>). In this study, this gene was overexpressed in ruminal microbiota cultures in the presence of TMA, coupled to enhanced methanogenesis, providing strong clues that TMA is a substrate for methanogenesis in the representatives of the Methanomassiliococcales. Using the isolated strain *M. luminyensis* B10 in pure culture, we definitively demonstrated that TMA, in presence of H<sub>2</sub>, is one of its methanogenic substrates, as are also MMA and DMA, in addition to methanol<sup>[96]</sup>. Therefore, this leads to reconsider the electron acceptors in the human gut by including methylamines, when representatives of Methanomassiliococcales are present (Figure 3). This could have likely important consequences for the digestive physiology as well as for human pathologies.

#### **Large environmental distribution with a clade evolution dedicated to the GIT?**

Sequence database mining associated to phylogenetic

studies have now shown that this order of methanogens has a large environmental distribution<sup>[28,29,89]</sup>. It seems that this order may be divided in at least 3 different evolutionary clades<sup>[89]</sup>, two of them being represented in Figure 1. One is almost only composed of GIT members<sup>[28]</sup> and is proposed to form a distinct family among this order to which we will refer therein as *Ca. Methanomethylophilaceae*. A second clade, more distantly related, is exclusively composed of sequences retrieved from other environments and is to date, without any genome sequences and/or isolated representative. At last, there is a third clade, with an intermediary phylogenetic position between these two formers containing sequences from both GIT and non-GIT environments<sup>[89]</sup>: even if retrieved from human feces, *M. luminyensis* and *Ca. M. intestinalis* belong to this latter clade (family *Methanomassiliococcaeae* among the Methanomassiliococcales order), mostly composed of sequences derived from sediments and soils<sup>[89]</sup>.

*Ca. M. alvus* belongs to the clade mainly composed of sequences from GIT, and therefore its genome could be of particular interest to understand the role of the Methanomassiliococcales in the human (and other animals) GIT. It reveals typical adaptations to the GIT which are not present in the others. For example, the genome of *Ca. M. alvus* encodes a bile salts hydrolase (BSH) that confers resistance to the antimicrobial properties of bile salts in the digestive environment<sup>[96]</sup> (Table 1), absent from *M. luminyensis* and *Ca. M. intestinalis*. We report here the presence of the BSH genes in the genomes of the 20 strains of *M. smithii* isolated and sequenced by Hansen *et al.*<sup>[55]</sup> and in the genome of *M. arboriphilus*<sup>[83]</sup> (Table 1). This gene is poorly represented in other archaeal lineages with the notable exception of a distant homolog present in numerous Halobacteriales genomes<sup>[98]</sup>.

A comparative genome analysis has been realized for these human digestive representatives of Methanomassiliococcales and revealed other significant differences between the *Methanomassiliococcus* spp. and *Ca. M. alvus*<sup>[99]</sup>. Thus, *Methanomassiliococcus* spp. could be more recent human GIT inhabitants, and/or accidental ones, giving them a different role in the human GIT, positive or negative. Therefore, obtaining other human and environmental strains coupled with epidemiological studies will allow learning more about them.

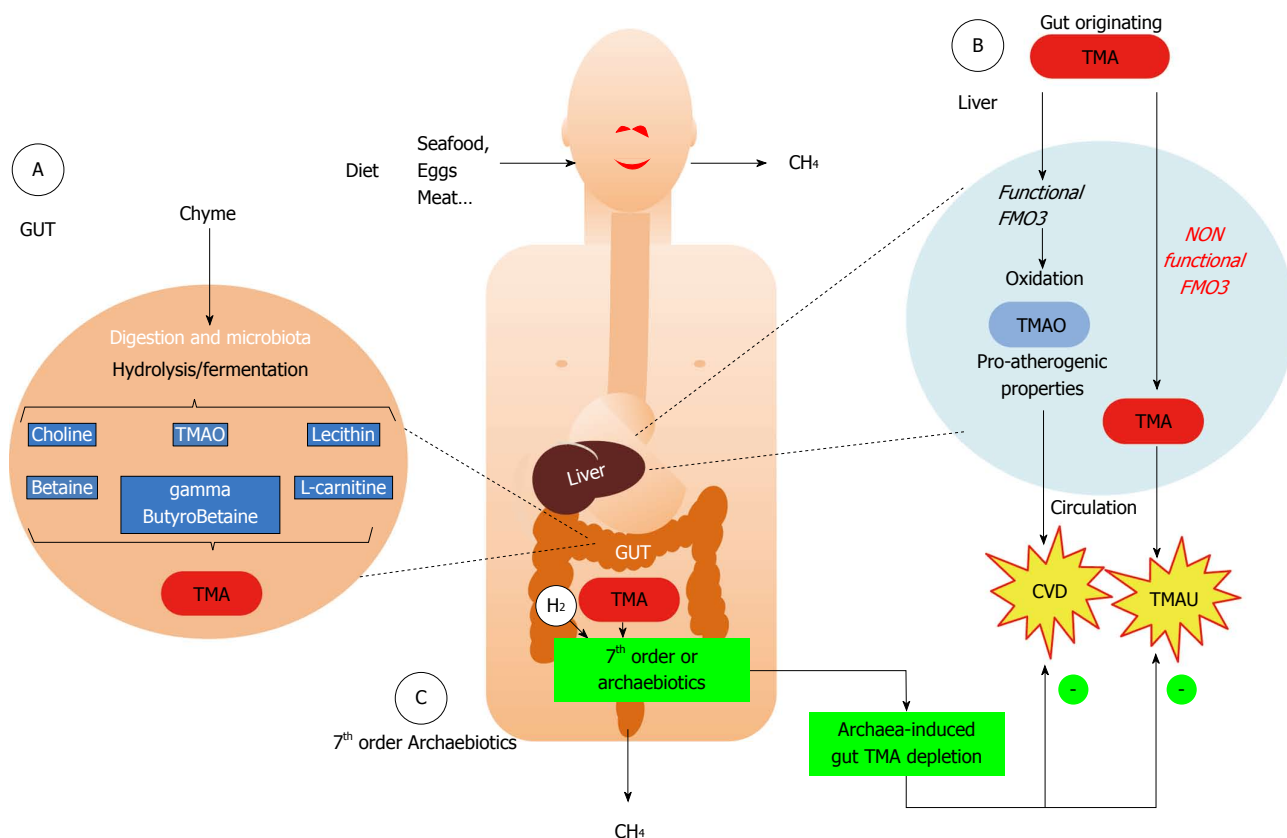
---

## **RELATIONSHIPS OF METHANOGENS WITH PHYSIOLOGICAL STATES OF THE HUMAN HOST**

---

During the last three decades, studies have tried to determine if any relationship existed between the presence of methanogens and some human diseases. These possible diseases are indicated in the Figure 2, while the Table 2 summarizes some of the putative pros and cons of the role of archaea from available data on humans concerning various digestive pathologies (colorectal cancers CRC, inflammatory bowel disease IBD, irritable





**Figure 3 Faith of trimethylamine originating from the gut microbiota metabolism and putative role of representatives of Methanomassiliicoccales.** A: Several common foods (containing lecithin/choline, L-carnitine, trimethylamine oxide, ...) are metabolized into trimethylamine (TMA) by some bacterial components of the microbiota; B: When the microbiota does not contain any members of the 7<sup>th</sup> order of methanogens, the gut-originating TMA reaches the liver, where it is oxidized by the flavin-monoxygenase FMO3 into trimethylamine oxide (TMAO) (Blue arrows in B). This odorless molecule has recently been shown to be associated to cardiovascular diseases (CVD) and has pro-atherogenic properties. In some people however, with a deficiency in liver oxidation, the TMA is not or less metabolized (orange arrows in B) and reaches various body fluids, leading to trimethylaminuria (TMAU) or “fish-odor syndrome”; C: When present, either naturally or by supplementation (Archaeobiotics), it is hypothesized that members of the 7<sup>th</sup> order of methanogens, through their up to now unique metabolism in the gut, might decrease the concentration of TMA by converting it into methane, therefore leading to an archaea-mediated TMA depletion before it can reach the liver. This could therefore be a convenient way to prevent CVD or limit TMAU.

bowel syndrome IBS, obesity, constipation). To date, no direct link with mechanisms has been established between these diseases and methanogens, and contradictory results were found for example concerning CRC. However, it was proposed that the presence of *M. smithii* promotes calories intake from diet: in an animal model, *M. smithii* was shown to influence the metabolism of one of the most important saccharolytic microbiota species, *B. thetaiotaomicron*<sup>[53]</sup>. This phenomenon was observed in germ-free mice inoculated with *M. smithii* and *B. thetaiotaomicron*, together or separately<sup>[53]</sup>: the co-implementation led to a mutual gain with an increase in energy retrieval (hydrolysis and fermentation), and importantly, an increased lipogenesis and host fat. Very recently, *M. stadtmanae* has been shown to be more prevalent in IBD patients<sup>[100]</sup>. Interestingly, *M. stadtmanae* stimulates *in vitro* TNF production, an inflammatory cytokine, from peripheral blood mononuclear cells of healthy patients, while patients affected by IBD have a higher circulating IgG response to *M. stadtmanae*<sup>[100]</sup>. At last, methanogens seem also linked to a pathology of the oral cavity, the periodontitis, in which the severity corroborates to the

abundance of methanogens<sup>[24]</sup> (Table 2).

### Higher prevalence and diversity of methanogens with age

Among all the various relationships sought between the occurrence of methanogens and the physiological state of human host cohorts, the age relationship was the most consistently observed. As highlighted by the literature review of Levitt *et al.*<sup>[23]</sup> (2006) on studies based on the methane breath test, the proportion of people excreting methane is higher among adults than among children with virtually no methane producers under 5-year-old<sup>[16,101,102]</sup>. Such age-related increase of the proportion of methane producers was less clearly observed during adulthood with more studies reporting no statistical change (see for example<sup>[23,103,104]</sup>). Recently, an association between age (and also sex) and breath methane was described in the German population (428 subjects, age range: 4-95)<sup>[105]</sup>. Studies based on molecular approaches support this relationship and provide supplemental information through the lower detection limit of the methanogens and the access to their diversity. Significantly lower proportion of



**Table 2** Possible association between several human diseases and methanogens

Pathology	Pros for a role or an association	Cons
Colorectal cancer	80% of colorectal cancer patients are methane producers <sup>[127]</sup> Methane production increases with the severity of colorectal cancer <sup>[128]</sup>	No significant relation with the amount of breath methane <sup>[48,71,129-131]</sup> Native Africans with high level of methanogenic archaea are less susceptible to sporadic colorectal cancer <sup>[48]</sup> Decreased proportion of <i>M. smithii</i> in obese <sup>[72,73,133]</sup>
Obesity	Higher levels of methanogens in obese <sup>[132]</sup>	
Anorexia	Higher levels of <i>M. smithii</i> in anorexic people (adaption to diet restriction?) <sup>[134]</sup>	
IBD	Lower proportion of methane-producers/methanogen carriers in patients with IBD <sup>[104,135]</sup>	
IBS	Correlation with higher production of methane (also compared to IBD patients) <sup>[136]</sup>	No significant difference in methane production with controls <sup>[137]</sup>
Diverticulosis	Subjects with diverticulosis often with high level of methanogens <sup>[45]</sup>	
Constipation	Association with chronic constipation/transit time <sup>[138,139]</sup> Level of methane significantly associated with the severity of constipation <sup>[136,140]</sup> Association with IBS constipation/increase of transit time <sup>[141-143]</sup>	No significant difference between constipated children and controls <sup>[144]</sup>
Periodontitis	Possible pathogenic role and increased proportions of hydrogenotrophs and methanogens in severe cases <sup>[24,145,146]</sup> After therapy, decrease in the prevalence of archaea <sup>[147]</sup>	

IBD: Inflammatory bowel disease; IBS: Irritable bowel disease.

methanogens among babies<sup>[27]</sup> and children<sup>[44]</sup> than among adults were also reported based on PCR approaches. Time monitoring of the gut microbiota composition in babies over 2 years have shown that gut associated methanogens can be present in the early life, with 7 on 14 babies positive for methanogens<sup>[106]</sup>. However, their abundance was low ( $10^3$ - $10^6$  copies/g of stool), likely below the necessary threshold for CH<sub>4</sub> detection in the breath and they were only temporarily present during the first weeks of life<sup>[107]</sup>. This transient state contrast with reports of stable populations of methanogens in adults sampled at several time points<sup>[55,107,108]</sup>. The prevalence of *M. smithii* has been linked to bacterial genera<sup>[79]</sup> and gut enterotypes<sup>[65]</sup> which are also considered stables in adults, suggesting the very specific competitive and symbiotic interactions of methanogens with other member of the microbiota. Due to the fast evolving composition of the microbiota of babies, the occurrence of the favorable ecological conditions for the colonization of *M. smithii* could only be temporary. Another non-exclusive reason of this low prevalence and transient state could rely on the high transit time in babies.

One study from our group<sup>[27]</sup> has reported a not significant trend of increased prevalence among elderly adults ( $79.4 \pm 6.7$  years) in comparison to younger adults ( $33.0 \pm 6.4$  years) which agrees with previous reports based on the methane breath test<sup>[27]</sup>. Importantly this study has pointed an increase of the diversity of the methanogens. Indeed, several distant phylotypes affiliated to the Methanomassiliococcales were more frequently observed in the elderlies (40% of those tested on a small panel of 20 patients) and far less in adults (10%), and almost absent in the newborns (only 1 positive out of 17 tested)<sup>[27]</sup>. Accordingly, a similar age-related increase of *M. luminyensis* and possibly *Ca. M. intestinalis* was subsequently observed based on qPCR<sup>[74]</sup>. The increase of diversity between adults and elderlies remains unexplained,

even if it is now well known that the gut microbiota of the elderlies is different from the adults<sup>[109,110]</sup> with variations due to diet/nutrition, residence location and the general health of the elderlies<sup>[66]</sup>. Several hypotheses can be made: first, methanogenic archaea are known to be insensitive to most of the antibiotics used in human health<sup>[9,111]</sup>, mainly due to the composition of their membrane and cell wall, but also to their specificity in their DNA/RNA metabolism. It is therefore tempting to hypothesize that they could be selected by treatments accumulation during the life. Second, methanogenic archaea have relatively long doubling time, and the slower transit time observed with aging may be also a factor of this over representation in the elderlies compared to the adult, and even more compared to newborns and infants under two years<sup>[109,112]</sup>. Collectively these studies suggest that the prevalence of methanogens in the population increases rapidly in the first years of life, mainly by the colonization of *M. smithii*, and that the last part of life is characterized by an increase of the diversity through the colonization by various representatives of the Methanomassiliococcales. Another hypothesis relies not directly to aging, but to the different generations between elderlies compared to present adults: exposure to farm animals, germs carried by food and diet habits, *etc...* have evolved over the years, and it may be possible that present adults have less chance to be inoculated than have their parents. Studies on various ethnical/geographical populations would provide interesting complementary data.

### **TMA-based methanogenesis, a beneficial incidence in human health?**

Due to their very specific metabolism leading to TMA depletion for methanogenesis, the currently identified representatives of the Methanomassiliococcales might have a positive effect on health. TMA is responsible of the rotting fish characteristic odor, to which our olfac-

tion is extremely sensitive. This prevents us to ingest spoiled fishes and seafood. TMA is however a product of diet metabolism by the intestinal microbiota, usually associated to the consumption of foods containing either choline and lecithin (such as eggs, beef, dairy products, vegetables...), L-carnitine (meat, energy drinks...) or TMAO (trimethylamine-*N*-oxide in seafood, fish...), as exemplified in Figure 3A<sup>[113-116]</sup>. TMA is then absorbed in the intestine, goes to the liver where it is oxidized to the odorless TMAO via a flavin monooxygenase (mainly the FMO3), which reaches the circulation before being eliminated in the urine, leading to a TMAO *vs* (TMA+TMAO) urine ratio superior to 92% (Figure 3B). It is likely that TMA is also metabolized into methane when archaea from the Methanomassiliicoccales are present, preferentially to methanol for which inter-microbial species competition occurs in the intestine (*i.e.*, with *M. stadtmanae*, and possibly *M. smithii*). Therefore, when present, the Methanomassiliicoccales could lower the intestinal TMA concentration, leading to lowered TMA intestinal absorption, and in consequence to a lower TMAO plasmatic level after liver conversion.

The gut origin of TMA is involved at least in two human diseases. The team of the Pr Stanley Hazen in Cleveland recently demonstrated an association between plasma levels of TMAO and the risk of myocardial infarction, stroke, and death within the next three years. Thus, in 2595 patients, plasma levels of L-carnitine, related to high plasmatic TMAO levels is correlated to a high incidence of cardiovascular events, with or without adjustments to the traditional risk factors<sup>[115]</sup>. This is identical with plasma levels of choline, betaine and TMAO<sup>[117]</sup>, the upper quartile of plasmatic TMAO concentration increasing the major adverse cardiovascular events to 2.5<sup>[113]</sup>. These prognostic values of choline and betaine are only effective when concomitant to an increase in plasma TMAO level, *i.e.* from TMA production in the gut<sup>[118]</sup>. Plasma TMAO seems however much more than a plasma marker: it seems to promote foam cell formation by increasing the expression of receptors involved in macrophage uptake of circulating cholesterol (scavenger receptors CD36 and SR-A1), and conversely by reducing the reverse cholesterol transport and its elimination as bile acids from the intestine<sup>[115]</sup>. Therefore, limiting TMA production and absorption in the intestine is a mean to reduce plasmatic TMAO level, and its deleterious effects on blood vessels, which is likely to what the Methanomassiliicoccales contributes naturally when present.

There is also another human pathology, the trimethylaminuria<sup>[119-121]</sup> (TMAU) which involves the gut microbiota TMA production. After intestinal TMA production and absorption, some people are unable to oxidize it into TMAO in their liver, due to a genetic or acquired liver deficiency affecting the FMO3 functionalities. In this case, unmetabolized TMA reaches the general circulation and is distributed throughout the body fluids. It is next excreted through sweat, exhalation and urine [where

TMAO *vs* (TMAO+TMA) ratio is then below 92%, with a decrease depending on the severity of the FMO3 deficiency]. Thus, TMAU causes an unpleasant odor of rotten fish to the affected person, due to its presence in sweat and breath, for which the human olfactory system is very sensitive. This causes an extremely debilitating disease, at the social and psychological level<sup>[120]</sup>, for which no real treatments are proposed: the affected people often empirically adapt their diet in order to limit gut TMA production, by renouncing to eggs, red meat, beans,... Still poorly recognized and diagnosed, its prevalence remains unknown, but some FMO3 encoding gene mutations could affect about 1% of the population<sup>[122]</sup>. Here again, the unique metabolic properties of the Methanomassiliicoccales could limit gut TMA concentration, without the bad side effects of limiting choline inputs by diet.

We then suppose the physiological positive impact that may have the Methanomassiliicoccales as a TMA depleting agent in the intestinal microbiota, leading to the conversion of TMA into CH<sub>4</sub>, an odorless and inert gas before it reaches the liver for eventual conversion. This metabolism is so far only realized by a few methanogens, and among gut-naturally occurring methanogens, only members of the Methanomassiliicoccales. What can be inherently possible in the gut microbiota containing the methanogenic Methanomassiliicoccales could be reproduced by supplementing the gut microbiota by this kind of microorganism. Accordingly, the 7<sup>th</sup> order of methanogens could therefore be used as a probiotics to prevent cardiovascular disease, acting by reducing the amount of the pro-atherogenic TMAO produced by the liver and therefore its plasma level. A supply with Methanomassiliicoccales could also be a simple way to limit TMAU, by reducing the TMA concentration in the gut and in consequence, its olfactory impact on the body. In both pathology cases, it will be possible to avoid drastic diets (as it is usually done for TMAU patients), thus limiting nutritional deficiencies risks. This concept of probiotics has recently been developed under the name of "archaeobiotics" as to show the innovative and the positive aspect that we expect from archaeal strains to human health<sup>[96]</sup>. However, it remains to be shown that this metabolic activity is effective in the human GIT (as it is already done in the rumen<sup>[97]</sup>) without causing inconvenience or bad side effects. Preliminary *in vitro* studies on human microbiota<sup>[123,124]</sup> are therefore necessary to determine which representatives of the Methanomassiliicoccales could be supplied and further tested for their impact on other gut microbiota components, as it was recently done for the gut methanogen *M. smithii* (W. Tottey, personal communication). Using exhaustive microbiota analysis tools applicable to *in-vitro* systems such as Next Generation Sequencing<sup>[76]</sup> or DNA phylogenetic microarrays like the HuGChip<sup>[125]</sup>, an *in-vitro* selection of the best strains should be possible, also based on functional analysis (*e.g.*, transcriptomics and metabolomics), that would be then followed by rationale tests in

animals/humanized gnotobiotic mice, before clinical research.

## CONCLUSION

The diversity of the archaeal component of the human gut microbiota has been greatly renewed during these last few years and will likely continue to grow: difficulties to culture them in the laboratory has been counterpart by the generalization of Next Generation Sequencing technologies, used mainly in 16S diversity studies and metagenomics. Links with diseases/human health, if any, will therefore be established in the next years, considering the archaea as a diverse population, as it is for bacteria, with more discriminant methods than methane in breath for methanogens. The recently discovered 7<sup>th</sup> order of methanogens illustrates these points: the presence of different phylogenetic clusters may signify different, even opposite, incidence for the health, and therefore highly-discriminant tools are needed. This order was named Methanoplasmatales, and then Methanomassiliicoccales (according to the first described species)<sup>[28,29]</sup>, the current official name<sup>[30]</sup>. Within, and besides Methanomassiliicoccales, we propose the family name of Methanomethylphilaceae for the clade encompassing the digestive species of the *Candidatus* genus Methanomethylphilus. This would highlight the unique dependence to methylated compounds among methanogens, for the whole order (*methane*-, methanogenic; *methylophilus*, that likes methyl compounds). Genomics has strongly helped in the determination of their putative roles in the GIT, and indicated their unique metabolic properties before experimental proofs. This shows the potent physiological importance of the still poorly known domain Archaea in the human gut, and the role of its members, beneficial or deleterious, remaining to be determined. It may also provide, as it is for the Methanomassiliicoccales, new directions in probiotics design.

## REFERENCES

- 1 DeLong EF. Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Curr Opin Genet Dev* 1998; **8**: 649-654 [PMID: 9914204 DOI: 10.1016/S0959-437X(98)80032-4]
- 2 Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* 2008; **6**: 245-252 [PMID: 18274537 DOI: 10.1038/nrmicro1852]
- 3 Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4576-4579 [PMID: 2112744 DOI: 10.1073/pnas.87.12.4576]
- 4 Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* 2013; **504**: 231-236 [PMID: 24336283 DOI: 10.1038/nature12779]
- 5 Forterre P. The common ancestor of archaea and eukarya was not an archaeon. *Archaea* 2013; **2013**: 372396 [PMID: 24348094 DOI: 10.1155/2013/372396]
- 6 Pereira SL, Reeve JN. Histones and nucleosomes in Archaea and Eukarya: a comparative analysis. *Extremophiles* 1998; **2**: 141-148 [PMID: 9783158]
- 7 Koga Y, Morii H. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; **71**: 97-120 [PMID: 17347520 DOI: 10.1128/MMBR.00033-06]
- 8 Peretó J, López-García P, Moreira D. Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends Biochem Sci* 2004; **29**: 469-477 [PMID: 15337120]
- 9 Kandler O, König H. Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 305-308 [PMID: 9614965 DOI: 10.1016/j.tibs.2004.07.002]
- 10 Borrel G, Jézéquel D, Biderre-Petit C, Morel-Desrosiers N, Morel JP, Peyret P, Fonty G, Lehours AC. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Res Microbiol* 2011; **162**: 832-847 [PMID: 21704700 DOI: 10.1016/j.resmic]
- 11 Reeburgh WS. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev* 2007; **107**: 486-513 [PMID: 17261072 DOI: 10.1021/cr050362v]
- 12 Bridgman SD, Cadillo-Quiroz H, Keller JK, Zhuang Q. Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Glob Chang Biol* 2013; **19**: 1325-1346 [PMID: 23505021 DOI: 10.1111/gcb.12131]
- 13 Angel R, Claus P, Conrad R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. *ISME J* 2012; **6**: 847-862 [PMID: 22071343 DOI: 10.1038/ismej.2011]
- 14 Hackstein JH, van Alen TA. Fecal methanogens and vertebrate evolution. *Evolution* 1996; **50**: 559-572
- 15 Ohkuma M, Noda S, Kudo T. Phylogenetic relationships of symbiotic methanogens in diverse termites. *FEMS Microbiol Lett* 1999; **171**: 147-153 [PMID: 10077839]
- 16 Bond JH, Engel RR, Levitt MD. Factors influencing pulmonary methane excretion in man. An indirect method of studying the in situ metabolism of the methane-producing colonic bacteria. *J Exp Med* 1971; **133**: 572-588 [PMID: 5111441 DOI: 10.1084/jem.133.3.572]
- 17 Nakamura N, Lin HC, McSweeney CS, Mackie RI, Gaskins HR. Mechanisms of microbial hydrogen disposal in the human colon and implications for health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010; **1**: 363-395 [PMID: 22129341 DOI: 10.1146/annurev.food.102308.124101]
- 18 Saengkerdsud S, Ricke SC. Ecology and characteristics of methanogenic archaea in animals and humans. *Crit Rev Microbiol* 2014; **40**: 97-116 [PMID: 23425063 DOI: 10.3109/1040841X.2013.763220]
- 19 Weiland P. Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; **85**: 849-860 [PMID: 19777226 DOI: 10.1007/s00253-009-2246-7]
- 20 Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep* 2009; **1**: 285-292 [PMID: 23765881 DOI: 10.1111/j.1758-2229]
- 21 Moraes LE, Strathe AB, Fadel JG, Casper DP, Kebreab E. Prediction of enteric methane emissions from cattle. *Glob Chang Biol* 2014; **20**: 2140-2148 [PMID: 24259373 DOI: 10.1111/gcb.12471]
- 22 Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA. Archaea and their potential role in human disease. *Infect Immun* 2003; **71**: 591-596 [PMID: 12540534]
- 23 Levitt MD, Furne JK, Kuskowski M, Ruddy J. Stability of human methanogenic flora over 35 years and a review of insights obtained from breath methane measurements. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 123-129 [PMID: 16469670 DOI: 10.1016/j.cgh.2005.11.006]
- 24 Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6176-6181 [PMID: 15067114 DOI: 10.1073/pnas.0308766101.0308766101]
- 25 Horz HP, Conrads G. Methanogenic Archaea and oral infec-



- tions - ways to unravel the black box. *J Oral Microbiol* 2011; **3**: [PMID: 21541092 DOI: 10.3402/jom.v3i0.5940]
- 26 **Mihajlovski A**, Alric M, Brugère JF. A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res Microbiol* 2008; **159**: 516-521 [PMID: 18644435 DOI: 10.1016/j.resmic.2008.06.007]
- 27 **Mihajlovski A**, Doré J, Levenez F, Alric M, Brugère JF. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ Microbiol Rep* 2010; **2**: 272-280 [PMID: 23766078 DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00116.x]
- 28 **Paul K**, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A. "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 2012; **78**: 8245-8253 [PMID: 23001661 DOI: 10.1128/AEM.02193-12]
- 29 **Iino T**, Tamaki H, Tamazawa S, Ueno Y, Ohkuma M, Suzuki K, Igarashi Y, Haruta S. Candidatus Methanogramma caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of Methanomassiliicoccales fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata. *Microbes Environ* 2013; **28**: 244-250 [PMID: 23524372]
- 30 List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; **56**: 1-6 [PMID: 16403855 DOI: 10.1099/ijs.0.058222-0]
- 31 **García JL**, Patel BK, Ollivier B. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 2000; **6**: 205-226 [PMID: 16887666]
- 32 **Liu Y**, Whitman WB. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1125**: 171-189 [PMID: 18378594 DOI: 10.1196/annals.1419.019]
- 33 **Ferry JG**. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol Rev* 1999; **23**: 13-38 [PMID: 10077852]
- 34 **Whitcar MJ**, Faber E, Schoell M. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation-Isotope evidence. *Geochim Cosmochim Acta* 1986; **50**: 693-709 [DOI: 10.1016/0016-7037(86)90346-7]
- 35 **Friedrich MW**. Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea. *Methods Enzymol* 2005; **397**: 428-442 [PMID: 16260307]
- 36 **Luton PE**, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 2002; **148**: 3521-3530 [PMID: 12427943]
- 37 **Scanlan PD**, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 79 [PMID: 18492229 DOI: 10.1186/1471-2180-8-79]
- 38 **Horz HP**, Seyfarth I, Conrads G. *McrA* and 16S rRNA gene analysis suggests a novel lineage of Archaea phylogenetically affiliated with Thermoplasmatales in human subgingival plaque. *Anaerobe* 2012; **18**: 373-377 [PMID: 22561061 DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.006]
- 39 **Nava GM**, Carbonero F, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *ISME J* 2012; **6**: 57-70 [PMID: 21753800 DOI: 10.1038/ismej.2011.90]
- 40 **Janssen PH**, Kirs M. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**: 3619-3625 [PMID: 18424540 DOI: 10.1128/AEM.02812-07]
- 41 **Angenent LT**, Karim K, Al-Dahhan MH, Wrenn BA, Domínguez-Espinosa R. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol* 2004; **22**: 477-485 [PMID: 15331229 DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.07.001]
- 42 **Bernalier-Donadille A**. [Fermentative metabolism by the human gut microbiota]. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; **34** Suppl 1: S16-S22 [PMID: 20889000 DOI: 10.1016/S0399-8320(10)70016-6]
- 43 **Rey FE**, Gonzalez MD, Cheng J, Wu M, Ahern PP, Gordon JI. Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 13582-13587 [PMID: 23898195 DOI: 10.1073/pnas.1312524110]
- 44 **Stewart JA**, Chadwick VS, Murray A. Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Lett Appl Microbiol* 2006; **43**: 58-63 [PMID: 16834722 DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01906.x]
- 45 **Weaver GA**, Krause JA, Miller TL, Wolin MJ. Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population: an association of methanogenic bacteria and diverticulosis. *Gut* 1986; **27**: 698-704 [PMID: 3721294]
- 46 **O'Keefe SJ**, O'Keefe EA, Burke E, Roberts P, Lavender R, Kemp T. Milk-induced malabsorption in malnourished African patients. *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 130-135 [PMID: 1905476]
- 47 **Hudson MJ**, Tomkins AM, Wiggins HS, Drasar BS. Breath methane excretion and intestinal methanogenesis in children and adults in rural Nigeria. *Scand J Gastroenterol* 1993; **28**: 993-998 [PMID: 8284637]
- 48 **Segal I**, Walker AR, Lord S, Cummings JH. Breath methane and large bowel cancer risk in contrasting African populations. *Gut* 1988; **29**: 608-613 [PMID: 3396948]
- 49 **Miller TL**, Wolin MJ, Conway de Macario E, Macario AJ. Isolation of Methanobrevibacter smithii from human feces. *Appl Environ Microbiol* 1982; **43**: 227-232 [PMID: 6798932]
- 50 **Miller TL**, Wolin MJ. Methanosphaera stadtmaniae gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* 1985; **141**: 116-122 [PMID: 3994486 DOI: 10.1007/BF00423270]
- 51 **Pochart P**, Lémann F, Flourié B, Pellier P, Goderel I, Rambaud JC. Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1281-1285 [PMID: 8224632]
- 52 **Eckburg PB**, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; **308**: 1635-1638 [PMID: 15831718 DOI: 10.1126/science.1110591]
- 53 **Samuel BS**, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10011-10016 [PMID: 16782812 DOI: 10.1073/pnas.0602187103]
- 54 **Samuel BS**, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JI. Genomic and metabolic adaptations of Methanobrevibacter smithii to the human gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 10643-10648 [PMID: 17563350 DOI: 10.1073/pnas.0704189104]
- 55 **Hansen EE**, Lozupone CA, Rey FE, Wu M, Guruge JL, Narra A, Goodfellow J, Zaneveld JR, McDonald DT, Goodrich JA, Heath AC, Knight R, Gordon JI. Pan-genome of the dominant human gut-associated archaeon, Methanobrevibacter smithii, studied in twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108** Suppl 1: 4599-4606 [PMID: 21317366 DOI: 10.1073/pnas.1000071108]
- 56 **Lurie-Weinberger MN**, Peeri M, Gophna U. Contribution of lateral gene transfer to the gene repertoire of a gut-adapted methanogen. *Genomics* 2012; **99**: 52-58 [PMID: 22056789 DOI: 10.1016/j.ygeno.2011.10.005]
- 57 **Lurie-Weinberger MN**, Peeri M, Tuller T, Gophna U. Extensive Inter-Domain Lateral Gene Transfer in the Evolution of the Human Commensal Methanosphaera stadtmaniae. *Front Genet* 2012; **3**: 182 [PMID: 23049536 DOI: 10.3389/fgene.2012.00182]
- 58 **Fricke WF**, Seedorf H, Henne A, Krüer M, Liesegang H, Hederich R, Gottschalk G, Thauer RK. The genome sequence of Methanosphaera stadtmaniae reveals why this human intes-

- tinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol* 2006; **188**: 642-658 [PMID: 16385054 DOI: 10.1128/JB.188.2.642-658.2006]
- 59 **Jones BV**, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 13580-13585 [PMID: 18757757 DOI: 10.1073/pnas.0804437105]
- 60 **Kulik EM**, Sandmeier H, Hinni K, Meyer J. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **196**: 129-133 [PMID: 11267768 DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10553.x]
- 61 **Belay N**, Mukhopadhyay B, Conway de Macario E, Galask R, Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 1666-1668 [PMID: 2199527]
- 62 **Ferrari A**, Brusa T, Rutili A, Canzi E, Biavati B. Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. *Curr Microbiol* 1994; **29**: 7-12 [DOI: 10.1007/BF01570184]
- 63 **Khelaifia S**, Garibal M, Robert C, Raoult D, Drancourt M. Draft Genome Sequencing of *Methanobrevibacter oralis* Strain JMR01, Isolated from the Human Intestinal Microbiota. *Genome Announc* 2014; **2**: e00073-14 [PMID: 24558239 DOI: 10.1128/genomeA.00073-14]
- 64 **Dridi B**, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 2009; **4**: e7063 [PMID: 19759898 DOI: 10.1371/journal.pone.0007063]
- 65 **Arumugam M**, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rimni C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; **473**: 174-180 [PMID: 21508958 DOI: 10.1038/nature09944]
- 66 **Claesson MJ**, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; **488**: 178-184 [PMID: 22797518 DOI: 10.1038/nature11319]
- 67 **Yatsunenkov T**, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012; **486**: 222-227 [PMID: 22699611 DOI: 10.1038/nature11053]
- 68 **Gill SR**, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; **312**: 1355-1359 [PMID: 16741115 DOI: 10.1126/science.1124234]
- 69 **Tyakht AV**, Kostyukova ES, Popenko AS, Belenikin MS, Pavlenko AV, Larin AK, Karpova IY, Selezneva OV, Semashko TA, Ospanova EA, Babenko VV, Maev IV, Cheremushkin SV, Kucheryavyy YA, Shcherbakov PL, Grinevich VB, Efimov OI, Sas EI, Abdulkhakov RA, Abdulkhakov SR, Lyalyukova EA, Livzan MA, Vlassov VV, Sagdeev RZ, Tsukanov VV, Osipenko MF, Kozlova IV, Tkachev AV, Sergienko VI, Alexeev DG, Govorun VM. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nat Commun* 2013; **4**: 2469 [PMID: 24036685 DOI: 10.1038/ncomms3469]
- 70 **Fernandes J**, Wang A, Su W, Rozenbloom SR, Taibi A, Comelli EM, Wolever TM. Age, dietary fiber, breath methane, and fecal short chain fatty acids are interrelated in Archaea-positive humans. *J Nutr* 2013; **143**: 1269-1275 [PMID: 23739307 DOI: 10.3945/jn.112.170894]
- 71 **O'Keefe SJ**, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR, Manafe M, Arch J, Adada H, van der Merwe T. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr* 2007; **137**: 175S-182S [PMID: 17182822]
- 72 **Million M**, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)* 2012; **36**: 817-825 [PMID: 21829158 DOI: 10.1038/ijo.2011.153]
- 73 **Million M**, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, Vialettes B, Raoult D. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes (Lond)* 2013; **37**: 1460-1466 [PMID: 23459324 DOI: 10.1038/ijo.2013.20ijo201320]
- 74 **Dridi B**, Henry M, Richet H, Raoult D, Drancourt M. Age-related prevalence of *Methanomassiliococcus luminyensis* in the human gut microbiome. *APMIS* 2012; **120**: 773-777 [PMID: 22958284 DOI: 10.1111/j.1600-0463.2012.02899.x]
- 75 **Brugere JF**, Mihajlovski A, Missaoui M, Peyret P. Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; **9**: 353-365 [PMID: 19435456 DOI: 10.1586/erm.09.16]
- 76 **Claesson MJ**, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: e200 [PMID: 20880993 DOI: 10.1093/nar/gkq873gkq873]
- 77 **Rieu-Lesme F**, Delbès C, Sollelis L. Recovery of partial 16S rDNA sequences suggests the presence of Crenarchaeota in the human digestive ecosystem. *Curr Microbiol* 2005; **51**: 317-321 [PMID: 16187155 DOI: 10.1007/s00284-005-0036-8]
- 78 **Hatzenpichler R**, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 2134-2139 [PMID: 18250313 DOI: 10.1073/pnas.0708857105]
- 79 **Hoffmann C**, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* 2013; **8**: e66019 [PMID: 23799070 DOI: 10.1371/journal.pone.0066019]
- 80 **Hatzenpichler R**. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* 2012; **78**: 7501-7510 [PMID: 22923400 DOI: 10.1128/AEM.01960-12]
- 81 **Nam YD**, Chang HW, Kim KH, Roh SW, Kim MS, Jung MJ, Lee SW, Kim JY, Yoon JH, Bae JW. Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. *J Microbiol* 2008; **46**: 491-501 [PMID: 18974948]
- 82 **Oxley AP**, Lanfranco MP, Würdemann D, Ott S, Schreiber S, McGenety TJ, Timmis KN, Nogales B. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. *Environ Microbiol* 2010; **12**: 2398-2410 [PMID: 20438582]

- 83 **Khelaifia S**, Garibal M, Robert C, Raoult D, Drancourt M. Draft Genome Sequence of a Human-Associated Isolate of *Methanobrevibacter arboriphilicus*, the Lowest-G+C-Content Archaeon. *Genome Announc* 2014; **2**: [PMID: 24459264 DOI: 10.1128/genomeA.01181-13]
- 84 **Nguyen-Hieu T**, Khelaifia S, Aboudharam G, Drancourt M. Methanogenic archaea in subgingival sites: a review. *APMIS* 2013; **121**: 467-477 [PMID: 23078250 DOI: 10.1111/apm.12015]
- 85 **Dridi B**, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; **62**: 1902-1907 [PMID: 22859731 DOI: 10.1099/ijs.0.033712-0]
- 86 **Borrel G**, Harris HM, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, Peyret P, Gribaldo S, O'Toole PW, Brugère JF. 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**: 6944-6945 [PMID: 23209209 DOI: 10.1128/JB.01867-12]
- 87 **Borrel G**, Harris HM, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, Deane J, Gribaldo S, Bardot O, Peyretailade E, Peyret P, O'Toole PW, Brugère JF. Genome Sequence of "Candidatus *Methanomassiliicoccus intestinalis*" Issoire-Mx1, a Third Thermoplasmatales-Related Methanogenic Archaeon from Human Feces. *Genome Announc* 2013; **1**: e00453-13 [PMID: 23846268 DOI: 10.1128/genomeA.00453-13]
- 88 **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 [PMID: 22887657 DOI: 10.1128/JB.00956-12]
- 89 **Borrel G**, O'Toole PW, Harris HM, Peyret P, Brugère JF, Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of Methylophilic methanogens and provide insights into the evolution of Methanogenesis. *Genome Biol Evol* 2013; **5**: 1769-1780 [PMID: 23985970 DOI: 10.1093/gbe/evt128]
- 90 **Lapage SP**, Sneath PHA, Lessel EF, Skerman VBD, Seeliger HPR, Clark WA, editors. International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision. Washington (DC): ASM Press, 1992
- 91 **Li CL**, Liu DL, Jiang YT, Zhou YB, Zhang MZ, Jiang W, Liu B, Liang JP. Prevalence and molecular diversity of Archaea in subgingival pockets of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2009; **24**: 343-346 [PMID: 19572899 DOI: 10.1111/j.1399-302X.2009.00514.x]
- 92 **Horz HP**, Conrads G. The discussion goes on: What is the role of Euryarchaeota in humans? *Archaea* 2010; **2010**: 967271 [PMID: 21253553 DOI: 10.1155/2010/967271]
- 93 **Paul L**, Ferguson DJ, Krzycki JA. The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons. *J Bacteriol* 2000; **182**: 2520-2529 [PMID: 10762254]
- 94 **Srinivasan G**, James CM, Krzycki JA. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 2002; **296**: 1459-1462 [PMID: 12029131 DOI: 10.1126/science.1069588]
- 95 **Borrel G**, Gaci N, Peyret P, O'Toole PW, Gribaldo S, Brugère JF. Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7th order of methanogens: implications for the evolution of a genetic code expansion cassette. *Archaea* 2014; **2014**: 374146 [PMID: 24669202 DOI: 10.1155/2014/374146]
- 96 **Brugère JF**, Borrel G, Gaci N, Tottey W, O'Toole PW, Malpuech-Brugère C. Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes* 2014; **5**: 5-10 [PMID: 24247281 DOI: 10.4161/gmic.26749]
- 97 **Poulsen M**, Schwab C, Jensen BB, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fragner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A, Urich T. Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun* 2013; **4**: 1428 [PMID: 23385573 DOI: 10.1038/ncomms2432]
- 98 **Panigrahi P**, Sule M, Sharma R, Ramasamy S, Suresh CG. An improved method for specificity annotation shows a distinct evolutionary divergence among the microbial enzymes of the cholyglycine hydrolase family. *Microbiology* 2014; **160**: 1162-1174 [PMID: 24644246 DOI: 10.1099/mic.0.077586-0]
- 99 **Borrel G**, Parisot N, Harris HM, Peyretailade E, Gaci N, Tottey W, Bardot O, Raymann K, Gribaldo S, Peyret P, O'Toole PW, Brugère JF. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 2014; **15**: 679 [PMID: 25124552 DOI: 10.1186/1471-2164-15-679]
- 100 **Blais Lecours P**, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R, Duchaine C. Increased prevalence of *Methanospaera stadtmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 2014; **9**: e87734 [PMID: 24498365 DOI: 10.1371/journal.pone.0087734]
- 101 **Leung DT**, Robertshaw AM, Tadesse K. Breath methane excretion in Hong Kong Chinese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; **14**: 275-278 [PMID: 1619532]
- 102 **Peled Y**, Gilat T, Liberman E, Bujanover Y. The development of methane production in childhood and adolescence. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; **4**: 575-579 [PMID: 4032171]
- 103 **McKay LF**, Eastwood MA, Brydon WG. Methane excretion in man—a study of breath, flatus, and faeces. *Gut* 1985; **26**: 69-74 [PMID: 3965369]
- 104 **Peled Y**, Weinberg D, Hallak A, Gilat T. Factors affecting methane production in humans. Gastrointestinal diseases and alterations of colonic flora. *Dig Dis Sci* 1987; **32**: 267-271 [PMID: 3816480]
- 105 **Polag D**, Leif O, Keppler F. Age dependent breath methane in the German population. *Sci Total Environ* 2014; **481**: 582-587 [PMID: 24631621 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.086]
- 106 **Palmer C**, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; **5**: e177 [PMID: 17594176 DOI: 10.1371/journal.pbio.0050177]
- 107 **Abell GC**, Conlon MA, McOrist AL. Methanogenic archaea in adult human faecal samples are inversely related to butyrate concentration. *Microb Ecol Health Dis* 2006; **18**: 154-160 [DOI: 10.1080/08910600601048969]
- 108 **Miller TL**, Wolin MJ. Stability of *Methanobrevibacter smithii* populations in the microbial flora excreted from the human large bowel. *Appl Environ Microbiol* 1983; **45**: 317-318 [PMID: 6824322]
- 109 **Woodmansey EJ**, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70**: 6113-6122 [PMID: 15466557 DOI: 10.1128/AEM.70.10.6113-6122.2004]
- 110 **Claesson MJ**, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108** Suppl 1: 4586-4591 [PMID: 20571116 DOI: 10.1073/pnas.100097107]
- 111 **Dridi B**, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of archaea. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2038-2044 [PMID: 21680581 DOI: 10.1093/jac/dkr251]
- 112 **Lewis S**, Cochrane S. Alteration of sulfate and hydrogen metabolism in the human colon by changing intestinal transit



### 1.2.3 FACTEURS INFLUENÇANT L'APPARITION DES ARCHÉES DANS LE MICROBIOTE

L'environnement et l'alimentation semblent jouer un rôle important dans l'acquisition et la présence des méthanogènes. Ce sont vraisemblablement ces facteurs qui sont mis en évidence aux travers d'études menées sur des ethnies différentes : ainsi, en 1980, Pitt et al. ont effectué des tests sur le souffle de 256 employés de l'hôpital de Toronto au Canada (118 hommes et 138 femmes) âgés de 19 à 59 ans. Il ont montré qu'il existait un plus grand nombre de sujets méthano-excréteurs chez les caucasiens et les afro-américains que chez les orientaux et les indiens [235]. Dans une seconde étude menée sur plus d'un millier de personnes âgées de 14 à 80 ans issues de quatre communautés différentes d'Afrique du sud (noirs habitant en ville, noirs habitant en milieu rural, blancs et indiens), un plus grand nombre de méthano-excréteurs est retrouvé chez les noirs habitant en ville ou en milieu rural avec respectivement 84 % et 72 % que chez les blancs ou les indiens avec respectivement 52 % et 41 % [236]. Des études basées sur le test de la présence de méthane dans le souffle a aussi souligné la grande variabilité de la prévalence des producteurs de méthane dans différentes populations géographiques et ethniques [237].

#### 1.2.3.1 *Sexe*

Les premières études conduisant à des liens entre le sexe des sujets et la présence de méthanogènes ont été entreprises par Pitt et al (1980). Une plus grande prévalence de méthanogènes chez les femmes comparées aux hommes est observée. La production de méthane dans cette population adulte de 256 sujets était de 41 %. Cependant, elle était significativement plus élevée chez les femmes (49 %) comparé aux hommes (33 %). Ces résultats ont également été observés à l'intérieur des groupes ethniques [235]. Cette haute prévalence chez le sexe féminin a également été observée dans l'étude de Hoff et al (1986) [238]. Ces résultats restent controversés, d'autres études du même type n'ont pas permis de mettre en évidence de prévalence liée au sexe [239, 240, 237].

#### 1.2.3.2 *Alimentation et sécrétions*

La composition de l'apport alimentaire affecte la disponibilité quantitative et qualitative des substrats pour le microbiote colique. Ainsi, le régime alimentaire interfère dans le développement du microbiote pendant la petite enfance et conditionne le microbiote hydrogénotrophe [241]. L'allaitement maternel est associé à une hausse de production d'H<sub>2</sub>S, dans la matière fécale du nourrisson par rapport à l'allaitement avec des préparations à base de soja, qui sont associées à une forte production de CH<sub>4</sub> et de H<sub>2</sub>S [242]. Ces observations indiquent que le développement du microbiote méthanogène se fait dès l'enfance. Christl et al. (1992) ont testé un changement d'alimentation sur 6 individus méthano-excréteurs. Les sujets ont

été nourris avec une alimentation à faible teneur en sulfate pendant 34 jours, une concentration 10 fois plus élevée en sulfate a été administrée entre le 11<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour. Durant cette période de 10 jours, le dénombrement a révélé une augmentation des bactéries sulfato-réductrices (SRB), et une diminution du méthane excrété pour 3 des 6 sujets. Ces résultats suggèrent une présence initiale de SRB chez ces 3 candidats qui n'a pu être détectée qu'une fois l'alimentation enrichie en sulfate. Aucun changement n'a été détecté sur les 3 autres candidats de l'expérience, probablement dû à une absence initiale de SRB. Jusqu'à présent aucun effet direct de l'alimentation sur le microbiote méthanogène n'est clair. Ainsi, l'absence de corrélation entre la production de méthane et le régime alimentaire peut également indiquer que la production intestinale de méthane repose davantage sur des sources endogènes telle que la mucine plutôt que sur des substrats alimentaires [243, 244]. Le microbiote déjà installé a également son importance : la présence de certaines bactéries telles que *Bacteroides fragilis* possédant une activité sulfatase (capables de libérer le sulfate sous une forme libre) aide à la prolifération des SRB [245]. Cependant, nous savons que la concentration d'H<sub>2</sub> dans le souffle augmente après l'ingestion de glucides non résorbables, et également que la concentration de CH<sub>4</sub> n'augmente sensiblement qu'après l'ingestion de certains composés, notamment des fibres lentement fermentées [237]. Ceci peut être expliqué par la séparation physique du site primaire de fermentation d'hydrate de carbone, de celui des fibres et la production de CH<sub>4</sub>. Le transit lent des fibres alimentaires leur permettrait d'atteindre la partie distale du côlon, lieu majeur de la méthanogenèse [229, 246]. Une étude de localisation des méthanogènes a été effectuée par Pochart et al. (1993) par énumération culturale réalisée par la technique de Pyxigraphie, qui consiste à suivre une capsule ingérée, destinée à faire des prélèvements au niveau du côlon. Cette étude montre que les méthanogènes coloniseraient préférentiellement la partie distale du côlon [247]. Cela serait dû à une sensibilité de ces derniers aux sels biliaires. En effet, des comparaisons de cultures microbiennes réalisées à partir de prélèvements provenant de régions proximales et distales du côlon pour 10 sujets (6 méthano-excréteurs et 4 non méthano-excréteurs) montrent l'impact des sels biliaires sur la prolifération des archées. Ces observations vont de pair avec ce qui a été rapporté dans l'étude réalisée par Florin et Woods (1995). L'addition de la bile à différentes concentrations (0,3 - 3 - 10 et 30 %) à des selles méthanogènes positives inhibe la prolifération de ces dernières de manière dose-dépendante. Un maximum d'inhibition est atteint à 10 % soit 1,4 µM, ce qui avoisine les concentrations *in vivo* au niveau iléal qui sont de l'ordre de 1 µM\* [248]. Les méthanogènes s'installeraient préférentiellement dans les parties basses de l'appareil digestif compte tenu du fait que les sels biliaires sont plus présents dans les parties hautes (intestin grêle) et que 85 % sont réabsorbés au niveau de l'iléon terminal [249]. Toutefois, les études des génomes de méthanogènes intestinaux montrent la présence des gènes de résistance aux sels biliaires chez certains d'entre eux (*Mb. smithii*, *Ms. statdtmanae*), probablement acquis par transfert horizontal à partir de bactéries commensales [89, 231]. De plus, par recherche de marqueurs moléculaires spécifiques, des méthanogènes ont été retrouvés dans différentes sous-régions du côlon [229].



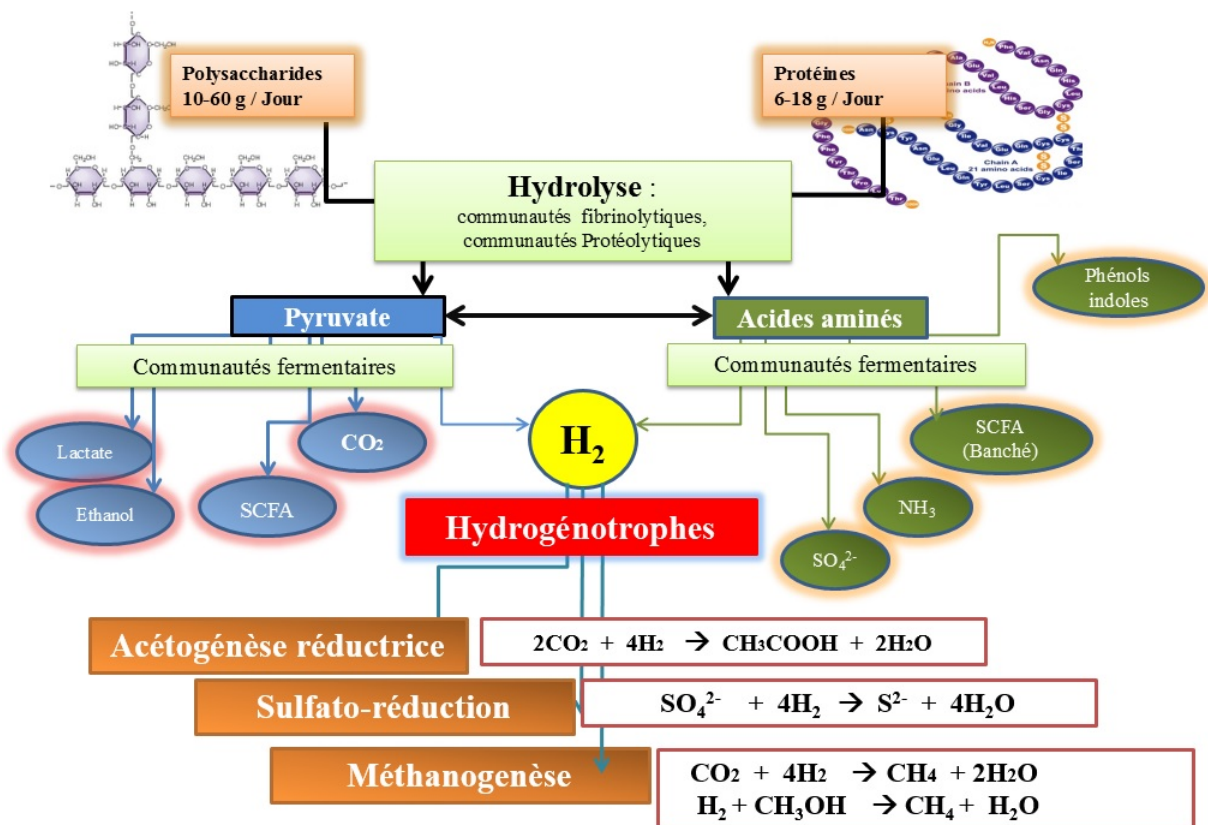


FIGURE I.2.5: Hydrogénotrophes du microbiote intestinal

### 1.2.3.3 Temps de transit

Les archées ont généralement un temps de génération plus long que la plupart des bactéries. En absence d'attachement, elles auraient besoin d'un temps de transit lent pour ne pas être éliminées de l'intestin par les selles. Il semble qu'un temps de transit plus lent favorise l'implantation des archées. Il est en effet établi que le temps de transit d'un individu méthano-excréteur est plus lent que celui d'un non-méthano-excréteur : dans une étude réalisée par Cloarec et ses collaborateurs (1990), un ralentissement du transit intestinal a été observé chez les sujets méthano-excréteurs [250]. Dans cette étude, des volontaires sains qui produisaient du méthane suite à un breath-test (basé sur l'élévation d'H<sub>2</sub> pendant les tests expiratoires après ingestion de lactulose) ont un temps de transit oro-cecal de 111 min contre 68 min chez les sujets ne produisant pas de méthane. De façon similaire, un temps de transit intestinal moyen de 84,6 H est retrouvé chez des producteurs de méthane par rapport à 48,6 H pour les non excréteurs de méthane [251]. Cette association est encore soutenue par d'autres études [252, 253] sans pour autant fournir une réponse claire sur la relation de cause à effet entre le méthane et le transit. Selon Triantafyllou et al. (2013), le méthane agirait comme un transmetteur neuromusculaire qui ralentirait la propagation du mouvement péristaltique [254].

### 1.2.3.4 Age

Précédemment abordé lors de l'impact de la nutrition dans l'apparition des méthanogènes, le dégagement de méthane a été noté dans des selles de nourrissons [242]. Ceci montre que les méthanogènes peuvent être présents très tôt dans la vie d'un individu. Dans d'autres prospections menées sur des nourrissons et des enfants âgés de 3 mois à 5 ans, il a été observé que l'apparition de méthanogènes ne se faisait qu'après le 27<sup>ème</sup> mois. Cette prévalence augmente avec l'âge, leur incidence passant ensuite de 40 % à l'âge de 3 ans à 50 % à 5 ans [255]. Sur 115 enfants Nigériens en bonne santé, Hudson et al (1993), montre que 6 % des enfants de moins de 2 ans (n=68), et 40 % des enfants de 2 à 6 ans (n=47) sont méthano-excréteurs [240]. L'analyse réalisée sur des Néo-Zélandais montre également qu'une forte proportion des enfants âgés de 3 mois à 10 ans (25 %) sont méthano-excréteurs [237]. Dans l'étude de Palmer et al (2007), un nouveau-né sur 2 (n=14) présentait des méthanogènes, mis en évidence par biopuce à ADN [174]. Toutefois, l'étude de Mihajlovski et al (2010) ne détecte des méthanogènes que pour un nouveau-né sur 23 analysés, par recherche du marqueur moléculaire *mcrA* par PCR réalisées sur de l'ADN microbien de selles. Dans ces deux études, l'âge des sujets était inférieur à 2 ans. Les méthodes, les marqueurs moléculaires utilisés ont probablement leur importance, tant au niveau de leur spécificité que de leur sensibilité [17].

La prévalence semble augmenter à l'âge adulte : c'est le cas d'une étude de Hudson et al., (1993) où le nombre de méthano-excréteurs atteint 77 % chez les adultes (n=159 [240]. Dans l'étude menée par Levitt et al. (2006), la prévalence était de 42 % chez des personnes entre 25 à 59 ans. Ce dernier taux semble être stable à l'âge adulte [237]. L'âge présente de plus fortes

corrélations avec la présence de méthane et de méthanogènes comparés aux caractéristiques énumérées jusqu'à présent, ce qui justifie ici des investigations plus approfondies.

#### I.2.4 MICROBIOTE INTESTINAL DE LA PERSONNE ÂGÉE ET ARCHÉES MÉTHANOGÈNES

Le vieillissement ou sénescence est un processus physiologique qui entraîne une dégradation lente des fonctions des organismes. Les principales altérations qui surviennent sont en premier lieu moléculaires et cellulaires. Elles entraînent des dommages qui s'accumulent pour donner le phénotype du vieillissement [256]. En ce qui concerne le tractus digestif, la bouche est en premier lieu affectée : des problèmes de dentition et l'affaiblissement des muscles de la mâchoire entraînent des problèmes de mastication. De plus, les sécrétions salivaires censées aider la mastication sont diminuées, ce qui a des impacts sur le bol alimentaire et rend l'ingestion des aliments plus difficile [257]. On note également des problèmes sensitifs (perte du goût et de l'odorat) qui induisent une altération de l'alimentation [258]. Des difficultés à la déglutition ont également été remarquées chez les personnes âgées [259]. La perte d'appétit mène à une atrophie de l'estomac d'où un ralentissement de la vidange gastrique [260]. Ce phénomène infère des anomalies d'absorption de nutriments essentiels [261]. Cependant, peu de modifications sont observées au niveau de l'intestin grêle [262, 261]. Les modifications les plus marquantes sont surtout observées au niveau colique [263]. La constipation est l'un des résultats de ces modifications, elle résulterait d'une dégénération du système nerveux entérique [264]. Le transit intestinal étant ralenti, les fermentations protéiques sont accentuées et entraînent une hausse de la concentration d'urée, d'ammoniac, de produits phénoliques, indoliques, d'amines et de sulfure d'hydrogène qui, en forte concentration, deviennent délétères pour l'organisme [201]. Bon nombre de ces facteurs accentués avec le vieillissement ont été décrits précédemment comme favorisant l'apparition des archées. Ce sont donc des explications possibles au constat d'une plus grande prévalence et plus grande quantité d'archées méthanogènes chez la personne âgée : Une étude menée sur un groupe de 129 individus dont 66 méthano-excréteurs, montre que la proportion de ces derniers est plus importante chez les personnes âgées de plus de 59 ans avec l'établissement d'une relation entre l'âge et la concentration de méthane expirée [14]. Également, dans le laboratoire, la prévalence des archées méthanogènes a été estimée dans deux groupes d'individus : adultes (de 25 à 45 ans, n=20) et personnes âgées (de plus de 70 ans, n=20). La proportion des *Methanobacteriales* passe de 60 % chez les adultes à 80 % pour les personnes âgées et celles des *Methanomassilicoccales* de 10 % à 40 % [17]. Ces résultats sont retrouvés dans d'autres études : Dridi et al (2012) ont estimé la présence de *Mb. smithii* et de *Mmc. luminyensis* dans des groupes d'âges différents : adultes (de 25 à 45 ans, n=56), adultes matures (de 45 à 60 ans, n=86) et personnes âgées (de 60 à 100 ans, n=204) avec une prévalence d'archées méthanogènes augmentant avec l'âge, notamment celle de *Mmc. luminyensis* passant de 2,3 % chez les adultes matures à 6 % chez les personnes âgées [234]. En 2010, Biagi et al. ont analysé les microbiotes de centenaires, de personnes âgées ainsi que ceux d'adultes. La comparaison montre que le microbiote de personnes âgées et les centenaires comportent plus de méthanogènes que les jeunes adultes, avec respec-

tivement  $1,48.10^4$ ,  $1,98.10^5$  et  $4,58.10^4$  méthanogènes par g de selles [265]. De plus, dans une étude basée à la fois sur du séquençage d'amplicons 16S et de la métagénomique, *Mb. smithii* était significativement plus abondant chez les personnes âgées en soins intensifs comparé aux personnes âgées vivant en communauté [266]. Cette augmentation chez les personnes âgées a été associée aux i) modifications gastro-intestinales et ii) aux modifications du microbiote digestif qui surviennent avec le vieillissement.

Ces mêmes modifications physiologiques ont des répercussions sur le microbiote intestinal en créant une dysbiose. En effet, l'analyse du microbiote de groupes d'individus de différents âges montre que les bactéries impliquées dans la fermentation des glucides des genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* et *Prevotella* diminuent significativement chez les personnes âgées. Les bactéries impliquées dans la fermentation protéique telles que *Enterococcus* sont inversement augmentées [10, 11]. Les mêmes conclusions ont été tirées par Woodmansey et al. (2004) avec cette fois-ci une augmentation des groupes *Fusobacterium* et *Propionibacterium*, bactéries considérées comme plutôt délétères [267]. Ces résultats sont cependant contradictoires avec ceux obtenus par Makivuokko et al. (2010) [268]. La modification de 20 genres bactériens a été mise en évidence par la biopuce HitChip développée par Rajilic-Stojanovic et al. (2009), avec augmentation des *Actinobacteria*, des *Bacilli*, des *Clostridium cluster XV* et la diminution des groupes *Clostridium XIV*, des *Bacteroidetes* et des *Proteobacteria*, donnant des résultats semblables à ce qui a été rapporté précédemment [269].

La HitChip a été également utilisée pour analyser le microbiote fécal d'adultes, de personnes âgées et de centenaires. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre adultes et personnes âgées alors que les centenaires présentent une augmentation des bactéries anaérobies facultatives telles que des *Proteobacteria*, des *Bacilli*, des *Actinobacteria* et une diminution des *Clostridium cluster XIV*, de *Ruminococcus albus* et de *Faecalibacterium prausnitzii* par rapport aux deux autres groupes [265]. Ces derniers sont connus pour leur activité fermentaire des glucides et la production d'AGCCs essentiels. Des analyses plus récentes de cohortes plus importantes en utilisant le séquençage à haut débit [270] ont montré que le microbiote est assez stable avec le vieillissement chez des personnes saines, similairement aux résultats de Claesson et al. (2010) [271]. Le plus grand décalage est observé quand les personnes sont sous traitement antibiotique. La résistance des archées aux antibiotiques classiques fournit une hypothèse quant à leur plus grande présence chez les personnes âgées chez lesquelles ils sont régulièrement prescrits, en permettant la sélection de ces microorganismes [270].

#### 1.2.4.1 Archées méthanogènes et système immunitaire

Les recherches visant à définir le rôle fonctionnel des archées du tractus digestif dans l'intestin humain sont principalement axées sur les aspects énergétiques et les interactions syntrophiques avec d'autres communautés bactériennes [231]. De récentes études montrent que les archées sont également capables d'interagir avec les cellules immunitaires [15]. Bang et al., (2014) ont étudié la reconnaissance immunitaire des souches de *Mb. smithii* et *Ms. stadtmanae*

par les cellules épithéliales (cellules Caco-2 / BBE). Cette analyse s'est faite par la qualification et la quantification de l'expression des différentes cytokines pro-inflammatoires libérées [15]. L'absence de réponse spécifique par l'épithélium vis-à-vis des archées testées indique qu'il existe une reconnaissance qui permet à ces archées d'être épargnées et qu'elles forment de véritables commensales de l'hôte. Cette reconnaissance est permise et conditionnée par les enveloppes externes spécifiques, décrites précédemment. Toutefois, des sécrétions de peptides antimicrobiens (AMP) qui peuvent atteindre l'intégrité des membranes archéennes ont été remarquées [272, 15]. La stimulation du système immunitaire par *Ms. stadtmanae* et *Mb. smithii* a également démontré une sévère réponse pro-inflammatoire via les cellules périphériques mononuclées, et les cellules dendritiques dérivées de monocytes moDCs, avec une intensité plus importante par *Ms. stadtmanae* [15, 273]. Après leur reconnaissance des motifs MAMPS (Microorganism-associated molecular patterns), une réponse immunitaire innée est enclenchée. Il en résulte la production de cytokines et la libération ainsi que l'activation des AMPs [274]. Puisque seulement deux protéines flagellaires putatives dans le génome de *Mb. smithii* et aucune dans le génome de *Ms. stadtmanae* ont été retrouvées [89, 231], Bang et al. (2012) se sont intéressés aux mécanismes de reconnaissance par des récepteurs Toll Like (TLR) et Nod Like (NLR) connus pour reconnaître les MAMPS bactériennes [275]. En vue de la nature de la paroi des archées, la reconnaissance par TLR5, spécifique à la reconnaissance des flagellines bactériennes, a été exclue. Les études ont donc été menées avec d'autres types de TLR (TLR3,7, 8 et 9) capables de reconnaître des virus [272]. Celles-ci n'ont également donné aucun résultat [15]. Après élimination, le TLR2 serait celui qui interviendrait, décrit comme ayant la capacité de recruter et d'activer des macrophages et des DCs par le biais d'archéosomes [276, 277]. Les archéosomes sont composés à partir de lipides polaires et d'éther qui proviennent d'archées telles que *Mb. smithii*. Ces derniers sont capables d'induire une différenciation des cellules CD8+ ainsi que des lymphocytes T [278].

Les archées peuvent également induire une réponse immunitaire adaptative. En effet, l'expression d'IgG sériques a été observée dans le plasma de souris immunisées avec des lysats cellulaires de *Mb. smithii* et *Ms. stadtmanae*. Le taux d'IgG sériques est significativement plus élevé en présence de *Ms. stadtmanae* : celle-ci induit une expression trois fois plus élevée de cellules dendritiques myéloïdes (CDm) dans les voies respiratoires des souris immunisées comparé à celle observée chez *Mb. smithii* [273]. Chez l'homme, des IgG sériques spécifiques à *Ms. stadtmanae* ont été retrouvées dans les selles humaines après une analyse réalisée chez des sujets sains ou souffrant de maladies chroniques inflammatoires (MICI,[279]). Le taux d'IgG spécifiques de *Mb. smithii* est similaire dans les deux groupes, alors que ceux spécifiques de *Ms. stadtmanae* sont plus importants chez les patients atteints de MICI. Ainsi, il semblerait que la présence de *Ms. stadtmanae* est intimement liée aux MICI (Blais-Lecours et al., 2014). En présence des deux méthanogènes, il y a également activation des monocytes dérivés des cellules dendritiques (moDCs), ce qui traduit une induction de la phagocytose par des macrophages [15]. Durant la réponse adaptative, la surexpression des récepteurs de cellules dendritiques CD86+ et CD197+ sur les surfaces cellulaires des moDCs a également été démontrée, en présence de *Ms. stadtmanae* et *Mb. smithii* [280, 281].

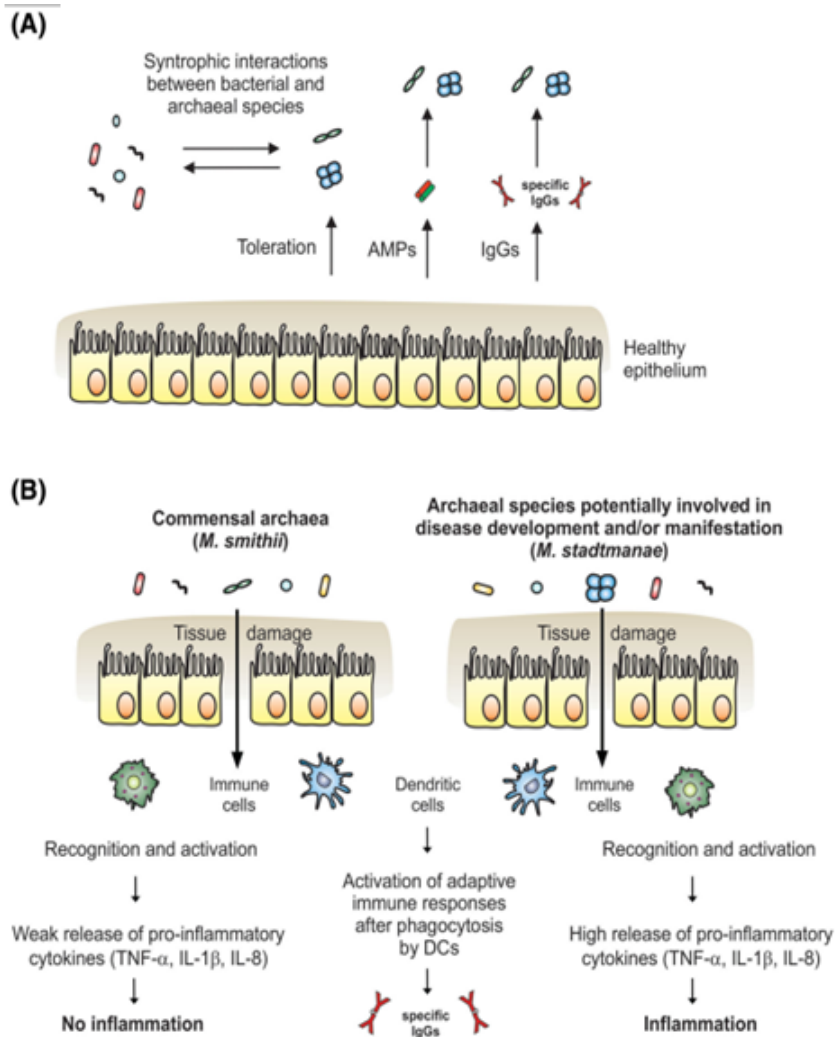


FIGURE I.2.6: Interactions potentielles entre les archées méthanogènes et le système immunitaire humain.

Modèle hypothétique des capacités immunomodulateurs des espèces d'archées présente chez l'homme est représenté ici. Chez les individus sains (A), Les archées sont impliquées dans les processus de fermentation, tolérées par les cellules épithéliales intestinales et peuvent induire des réponses immunitaires adaptatives.

En outre, methanoarchaea sont sujettes aux effets lytiques des peptides anti-microbiens MAP, cependant, ils ont la capacité de réguler leur libération. (B) En cas de dommages des tissus, certaines espèces d'archées comme *Ms. stadtmanae* peut potentiellement être impliqués dans les processus inflammatoires (directement ou indirectement) conduisant à des réponses immunitaires systémiques. En revanche, les archées commensales comme *Mb. smithii* ne peuvent induire que des réponses immunitaires bénignes [274].



Les études visant à décrire l'interaction des archées du tractus intestinal et le système immunitaire sont encore récentes, des données supplémentaires sont nécessaires pour établir de vrais liens. Toutefois, les méthanogènes vivants dans le tractus digestif semblent être en mesure d'induire des réponses immunitaires adaptatives spécifiques. Si, pour l'heure, aucune archée n'a été détectée comme pathogène, ces modulations du système immunitaire et des propriétés parfois pro-inflammatoires questionnent.

#### 1.2.4.1.1 *Archées méthanogènes et pathologies associées*

Million et al. (2012 ; 2013) estiment la population méthano-excrétrice entre 64 % et 89 %. Un nombre important d'études a émis des corrélations entre la présence des méthanogènes, le taux de méthane excrété et le développement de pathologies digestives. Les maladies associées et les résultats des études ont été résumés dans le tableau 2 de la revue publiée de ce chapitre. Nous allons compléter le tableau en exposant les possibles implications de méthanogènes dans certaines pathologies.

#### 1.2.4.1.2 *Parodontites et infections endodontites*

La parodontite est le résultat de réponses pro-inflammatoires excessives de l'hôte au microbiote durant les premiers stades de développement de la maladie. C'est une maladie poly-microbienne présentant des signatures taxinomiques nombreuses et donc moins efficaces comme facteurs prédictifs de la maladie [282]. Certains ont tenté d'identifier les acteurs clés [282, 283, 284], et un lien avec les archées est toujours maintenu. L'ensemble des données recueillies d'études menées sur la caractérisation du microbiote des gencives atteintes d'infections parodontales a été rassemblée par Nguyen-Hieu et al. (2013). L'analyse a révélé l'augmentation de la prévalence des archées méthanogènes. Celles-ci sont globalement retrouvées chez 41 % des patients atteints de parodontites et 55 % chez ceux avec des poches parodontales infectées, contre 6 % chez les sujets sains et 5 % de ceux porteurs de sites parodontaux sains [161]. Différentes archées sont détectées avec une fréquence plus élevée pour *M. oralis* [285, 286, 287, 288]. *Mb. smithii* a également été détectée dans les plaques sous-gingivales [289, 290]. La détection de *Methanosarcina spp* a été liée à la présence de dommages tissulaires [291]. Enfin, il a également été retrouvé des séquences de *Thermoplasmatales* [292, 162] que nous savons être maintenant des *Methanomassilicoccales*. La sévérité de la parodontite a été corrélée avec la charge en *Mb. oralis* dans des prélèvements de plaques sous-gingivale de patients atteints de parodontites. La quantification par PCRq montre que la diminution des méthanogènes coïncide également avec une amélioration de l'état parodontal après traitement [160]. Bartold et Van Dyke (2013) suggèrent que le changement des micro-environnements et la création de nouvelles niches, favorisent l'installation de micro-organismes, notamment les archées [293]. La méthanogenèse permettrait de promouvoir indirectement la maladie parodontale chez certains patients, en jouant le rôle de dissipateur d'hydrogène, permettant ainsi la prolifération d'un ou plusieurs pathogènes hydrogénophiles [294]. Des recherches antérieures

ont montré que la plaque sous-gingivale à maturité fournit l'environnement réduit nécessaire à la croissance de microbes anaérobies [295]. Pour mieux comprendre l'origine exacte de ces infections, l'étude des interactions syntrophiques entre les archées et d'autres membres du microbiote sous-gingival est nécessaire.

#### 1.2.4.1.3 Anorexie et obésité

Un nombre important d'études a établi un lien entre la présence de méthanogènes et les personnes à fort IMC (indice de masse corporelle). La présence de *Mb. smithii*, le méthanogène le plus fréquent dans ce contexte, faciliterait le gain de poids. Ce phénomène impliquerait des relations syntrophiques avec d'autres micro-organismes à fort potentiel fermentaire tels que les *Bacteriodes* ou encore *Lachnospira* impliquée dans la dégradation de la pectine.

Dans l'étude de Samuel et Gordon (2006) la co-colonisation de *Mb. smithii* associée à *Bacteroides thetaiotaomicron* chez des souris gnotobiotiques conduit à une augmentation significative de l'adiposité chez l'hôte, ce qui n'a pas été observée lors de l'association de *B. thetaiotaomicron* et *Desulfovibrio piger*, une SRB. L'analyse des transcrits montre un changement au niveau des voies fermentaires empruntées. Contrairement à la co-colonisation avec *D. piger*, *Mb. smithii* modifie le potentiel fermentaire de *B. thetaiotaomicron* en orientant les fermentations de *B. thetaiotaomicron* vers des sucres tels que les fructanes alimentaires, produisant de l'acétate et du formate utilisables par *Mb. smithii* [230]. L'archée stimule l'utilisation de polysaccharides par la bactérie ce qui permet d'accroître le bilan énergétique. De plus, la résorption d'hydrogène par *Mb. smithii* permet aux organismes syntrophiques d'être plus productifs, favorisant les rendements de fermentation et augmentant la production de AGCCs et par conséquent la disponibilité de calories pour l'hôte [296]. Dans la quasi-totalité des études menées sur les liens possibles entre la présence des méthanogènes et le fort IMC, une association à des groupes bactériens a été mise en évidence. Il s'agit des producteurs d'hydrogène tels que les *Prevotellaceae* et certains groupes de *Firmicutes* [297]. Chez les sujets obèses, ces bactéries productrices d'H<sub>2</sub> coexistent avec une proportion d'archées méthanogènes qui peut atteindre 12 % des microorganismes dans les voies gastro-intestinales [247]. Ces bactéries travaillent en collaboration avec les méthanogènes et contribuent à l'amélioration de l'absorption des nutriments. Ceci stimule aussi l'immunité de l'hôte et entraîne une modification de l'expression des gènes de ce dernier pour une meilleure absorption [298]. Dans une étude sur des sujets atteints d'anorexie nerveuse, la proportion de *Mb. smithii* a été retrouvée augmentée lors de l'analyse des microbiotes. Ce résultat contradictoire en apparence par rapport au cas de l'obésité peut s'expliquer comme une adaptation vers une exploitation optimale de l'apport calorique, dans ce cas très faible [299].

La constipation a également été liée à la présence des méthanogènes chez des sujets humains [300]. Dans un modèle *in vivo*, la présence de méthane (gazeux) ralentit directement le transit dans l'intestin [252]. Ce ralentissement conférerait à l'organisme plus de temps à l'absorption des nutriments, ce qui représente un autre mécanisme potentiel de gain de poids.



Cette corrélation entre l'obésité et la présence de méthanogènes n'a pas été observée dans d'autres études [301, 302].

#### 1.2.4.1.4 Pathologies digestives

La production de méthane a également été corrélée (négativement ou positivement), aux pathologies digestives telles que les MICI (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), le cancer colorectal (CCR) et le syndrome de l'intestin irritable (SII) ou la constipation (Tableau 2 ; revue). Selon Haines (1977), la prévalence de méthano-excréteurs serait beaucoup plus importante chez les personnes atteintes de cancer colorectal contrairement à des individus sains [303]. La sévérité des cancers aurait également un lien avec le taux de méthane excrété [239]. Dans l'étude de Segal (1988) précédemment décrite, les résultats ont montré qu'un plus grand nombre de méthano-excréteurs est retrouvé chez les noirs par rapport aux caucasiens et aux indiens [236]. Ce fait est contradictoire avec les résultats annoncés auparavant, puisque la prévalence des personnes possédant un cancer colorectal étaient plus importante chez les caucasiens par rapport aux noirs vivant en milieu rural. Cette corrélation a également été sujette à controverse dans de nombreuses autres études [304, 305]. On ne connaît pas encore le mécanisme par lequel les méthanogènes sont impliquées dans les maladies intestinales. Toutefois, le 1<sup>er</sup> effet suspecté est relié au CH<sub>4</sub> lui-même. Comme stipulé dans ce chapitre, le CH<sub>4</sub> serait impliqué dans la régulation de la fonction motrice intestinale. La mesure de l'activité contractile iléale en réponse à l'exposition au CH<sub>4</sub> montre que ce dernier serait une molécule bioactive qui influencerait l'activité de l'intestin [252, 306]. Les recherches montrent que le CH<sub>4</sub> affecterait l'activité de la sérotonine (5-hydroxytryptamine) un neurotransmetteur qui, entre de nombreuses fonctions, participe au contrôle péristaltique de l'intestin. La sérotonine peut (i) stimuler les neurones cholinergiques pour libérer de l'acétylcholine, ce qui se traduit par la contraction des muscles lisses, ou bien (ii) stimuler les neurones inhibiteurs nitrinergiques pour libérer de l'oxyde nitrique, ce qui entraîne la relaxation des muscles lisses [307]. La majorité de la sérotonine du corps humain se trouve produite par les cellules entérochromaffines dans le TGI. Cette sérotonine sérique est retrouvée à des niveaux élevés chez des sujets atteints de SII associé à des diarrhées (accélération du transit, [308, 307]. Une autre étude a révélé que le méthane halogène est en mesure d'inhiber l'absorption pulmonaire de la sérotonine chez le rat, l'empêchant d'effectuer son rôle de neurotransmetteur en présence de CH<sub>4</sub> [309, 310]. Cela reste cependant des suppositions, il est encore difficile de savoir si ces deux molécules coopèrent pour influencer la fonction motrice de l'intestin.

## OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif général de ce doctorat est de déterminer de manière plus précise le rôle des archées méthanogènes dans la physiologie digestive de l'Homme, en particulier au niveau métabolique. Ces méthanogènes apparaissent préférentiellement associées à la personne âgée, chez laquelle elles présentent également une plus grande diversité. Il s'agit là d'une population remplissant des conditions apparemment plus favorables à leur étude. Cependant, l'étude directe du microbiote intestinal chez l'Homme est difficile, pour des raisons à la fois éthiques et techniques. Ainsi, deux étapes complémentaires seront menées en parallèle, toutes deux visant à s'affranchir au maximum de toute intervention chez l'Homme.

La première étape est de déterminer quels modèles d'étude sont pertinents pour étudier ce rôle métabolique, dans le contexte microbien de l'environnement intestinal.

- Ces approches concernent en premier lieu la pertinence d'un modèle *in vivo* murin (le rat) quant à sa ressemblance avec l'Homme au niveau de l'implantation des archées méthanogènes au cours de la vie, et l'évolution parallèle du microbiote intestinal.
- En second lieu, un modèle *in vitro* sera développé de manière à permettre l'étude des archées dans l'environnement microbien intestinal humain.

La deuxième étape est d'aborder la question du rôle des archées méthanogènes à partir des capacités métaboliques des méthanogènes d'importance du microbiote intestinal humain, en particulier concernant (i) le méthanogène prépondérant du microbiote intestinal humain *Mb. smithii* et (ii) les archées de l'ordre nouvellement décrit des *Methanomassiliicoccales* :

- Comme relaté dans l'étude bibliographique précédente, l'utilisation de certains composés est d'ores et déjà bien renseignée pour les *Methanobacteriales Mb. smithii* (utilisation du formate, du CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> pour sa méthanogénèse) et *Ms. stadtmanae* (réduction en méthane du méthanol en présence d'H<sub>2</sub>). Cependant, les données génomiques de *Mb. smithii* montrent une potentielle aptitude à également utiliser du méthanol pour sa méthanogénèse (Article précédent, Gaci et al., 2014). Comme il s'agit du méthanogène majeur dans cet environnement, il s'agit de voir si son rôle peut ou non être réévalué, comme agent déplétif de ce métabolite secondaire du microbiote intestinal.

- Concernant les *Methanomassiliicoccales*, les connaissances sont actuellement très limitées. Au démarrage de ce travail, une seule souche est isolée, l'espèce *Methanomassiliicoccus*

*luminyensis* obtenue à partir de selles humaines [90]. Son génome, non-complet et non-annoté est publié [311]. En parallèle, les travaux menés à l'EA CIDAM ont permis de déterminer un autre génome, celui de l'espèce candidate *Ca. Methanomethylophilus alvus* (Mmp. alvus) [91]. Cette dernière est également issue de selles humaines : en l'absence d'isolement, ce génome a été obtenu par approche métagénomique menée sur un enrichissement cultural par utilisation de méthanol. En effet, les *Methanomassiliicoccales* présentent, pour ces deux membres, la capacité d'une méthanogenèse à partir de méthanol, sous dépendance d'H<sub>2</sub>. Également, un autre enrichissement d'une *Methanomassiliicoccale* est en culture, devant, par la même approche que celle menée sur *Ca. Mmp. alvus*, aboutir à l'obtention de la séquence d'un nouveau génome de *Methanomassiliicoccales*.

En résumé, les travaux chercheront à répondre aux questions suivantes :

- Comment étudier ces méthanogènes dans le contexte de l'écosystème digestif humain, en s'affranchissant d'interventions sur l'Homme ? Un modèle rat simule-t-il les observations faites chez l'Homme, quant à l'évolution de son microbiote intestinal au cours de la vie, et plus particulièrement de sa composante méthanogène ? Un modèle *in vitro*, simulant un écosystème microbien intestinal humain, peut-il permettre d'étudier de manière pertinente le rôle des méthanogènes dans cet environnement ?
- Quelles sont les capacités métaboliques des archées méthanogènes intestinales humaines ? En particulier, les *Methanomassiliicoccales* digestives en présentent-elles des similaires, des complémentaires, voire des nouvelles ? L'isolement de souches de cet ordre d'origine digestive humaine serait d'un apport fondamental aux déductions qui pourraient être réalisées à partir des données génomiques.

Au final, les travaux devraient permettre d'apporter une vue actualisée, voire une réévaluation du rôle des archées méthanogènes au sein du microbiote intestinal humain, afin d'en déterminer à terme les conséquences sur la physiologie digestive, et plus largement la santé de l'Homme.

Deuxième partie

RÉSULTATS



## CHAPITRE II.1

### RECHERCHE DE MODÈLES ADAPTÉS A L'ÉTUDE DES ARCHÉES MÉTHANOGENÈS INTESTINALES CHEZ LA PERSONNE AGÉE

L'étude de l'apparition des archées et de leur influence sur l'écosystème digestif de la personne âgée implique la connaissance de l'ensemble des variations qui apparaissent lors du vieillissement. Les récentes recherches qui tentent de démêler ces modifications microbiennes [266, 8] et les événements liées à ce remaniement [258], restent limitées et biaisées par de nombreux paramètres, en particulier les variations interindividuelles liées aux prédispositions génétiques, à l'environnement, à l'alimentation et au passé médical des individus. Dans le but de s'affranchir de ses biais et d'isoler l'effet vieillissement sur le microbiote, il s'est avéré nécessaire d'essayer de trouver des modèles d'étude adéquats. Tout d'abord, nous nous sommes orientés vers la recherche de modèles d'études *in vivo*, permettant sur une courte durée, dans des conditions génétiques, alimentaires et environnementales contrôlées de voir l'étendue des transformations que subit le microbiote suite aux événements supposés liés uniquement au vieillissement. En parallèle, l'étude d'un facteur associé au vieillissement, découplé des autres pour en mesurer l'importance (dans notre cas, le temps de transit) peut être réalisée *in vitro*, avec les limitations que cela impose. Ces approches *in vitro* permettent de s'affranchir de nombreux autres facteurs tels que la réponse immunologique de l'hôte et de contrôler, voir maîtriser de nombreux autres.

#### II.1.1 MODÈLE *in vivo* : ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DU MICROBIOTE ET DE SA COMPOSITION MÉTHANOGENÈ TOUT AU LONG DE LA VIE DU RAT

##### II.1.1.1 Contexte de l'étude

La souris est considérée comme le modèle d'expérimentation animale de choix. En effet, pour des raisons pratiques (mammifère de petite taille, reproduction rapide, facilité d'élevage) et budgétaire (faible coût d'entretien), elle est le modèle d'étude le plus utilisé dans les expérimentations biologiques portant sur les maladies humaines. Cependant, ce choix pourrait ne pas être aussi judicieux : il a été en effet rapporté qu'il n'avait pas été possible d'installer *Mb. smithii* chez des souris conventionnalisées, « humanisées » par remplacement de leur microbiote par un microbiote humains méthanogène [230, 312]. De plus, de grandes différences

sont observées avec l'Homme, en particulier au niveau du système immunitaire murin qui serait beaucoup plus résistant aux infections bactériennes [313]. Il faut alors systématiquement évaluer le modèle animal et le choisir en fonction des expérimentations menées. En ce qui concerne les recherches sur le microbiote intestinal, l'absence de données sur certains modèles limite les choix. Pour cette raison, une caractérisation du microbiote du rat a été établie à différents âges couvrant toute la vie du rat. Cet animal sert de modèle couramment utilisé en particulier dans la recherche pharmaceutique. De plus, comme mentionné dans l'étude bibliographique, il est fait état d'une augmentation de la population méthanogène avec l'âge, tout comme observé chez l'Homme [314, 17]. Cette étude porte donc sur le suivi de l'évolution taxinomique (variation de la composition microbienne) et métabolique (variation des AGCCs) du microbiote fécal de 56 rats Sprague-Dawley de différentes classes d'âge, obtenus et maintenus dans un environnement contrôlé (Janvier Labs, France). Leur alimentation *ad lib* a été normalisée avec un premier régime depuis le sevrage jusqu'à l'âge de 12 semaines, puis remplacé par un second jusqu'au 24<sup>ème</sup> mois, correspondant à un âge très avancé chez le rat. Les selles analysées proviennent d'animaux choisis aléatoirement dans des cages distinctes, dans des animaleries confinées.

#### II.1.1.2 *Matériel et méthodes*

##### II.1.1.2.1 *Animaux, régimes alimentaires et échantillonnage de la matière fécale*

Les selles de 56 rats Sprague-Dawley répartis en 6 classes d'âge ont été utilisées dans cette expérience. Ces selles proviennent de rats pris au hasard dans des cages différentes, animaux obtenus et maintenus dans un environnement confiné depuis leur naissance (Janvier Labs, France). Au cours de leur vie, les rats sevrés (à partir de 3 semaines post-partum) sont placés sous un premier type d'alimentation (alimentation post-sevrage enrichie en protéine), remplacée ensuite à la semaine 12 par une alimentation « adulte » *ad lib*. Les différentes classes d'âge utilisées dans cette étude correspondent à des rats de 3 semaines (au moment du sevrage, première alimentation solide), des rats de 12 semaines (remplacement par une alimentation adulte), de 14 semaines ainsi que de 6 mois, 12 mois et 24 mois. Ces 5 dernières classes d'âge sont donc toutes soumises à une alimentation identique en qualité, jusqu'à l'âge de 24 mois. Les rats utilisés présentent tous des signes de bonne santé.

##### II.1.1.2.2 *Composition microbienne du microbiote fécal*

La composition microbienne fécale est déterminée par séquençage selon la technologie Illumina MiSeq d'une portion du gène 16S. Brièvement, l'ADN génomique microbien est extrait directement des selles en utilisant le kit QIAgen DNA Stool (QIAgen, West Sussex, Royaume-Uni). La quantification des ADN est réalisée en spectrophotométrie en utilisant l'appareil NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Allemagne). Les échantillons ont

été normalisés à 10 ng par  $\mu\text{L}$ , puis acheminées à Cork en Irlande pour y être séquencés. Les régions ciblées de l'ADN 16S correspondent aux régions V3 et V4. Elles ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique bactérien extrait selon les recommandations fournies par Illumina (San Diego, USA), puis purifiées en utilisant des billes Agencourt XP (Beckman Coulter, Takeley, Royaume-Uni). Par la suite, chaque échantillon se trouve additionné de séquences nucléiques terminales, deux « codes-barres » afin de permettre un multiplexage lors du séquençage. Les ADN sont de nouveau purifiés puis regroupés avec les autres à des concentrations équimolaires. Le séquençage est réalisé ensuite selon la chimie 2 \* 300 pb (Illumina, San Diego, USA).

Les données de séquençage sont ensuite traitées avec plusieurs filtres (qualité de séquence, longueur, omission des adaptateurs et fusion des séquences des deux extrémités (paired-ends), détection des chimères,...). Les traitements bioinformatiques réalisés ensuite permettent l'obtention d'une table d'abondance de chaque OTU (QIIME, [315]). Une séquence représentative de chaque OTU est ensuite affiliée taxonomiquement en utilisant MOTHUR [316] contre la base de données référence RDP version 14 (RDP,[317]). Également, une affiliation a été réalisée de manière complémentaire en utilisant la fonction pick-closed-reference-otus.py de QIIME contre la base de données référence Greengene (version 13.5, [318]) afin de pouvoir réaliser une analyse des fonctions putatives par PICRUSt [319].

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R [320] en utilisant les tests appropriés (tests T et de Wilcoxon, appariés ou non, analyses multivariées permutacionnelles de la variance à partir de matrices de distance (pMANOVA)). Ces matrices de distances ont été calculées en utilisant des distances non pondérées UniFrac [321] et de Spearman. Une correction des tests multiples a été réalisée en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg (1995) [322].

#### II.1.1.2.3 Recherche des méthanogènes

La détection des archées a été réalisée par plusieurs méthodes. En premier lieu, une PCR simple a été effectuée par amplification du gène *mcrA* à l'aide d'amorces dégénérées [13] à partir de 20 ng d'ADN. En second lieu, une quantification de quelques archées méthanogènes digestives a été réalisée par PCRq à l'aide d'amorces spécifiques à *Mb. smithii* (ciblant le gène *mcrA*) et à une partie du gène ADNr 16S de *Ms. stadtmanae*, des *Methanomassiliicoccales* du genre candidat *Methanomethylophilus* et des *Methanomassiliicoccales* du genre *Methanomassiliicoccus*. Enfin, les archées méthanogènes ont également été recherchées dans la table d'OTUs générée par le séquençage, les amorces utilisées permettant l'amplification des régions V3-V4 des Euryarchaeota (données non présentées).



TABLE II.1.1: Prospection des méthanogènes digestifs dans les fèces de rat par PCR et PCR quantitative

	3 semaines	12 semaines	14 semaines	6 mois	12 mois	18 mois	24 mois
<i>Détection des méthanogènes en PCR</i>	0/8	0/8	0/8	0/8	5/8	7/8	8/8
<i>Détection des archées par PCRq</i>							
<i>Methanobacteriales</i>							
<i>Mb. smithii</i>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	2/8
<i>Ms. stadtmanae</i>	1/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
<i>Methanomassiliicoccales</i>							
<i>Ca . Mmc. intestinalis</i>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	6/8
<i>Ca . Mmp. alvus</i>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	1/8
<b>Total des rats porteurs d'archées méthanogènes digestives</b>	<b>1/8</b>	<b>0/8</b>	<b>0/8</b>	<b>0/8</b>	<b>0/8</b>	<b>2/8</b>	<b>7/8</b>

#### II.1.1.2.4 Analyse des acides gras à chaînes courtes

Les selles sont pesées, diluées dans 2 mL d'eau stérile puis centrifugées (8000 x g, 10 min). 85 µL d'acide 2-éthylbutyrique (49 mM) et 20 µL d'acide phosphotungstique (500 g / L) sont ajoutés au surnageant. Ces échantillons sont incubés à 4 °C pendant une nuit. La chromatographie à phase gazeuse (HP 6890 série, colonne HP-INNOVAX 30 m x 250 µm x 0,25 µm, rapport de division = 25 : 1, Agilent Technologies) permet la détection et quantification de 9 acides gras à chaîne courte (AGCCs) : acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate, isovalérate, caproate, isocaproate et heptanoate. Le 2-éthyl-butyrate est utilisé comme étalon interne. La quantité des AGCCs est rapportée au poids des fèces utilisées [323].

#### II.1.1.3 Résultats

##### II.1.1.3.1 Prévalence du portage des méthanogènes chez le rat selon sa classe d'âge

L'analyse PCR supposée cibler l'intégralité des méthanogènes (amplification du gène *mcrA*) montre que les rats sont différentiellement porteurs d'archées méthanogènes selon leur classe d'âge (Tableau II.1.1). Elles ne sont détectables qu'après le 6<sup>ème</sup> mois chez le rat. Une analyse plus détaillée sur quelques méthanogènes retrouvés chez l'Homme, réalisée par PCR quantitative confirme cette tendance. Concernant les *Methanobacteriales* ciblées, elles sont peu retrouvées (4 rats sur les 56). *Ms. stadtmanae* est retrouvé seulement chez un jeune rat de 3 semaines, alors que *Mb. smithii* apparaît chez un rat de 18 mois et est présent chez 2 rats de 24 mois. La prévalence est plus élevée pour les *Methanomassiliicoccales* et semble encore davantage liée à l'âge. En effet, ces dernières sont détectées chez 7 des 8 rats âgés de 24 mois (et 1 rat sur 8 de 18 mois, absence de détection pour toutes les autres classes d'âge). Cependant, ce phénomène n'est observé que partiellement dans les tables d'OTUs issues du séquençage, puisque seuls quelques rats seulement semblent porteurs de méthanogènes, sans corrélation claire avec l'âge. Le manque de sensibilité du séquençage (profondeur du séquençage, aux alentours de 15.000 seq. affiliées) peut expliquer cette différence observée.

##### II.1.1.3.2 Un microbiote variable selon la tranche d'âge malgré un régime alimentaire identique

Les analyses de microbiotes ont été réalisées par Burkhardt Flemer à l'Alimentary Pharmabiotic Centre de Cork (UCC, Ireland). Notons tout d'abord qu'une augmentation de l' $\alpha$ -diversité est observée avec l'âge des rats (données non présentées). Une analyse en coordonnées principales des tables d'abondance des OTUs montre que les rats se regroupent en trois grands clusters distincts (Figure II.1.1). Un premier regroupe les rats âgés de 3 semaines, ceux tout juste issus du sevrage et passant à une alimentation solide (groupe présenté en vert). Un deuxième regroupe les rats âgés de 12 à 26 semaines (groupe en bleu), tous sous alimentation dite « adulte ». Enfin, le troisième comporte exclusivement les rats âgés de 1 an et plus (groupe

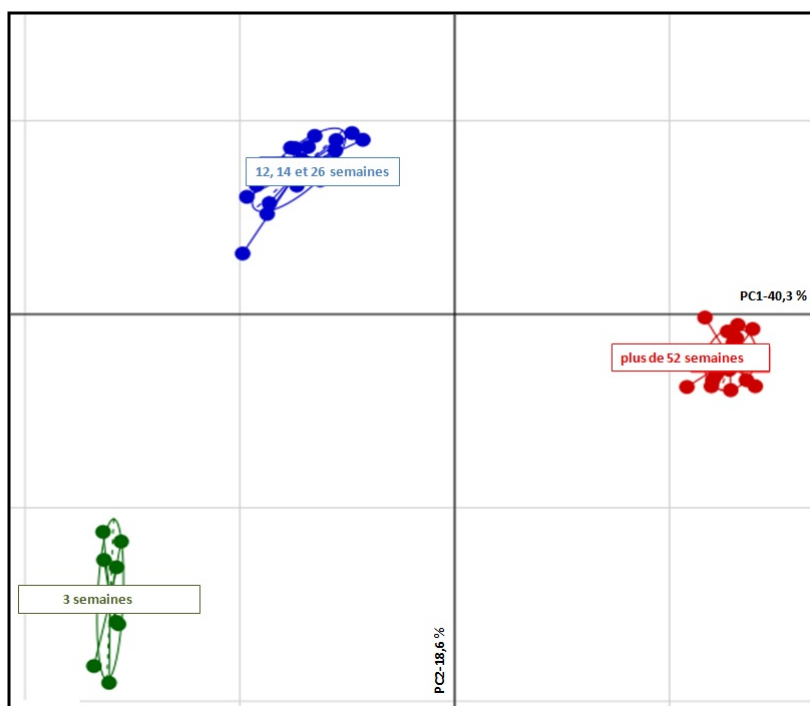


FIGURE II.1.1: Analyse en coordonnées principales des profils microbiens

L'analyse en coordonnées principales a été réalisée à l'aide du logiciel R. Elle présente une séparation remarquable des rats qui peuvent être regroupés en 3 groupes de tranche d'âge : 3 semaines (en vert), de 12 à 26 semaines (en bleu), et plus de 52 semaines (en rouge).

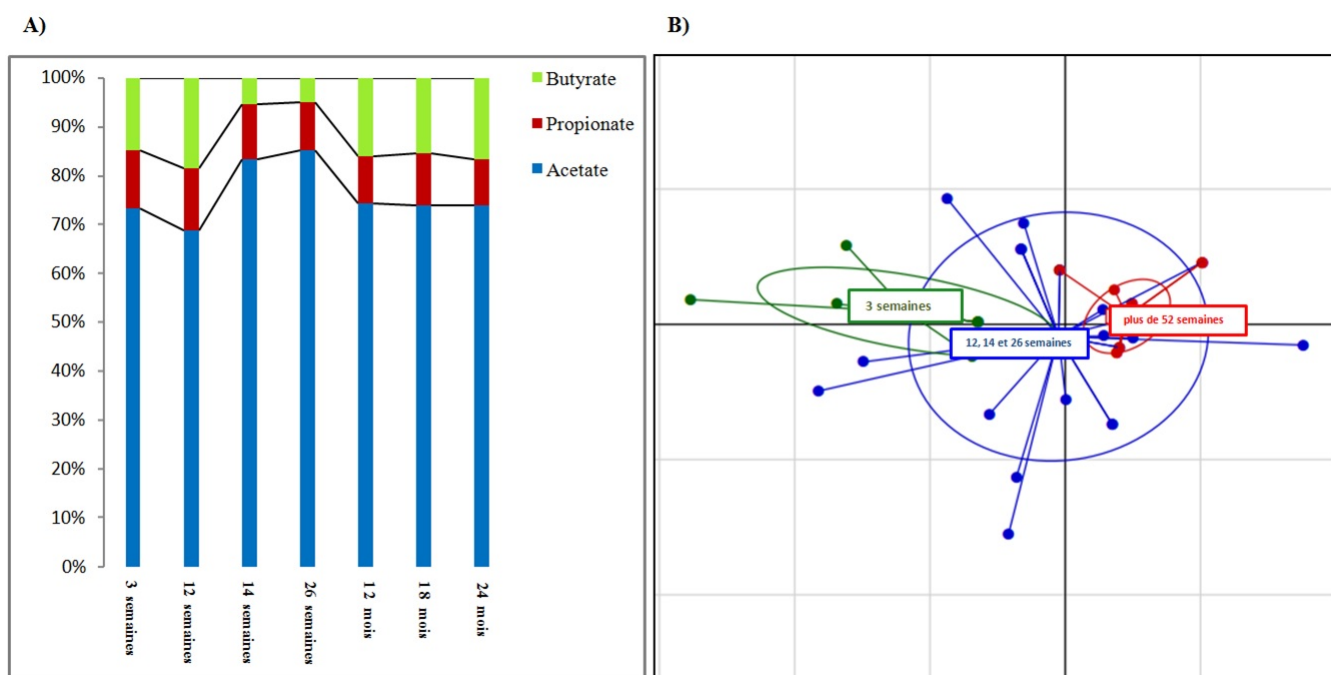


FIGURE II.1.2: Production des AGCCs fécaux chez les rats de différentes classes d'âge

Les proportions des trois AGCCs majoritaires (acétate, propionate et butyrate) sont représentées en A, montrant la part élevée de l'acétate. Une ACP basée sur 9 AGCCs fécaux des rats obtenue par le logiciel R est présentée en B. Cette dernière permet un regroupement en 3 clusters d'âges, comme observé au niveau des profils microbiens : 3 semaines (en vert), de 12 à 26 semaines (en bleu), et plus de 52 semaines (en rouge).

en rouge), également sous alimentation « adulte ». Cette nette ségrégation est associée à la différence d'abondance de plusieurs taxons bactériens. Ainsi, les groupes bactériens *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Blautia spp.*, *Clostridium XI spp.*, *Subdoligranulum spp.* et *Erysipelotrichaceae* principalement sont retrouvés en plus grande abondance chez les rats de 3 semaines comparés aux rats plus âgés (données non présentées). Le deuxième groupe se caractérise par une plus forte abondance de *Akkermansia spp.*, *Clostridium XIVa spp.*, *Lachnospiraceae*, *Alistipes spp.*, *Odoribacter spp.*. Chez les rats les plus âgés, des groupes bactériens tels que *Barnesiella spp.*, *Clostridiales*, *Ruminococcaceae*, *Clostridium IV spp.* sont fortement augmentés (données non représentées).

#### II.1.1.3.3 Des productions d'AGCCs différentes malgré un régime alimentaire identique

Les niveaux d'acétate, de butyrate, d'isobutyrate, de propionate, de valérate, d'isovalérate, de caproate, d'isocaproate et enfin d'heptanoate ont été analysés. Le profil global des AGCCs fécaux est significativement différent entre les rats jeunes et plus âgés. L'analyse des trois principaux AGCCs (acétate, butyrate et propionate) montre une production d'acétate avoisinant les 70 % tout âge confondu. La production d'acétate est ainsi plus importante que celle observée chez l'Homme, et inversement, celle de butyrate et de propionate, plus faible. A 14 semaines et à 6 mois, la production de butyrate est significativement diminuée (Figure II.1.2 A). Ainsi, rien qu'avec ces trois AGCCs majeurs, les groupes de tranches d'âge trouvés au niveau des profils microbiens semblent exister également pour les AGCCs. Ceci est vérifié par l'analyse des profils d'AGCCs en ACP (Figure II.1.2 B) : une association du profil de production d'AGCCs avec les trois grandes classes d'âge précédentes est visible, bien que la ségrégation soit moins marquée qu'au niveau bactérien. Cette ségrégation est liée en premier lieu à une production d'AGCCs considérablement augmentée avec l'âge ( $p < 0,001$  pour les rats de plus d'un an contre les rats de 12 à 26 semaines et de 3 semaines; résultats non présentés), en particulier celle des acides gras majoritaires (acétate, butyrate et propionate).

#### II.1.1.4 Discussion

Les résultats obtenus par séquençage montrent une faible variation interindividuelle de la composition du microbiote au sein de la même classe d'âge bien que les rats proviennent de cages différentes. Une nette évolution est observée au cours du vieillissement chez le rat. En effet, au-delà de 12 semaines, une fois le changement de régime alimentaire effectué, un remodelage du microbiote a été observé, remodelage important ayant lieu entre 6 mois et un an. Une répartition selon les clusters bactériens présents montre une ségrégation remarquable : les rats sont très distinctement séparés en trois groupes correspondant à trois classes d'âges distinctes. En résumé, le microbiote fécal du rat en bonne santé apparente, sous alimentation identique tout au long de sa vie, dans un environnement sanitaire contrôlé (animaleries du groupe Janvier Labs), évolue en passant par trois grandes étapes, caractérisées par l'acqui-

tion et la perte de différents groupes de micro-organismes. De manière surprenante, le groupe de rats âgés d'un an et plus, présente des caractéristiques microbiennes apparentées à celles observées chez l'Homme âgé en bonne santé et vivant en communauté : diversité  $\alpha$  plus élevée, espèces bactériennes plus abondantes (par exemple les *Ruminococcaceae* et les *Clostridium IV spp.*) En complément du séquençage, l'étude par PCR a permis de mettre en évidence que les archées méthanogènes ne sont détectables qu'après le 6<sup>ème</sup> mois de la vie du rat. Lorsque cette détection est ciblée sur quelques souches intestinales connues chez l'Homme, cette présence est principalement retrouvée dans les échantillons fécaux des rats âgés de 24 mois. Il s'agit de séquences de *Methanobacteriales* et plus encore, de *Methanomassiliicoccales*, en particulier celles du genre *Methanomassiliicoccus*. Notre étude n'exclut pas la présence d'autres méthanogènes : en effet, d'autres méthanogènes non retrouvés chez l'Homme pourraient être présents chez le rat, comme des *Methanobacteriales* autres que les espèces *Mb. smithii* et *Ms. stadtmanae*. Cependant, aucune autre archée méthanogène n'a été détectée en séquençage, mais une étude dévolue strictement aux méthanogènes amènerait une vision plus claire de cette diversité (séquençage de masse du marqueur *mcrA* par exemple). Toutefois, à la fois la prévalence et le taux de méthanogènes retrouvés restent faibles : Ceci est probablement la conséquence d'un environnement d'élevage animal contrôlé, avec des échanges avec l'environnement extérieur extrêmement limité et la qualité des conditions sanitaires des élevages au sein de Janvier Labs. Ainsi, de tels animaux semblent également indiqués une augmentation des *Methanomassiliicoccales* chez les rats âgés, comme chez l'Homme [17], mais probablement les conditions environnementales limitent l'implantation des méthanogènes, probablement du fait d'exposition restreinte, qualitativement / quantitativement, à de tels microbes. D'un point de vue métabolique / fonctionnel, les acides gras à chaînes courtes fécaux ont également été analysés : une absence d'isovalérate, de valérate et d'isobutyrate a été constatée dans les selles des nouveau-nés. Le caproate est présent dans des proportions plus importantes chez les nouveau-nés, puis décroît avec l'âge. De plus, la proportion des trois acides gras majoritaires (acétate, propionate et butyrate) est différente de celle retrouvée chez l'Homme : chez le rat Sprague-Dawley, le ratio subit un biais en faveur de l'acétate, d'environ 70 % alors qu'elle est autour de 50 % chez l'Homme. Ceci reflète l'activité métabolique du microbiote intestinal sans qu'il puisse être pour l'heure déterminé s'il s'agit d'une cause alimentaire seule, induisant des populations microbiennes acétogènes, ou bien du microbiote intrinsèquement lié au rat. Des analyses en cours montrent une augmentation de l'abondance des gènes impliqués dans la production des AGCCs avec l'âge, déduits de la composition bactérienne obtenue en analyse 16S. Ceci va de pair avec les résultats fonctionnels.

#### II.1.1.5 Conclusion et perspectives

Nos besoins de caractériser le microbiote du rat afin d'en déterminer s'il pouvait correspondre à un bon modèle d'étude des archées méthanogènes, en particulier chez l'animal âgé, nous a amené à caractériser l'évolution du microbiote fécal du rat à différents stades de sa vie. Les travaux montrent que ce microbiote évolue en fonction de l'âge, et que cette donnée est

à considérer, notamment dans le cadre d'études pharmacologiques pour cet animal modèle fréquemment utilisé. Du fait que ce microbiote peut interférer dans le métabolisme des substances testées, et de manière différente selon la nature des micro-organismes qui le compose, il est essentiel de prendre en considération les modifications qu'il peut subir. Ces modifications sont en partie comparables à celles observées l'homme, ce qui fait du rat un modèle de choix pour l'étude de ces modifications, dans des conditions d'élevage très contrôlées. Cela justifie des études plus approfondies pour contribuer à la compréhension des relations entre vieillissement, alimentation et santé. Cependant, dans notre cas, peu d'archées méthanogènes ont été retrouvées, contrairement à ce que laissait supposer la bibliographie. Les conditions d'élevage, dans des conditions environnementales très contrôlées, peuvent expliquer cette différence avec d'autres études, ceci nous permet d'entrevoir deux hypothèses :

- soit le microbiote du rat âgé n'est pas aussi permissif à l'introduction / développement d'archées méthanogènes qu'on aurait pu l'imaginer, une fois un microbiote installé.

- soit les contraintes environnementales drastiques de l'élevage murin sont telles qu'elles empêchent une contamination par des archées méthanogènes à des seuils suffisants. Une analyse de l'étude de Mathur et al. (2013) révèle ainsi que *Mb. smithii* est présent dès l'âge de 21 jours chez le rat Sprague-Dawley, colonisation indésirée au départ de l'expérience [324]. Il a été cependant possible d'augmenter sa quantité dans les selles par gavage.

Ainsi, les données bibliographiques actuelles et les nôtres restent insuffisantes pour indiquer si le rat âgé peut s'avérer un bon modèle d'étude des archées méthanogènes. Nous supposons que l'environnement de l'animalerie joue un rôle primordial dans la présence des archées, facteur difficile à maîtriser. L'utilisation d'animaux gnotobiotiques puis colonisés pourraient être une solution alternative. Ceci nous amène à envisager tout d'abord des modèles plus faciles à élaborer.

### II.1.2 MODÈLE *in vitro* ECSIM

Bien qu'indispensables, les études *in vivo* du microbiote intestinal sur les modèles animaux présentent de nombreuses limites éthiques et techniques, et sont souvent limitées au microbiote fécal. L'étude précédente montre également les difficultés de maîtrise de la composante archéenne présente dans le microbiote fécal de rat. De ce fait, des systèmes *in vitro* permettant de reproduire un environnement adéquat pour le maintien du microbiote avec et sans archées méthanogènes s'avèreraient très utiles. De tels systèmes, dédiés au microbiote intestinal humain dans sa globalité, ont été élaborés. Ces systèmes permettent de (i) palier aux problèmes éthiques lors de l'étude de l'action de médicaments, agents pathogènes ou de produits toxiques, (ii) faciliter l'accès au microbiote grâce à des prélèvements à tout moment d'échantillons et ce, de manière spécifique au compartiment souhaité, (iii) maîtriser différents facteurs,

voir même isoler totalement un facteur à étudier [325, 326]. De nombreux modèles *in vitro* du tractus digestif ont été développés. Certains permettent d'étudier le tractus digestif haut, de la cavité buccale à l'intestin grêle [327]. D'autres reproduisent le côlon, par des systèmes mono-étagés ou des systèmes plus complexes présentant plusieurs compartiments simulant les différentes parties physiologiques du côlon (proximal, transversal, distal). [325, 323]. Ces systèmes ont été utilisés dans de nombreuses études afin de déterminer notamment des effets probiotiques ou prébiotiques [328]. Le laboratoire a développé un système *in vitro* capable de simuler l'environnement intestinal luminal sous contrôle de divers facteurs physico-chimiques. Ce système est dérivé de ceux élaborés par G.T. MacFarlane [329, 330]. Sa principale caractéristique par rapport aux autres systèmes *in vitro* est le maintien de l'atmosphère anaérobie provenant directement du métabolisme du microbiote, conduisant à différents rapports de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> dans chaque compartiment de gaz. Ceci présenterait un avantage pour l'étude de la population méthanogène : en permettant facilement la détection du méthane produit, on posséderait un indicateur sensible, simple et rapide de la présence et du développement des archées méthanogènes. Plusieurs développements ont tout d'abord été nécessaires pour envisager l'élaboration d'un modèle d'étude de ces archées.

#### II.1.2.1 Optimisation des approches pour la conservation du microbiote fécal : Standardisation des procédures des tests *in vitro* dans l'ECSIM

##### II.1.2.1.1 Contexte de l'étude

Les études réalisées sur l'ECSIM, permettant de mimer le microbiote intestinal, nécessitent une étape d'inoculation. Celle-ci est réalisée à partir d'échantillons fécaux frais, pré-amplifiés en culture batch dans des étapes permettant d'une part de « purifier » le futur inoculum de contaminants fécaux par dilution et d'adapter plus progressivement les composants du microbiote au milieu de culture futur. Ces préparations d'inoculum sont conservées pour la reproductibilité des manipulations, étape critiquable, car la conservation à -80 °C affecte la survie de nombreuses populations microbiennes. Les conséquences peuvent en être un appauvrissement de l'inoculum de départ, et des changements métaboliques / taxinomiques pouvant affecter les résultats obtenus. Peu de données existent quant à la conservation fonctionnelle de microbiotes. Pour ces raisons, nous avons cherché à déterminer empiriquement les meilleures solutions pour optimiser cette étape. A partir d'une selle à caractère méthanogène d'une personne âgée (femme de 83 ans), des tests de conservation de préparations d'inoculum ont été effectués, à l'aide de différents types de cryoprotecteurs (Glycérol à 10 % (V/V), DMSO à 10 % (V/V) et Polyéthylène Glycol PEG-4000 à 10 % (W/V)), seuls ou combinés (Glycérol/PEG-4000, DMSO/PEG-4000 et Glycérol/DMSO/PEG-4000). Après 3 et 6 mois de conservation à -80 °C, les microbiotes ont été remis en culture, la composition microbienne et certaines fonctionnalités métaboliques du microbiote ont été analysées.



#### II.1.2.1.2 Synthèse des résultats

Dans cette étude, mon travail a consisté en la réalisation des inoculi en présence de différents cryoprotecteurs, et la réalisation des fermentations. Également, j'ai réalisée l'analyse des compositions microbiennes avec la biopuce HuGChip, aidé par William Tottey, mesuré les taux de méthanogènes par qPCR. J'ai enfin bénéficié de l'aide de PP Chaudhary pour la mesure des gaz atmosphériques et des AGCCs. De cette étude, il ressort que le passage de microbiote par une étape de congélation atteint sévèrement son intégrité, tant au niveau de sa composition qu'au niveau métabolique. En effet, les microbiotes conservés dans les différents cryoprotecteurs montrent des compositions très variables et différentes de l'initiale. De manière favorable, tous les cryoprotecteurs ont permis le maintien d'archées méthanogènes, à la fois les *Methanobacteriales* (*Mb. smithii* et *Ms. stadtmanae*) et les deux types de *Methanomassiliicoccales* présentes initialement. Cependant, bien que le microbiote reste méthanogène, les variations mises en évidence modifient très fortement les productions d'AGCCs, à la fois quantitativement et qualitativement. Il est mis en évidence que la conservation avec 10 % de DMSO (quand un seul cryoprotecteur est utilisé) ou avec un mélange DMSO, Glycérol, PEG à 10 % semblent les moins délétères quant à la composition microbienne et au profil métabolique initial.

#### II.1.2.1.3 Résultats détaillés : Article scientifique

Cette partie est présentée sous forme d'article scientifique destiné à être soumis à publication dans une revue scientifique internationale.

## Human gut microbiota preservation for functional studies: *in-vitro* comparison of common cryoprotective agents used alone or mixed

Gaci Nadia, Chaudhary Prem Prashant, Tottey William, Alric Monique, Brugère Jean-François\*.

EA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

\*to whom correspondence should be addressed: jf.brugere@udamail.fr

### Abstract:

Availability of fresh stool samples are the prerequisite in most of the cases of gut microbiota functional studies. Strategies for long-term gut microbiota preservation from fecal samples are needed, which would favor samples sharings, help comparisons and reproducibility over time and between laboratories, and improve the safety and ethical issues of fecal matter transplantations. However, there is scanty information available about the preservation strategies which will successfully maintain the diversity and the functional properties of the microbiota: this last is moreover composed of much diversified microbes, mainly being still uncultivated as isolates and being anaerobes with high sensitivity to O<sub>2</sub>, increasing the difficulty of efficient preservation. Here, some common cryoprotective agents (CPAs), both in different combinations and alone and a -80°C freezing procedure were tested for the checking of their efficacy for functional microbiota preservation. CPAs were both intracellular acting (glycerol and dimethylsulfoxide) and extracellular (PEG-4000) ones. Preservation efficiencies were determined after 3 and 6 months and compared with the fresh initial microbiota diversity and metabolic activity, using the ECSIM *in-vitro* model of gut environment, a chemostat-based fermentation system established to maintain microbiota. Both bacterial and archaeal populations were tested, towards fermentation gas, short chain fatty acids, and structural shape of the microbiota. None of the CPAs gave identical results compared to the initial microbiota, highlighting the need of efforts towards the functional preservation of fecal microbiota. The mixed CPAs showed however better efficiencies.

Key words: Cryoprotectants, Glycerol, Dimethyl sulfoxide, Polyethylene glycol, Environmental Control System for Intestinal Microbiota (ECSIM), CPA

Abbreviations: D, DMSO: Dimethylsulfoxide; G, Glycerol; P, PEG-4000: Polyethylene glycol of 4.000 g.mol<sup>-1</sup>; SCFAs, short chain fatty acids; SNR, signal-to-noise ratio

### Introduction

Gut microbes are of prime importance because of a wide variety of roles they perform within the gut which includes help in shaping the host's gut mucosa, maturation of immune system and contributes on nutritional level (Kamada et al., 2013 ; Flint et al., 2012). Advents in next-generation sequencing (NGS) has overcome the inability to culture/isolate most of the microbes present in gut microbiota. NGS-based studies has provided a way to analyze gut microbiota associations with physiological and pathological phenotypes, as well with 16S amplicon sequencing and metagenomics (Dethlefsen et al., 2008; Gill et al., 2006; Arumugam et al., 2011), from which some functional properties, mainly presumed, may be deduced. However, the role of the microbiota is far to be ultimately determined: one of the main reasons is the lack of relevant models for functional studies and / or human host - microbiota relationship, coupled with their ease

of a rigorous experimentation able to warrant reproducibility. Indeed, some gut microbes, most of them still being unknown or only by a more or less short genomic sequence are extremely sensitive to O<sub>2</sub>. This necessitates manipulating the microbiota rapidly after sampling in order to inoculate either gnotobiotic animals or *in-vitro* systems, to keep as much as possible microbes alive. Moreover, this precludes to repetition of experiments over time with the same inoculum. Also, there is a growing interest towards fecal transplantation which involves the introduction of filtrated feces of healthy donor into the gastrointestinal tract of patients. This process is generally used in the case of inflammatory bowel disease (IBD) (Anderson et al., 2012), *Staphylococcus colitis* (Eiseman et al., 1958) and *Clostridium difficile* infections (van Nood et al., 2013). The investigation of microbes in fecal samples is accompanied with several ethical and technical problems: for example, the loss of viable

microbes overtime necessitates a rapid use of selected donor's sample with little verification about the potential carriage of pathogens at the time of the transplantation.

Few methods of preservation of enrichment cultures, consortia and co-cultures are described until now (Kerckhof et al., 2014). Out of these available protocols, mostly deals with short term storage of cultures (Stephan et al., 2004) or for specific applications like molecular analysis (Fouhy et al., 2015; Cardona et al., 2012) or peculiar sub-populations of a consortium due to their biotechnological and pharmacological interests (for example, anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, Laurin et al., 2006; Rothrock et al., 2011). Considering the human gut microbiota, some attempts have been made to optimize the storage conditions for fecal sample (Hubalek, 2003; Turnbaugh et al., 2009) but still insufficient information is available. Recently, a human gut microbiota preservation survey was performed (Kerckhof et al., 2014), which used two different treatments, one composed only of dimethylsulfoxide (DMSO), the other associating trehalose and tryptic soy broth plus DMSO. The storage in these media at -80°C for a period of 3 months indicated that both media led to an adequate cryopreservation of fecal matter.

More detailed studies are needed for further improving the available protocols or establishing the new ones for maintaining the diversity and the functional properties of the gut microbes in the fecal samples during the preservation. These protocols will further allow to perform intra and inter-lab results comparisons with high degree of accuracy. In order to address this fundamental issue, this study was designed by taking three different cryoprotective agents (CPAs) alone or in combinations to test their preservation efficiencies for maintaining the metabolic activity and composition of microbiota in fecal sample.

## Material and methods

### *Initial stools sample, media and culture conditions*

Fresh fecal sample was obtained from an old female volunteer (83 years old), with no history of antibiotic treatment, and was tested positive for methanogens of the species *Methanobrevibacter smithii* (*Mb. smithii*), *Methanospaera stadmanae* (*Ms. stadmanae*) and of two members of the order *Methanomassiliicoccales* (*Ca. Methanomethylophilus alvus* and *Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*, Borrel et al.,

2014). The gut environment simulating system P-ECSIM was used to test functionally of the microbial preservation as previously described (Feria-Gervasio et al., 2011) except that the pH of the media was 6.2. Media used for the generation of inoculum and for the fermentative procedure were the same as described in Feria-Gervasio et al., 2014.

### *Initial inoculum generation, preservation of inoculi and regeneration from stored samples*

An overall simplified view of the experimental design is depicted Figure 1. Fermentation was set up by following steps performed under anaerobic conditions. 1g of fecal sample was inoculated in 5 mL of artificial gut medium (Feria-Gervasio et al., 2011) at 37°C for 10 h immediately after receiving the sample (collected 4 hours before) in an airtight anaerobic box. This preculture was transferred into 95 mL of medium. After 15 h of incubation at 37°C, this 100 mL of the culture was used to inoculate 900 mL of the medium already present in fermentor and was maintained for 8 h for batch fermentation (pH=6.2, 400 rpm, 37°C). Aliquots of 1 mL were sampled and stored at -20°C for 4 hours and were transferred at -80°C with 10% (V/V) glycerol stock, 10% (V/V) PEG, 10% (W/V) DMSO, 10% (V/V) Glycerol + PEG, 10% (V/V) DMSO + PEG and 10% (V/V) Gly +PEG+ DMSO. One fresh aliquot was used to inoculate directly the bioreactor for generating fresh condition that constituted our control.

The stored aliquots were thawed in an anaerobic chamber after 3 and 6 months of storage and were inoculated in 5 mL of medium. The same steps of fermentor inoculation were performed as described previously, with an exception that at this time fermentation was done on chemostat during 7 residence times (7 X 24.96 h) to achieve stabilization (Feria-Gervasio et al., 2011). The oxidation / reduction potential (ORP) was monitored using a specific probe. The acquisition and control during the fermentations was handled by C-BIO software (GPC-Global Process Concept Inc). After stabilization, aliquots were sampled for analysis.

### *Microbiota composition analysis with HuGChip*

Microbial diversity was determined by using the HuGChip (GEO: GSE44752), an explorative DNA phylogenetic microarray composed of 4,441 probes targeting 66 bacterial families (Tottey et al., 2013). DNA was extracted from fermentation

samples and total 16S bacterial gene was amplified using universal primers, labelled with Cy3 or Cy5 dyes and hybridized to the DNA microarray probes as stated before (Tottey et al, 2013). After scanning, the data was retrieved using Agilent Feature Extraction software 10.5.1.1 and signals were normalized (Agilent platform GPL16731). Results of hybridization are deposited under the GEO submission number #17628504 to the NCBI database. Taxonomic assignment of bacterial families was performed as previously described in Tottey et al, 2013, helped by using PhylInterpret software (<http://g2im.uclermont1.fr/HuGChip/>) which calculates relative abundances of bacterial families. When used as a molecular fingerprinting method, probes signals were further normalized between samples to give the same total fluorescence signal. Each probe signal with a signal-to-noise ratio (SNR) above 12 was considered positive.

### **Gas and SCFA analysis**

Anaerobic experiments were maintained and tested during the experimentation as described previously by Feria-Gervasio et al., 2014. For gas analysis (proportion of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and H<sub>2</sub>), Gas Chromatography was performed (HP 6890 series columns: Molecular Sieve 5A and Porapack Q, Agilent Technologies, USA; coupled with an FID detector). For short-chain fatty acids (SCFAs) analysis, 1 mL of media was sampled from each fermentor and centrifuged (8,000×g, 10 min at 4°C). The supernatant was diluted (1:1) with sterile water and was mixed by adding 85 µl of 2-ethylbutyric acid (49 mM) and 20 µl of phosphotungstic acid (500 g / L). Samples were then incubated at 4°C overnight. Samples were then again centrifuged and were analyzed for acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, iso-valerate, valerate, caproate, isocaproate and heptanoate by gas chromatography (HP 6890 series, column HP-INNOVAX 30 m × 250 µm × 0.25 µm, split ratio = 25:1, Agilent Technologies). 2-Ethyl-butyrate was used as an internal standard. The net production of SCFAs was then deduced from the concentration of SCFAs in the considered reactor as determined by Feria-Gervasio et al. (2014).

### **Statistics**

The taxonomic and metabolic profiles were analyzed by using Paleontological Statistics (PAST) (Hammer et al., 2001) and Statistical Analysis of Metagenomic Profiles

(STAMP) (Parks et al., 2014) statistical software packages. Data are presented as mean ± SD. For microbiota diversity analysis, Shannon and Simpson diversity indices, as well as other indices were calculated using PAST.

## **Results**

### **Experimental design**

The overall experimental design is depicted Figure 1. In order to avoid any components from feces that could interfere with experimental interpretations, 1 g of fecal sample from an old female volunteer (83 years old) was first inoculated in 5 mL of medium mimicking gut substrates (Feria-Gervasio et al., 2014). This volunteer was chosen as she was known to host not only bacteria but also archaea in her gut microbiota therefore allowing the testing of preservation of bacterial and archaeal gut members. Progressive scales up were then performed up to 1L with several incubation steps (see M&M for further details). Several 1 mL aliquots were then mixed with various cryoprotective agents (CPA) under strictly anaerobic conditions, stored first at -20 °C for 4 hours followed by 3 and 6 months preservation at -80°C. CPAs used in this study were two different cell-permeating, intracellular agents (Glycerol (G), dimethylsulfoxide (DMSO, (D), each at 10% (v/v)) and one extracellular, non-permeating, high molecular weight compound, polyethylene glycol of 4,000 g.mol<sup>-1</sup> (PEG-4000, (P) at 10% (w/v)). They were used alone (D, G, P abbreviated samples) or in combination (DP, GP and DGP). One aliquot was untreated and directly used to inoculate the ECSIM model simulating the gut environmental conditions (Feria-Gervasio et al., 2011). Once chemostat conditions launched and stabilization reached (after 7 retention times RT), several analyses were performed in order to describe the resulting microbiota, both functionally and structurally. Data at this stage were corresponding to the initial point (T0) which were also compared to the fresh fecal sample (see Additional Data S1 for all comparisons with initial stools). Then, the same experiments were reproduced later at 3 and 6 months (3 months + 8 days / 6 months + 8 days for DP, GP and DGP inocula) using -80°C preserved 1-mL aliquots as starting inoculum.

### **Preservation of metabolic behavior assessed with Gas and SCFAs production**

The ECSIM system allows chemostatical conditions under anaerobiosis composed by the microbiota fermentative metabolism. Similar patterns were obtained for all the preservative conditions (Additional Data S2): Briefly, H<sub>2</sub> was detected at low levels less than 1%, indicating an efficient activity of hydrogenotrophs, as also sustained by the detection of methane. Therefore, all the preservatives used here led to the survival of at least some methanogenic archaea members (see also further). Also, the low H<sub>2</sub> level and the presence of methane is indicative of an efficient fermentation yield: among them, short chain fatty acids (SCFAs) are important functional metabolites of the gut microbiota, predominantly formed of acetate, propionate and butyrate. Both quantities and proportions of the 3 major ones varied with treatment and duration of preservation (Figure 2A). When compared with initial values, after 3-month preservation led to an increase of acetate production, and in a lesser extent of propionate, when glycerol was used as CPA, either alone or with other CPAs. This effect was lost after 6 months, resulting mainly in lower yields for the 3 SCFAs when compared to initial values. However, this had little impact on their respective proportions, while the use of PEG-4000 (alone or with glycerol or DMSO) resulted mostly in a decrease of SCFAs, highlighted at 3 months for propionate proportion (See Additional Data S3). A 6-month preservation resulted inversely in a greater part of propionate whatever the CPA being used. When mixed together, the CPAs gave the best similar results, either at 3 or 6 months of preservation (DGP3 and 6, figure 2). Other SCFAs are produced by the human gut, mainly branched ones from specific metabolisms of proteins and amino acids. Their quantitative analysis showed great discrepancies among the treatment compared to the initial state (Additional Data S3). Some were highly decreased (valerate, caproate) or even disappeared (heptanoate after 6 months of preservation) with all CPAs. Isobutyrate showed inversely an increase in each case. A Principal Components Analysis was generated to determine which treatment was however the less detrimental towards the SCFAs profile (Figure 3A): it shows that DMSO gives the most similar pattern, considering the first component (contributing to 81.2% of the differences). It is effective either alone or with the other two CPAs, and after 3 or 6 months of cryopreservation. Glycerol and PEG 4000, either each alone or together, are the less efficient CPAs.

A great discrepancy is shown when using PEG 4000 but this dissimilar pattern is stable over the two preservation times. A consequence of these results is that the normobiosis defined at T0 has been disrupted by the cryopreservation of inoculi.

### **Microbial composition preservation**

#### **CPAs comparison by High-resolution Fingerprint of total microbial DNA**

The (3x) 4.500 unique probes of the HuGChip DNA microarray (Tottey et al., 2013) were hybridized with full-length 16S DNA amplicons of each microbial DNA retrieved from fermentors. After normalization, a fingerprint of 570 signals was obtained for the fresh fecal sample. The initial round of fermentation led to a slight increase of the number of positive signals (592, SNR>20), with 562 shared signals. The use of Glycerol as CPA resulted in lower signal numbers, even when used alone (around 496 and 514 compared to 592, respectively after 3 and 6 months of preservation) or together with other CPAs (DMSO and/or PEG 4000), indicating a loss of diversity (Table 1). This decrease was maximal when Glycerol was used alone (16.2% after 3 months). The PCoA highlights these differences compared with the initial microbiota (Figure 3-B). Inversely, the preservation of inoculi was best when DMSO and PEG 4000 were used together (Figure 3-B). In these conditions, it resulted sometimes in a higher number of positive signals, as well as a higher shared signal number with the initial reactor (Table 1): therefore, it can be deduced that the use of these CPAs disturbed the initial equilibrium among bacterial populations, resulting in development of bacteria not detected in the initial sample. We consequently questioned which kind of bacteria might be impacted by cryopreservation.

#### **Taxonomic composition**

The bacterial family proportions of each sample were obtained by complementary analysis of the HuGChip, based on possible 66 bacterial families retrieved from human gut (Tottey et al., 2013). They are depicted in additional data S4. The microbiota extracted from fresh fecal matter showed a usual phyla composition of Elderly's gut microbiota, with about 50% *Firmicutes*, 30% *Bacteroidetes* and 20% of *Proteobacteria* (Additional Data S1). Initial point presented quite a similar qualitative pattern with mainly a decreased proportion of *Proteobacteria* and an

increased one of *Firmicutes*. After preservation, *Actinobacteria* were revealed in every samples, mainly of the family *Coriobacteriaceae* and in a lesser extent of *Bifidobacteriaceae*, absent when PEG-4000 alone or with DMSO/Glycerol was used (Additional Data S4a and S4b). Some other bacterial families were recovered from the *Firmicutes*, *Clostrium* spp. from the cluster III (more specifically in longer preservations, except when Glycerol and PEG 4000 were used), of the cluster IX (present with DMSO and PEG 4000 treatment alone, but not together) and of the cluster XI (absent with DMSO alone or with Glycerol). Interestingly, *Proteobacteria* of the families *Xanthomonadaceae* and *Neisseriaceae*, and *Verrucomicrobiaceae* were also revealed when all the CPAs were used together, as well as unknown *Cyanobacteria* (likely those described by Ley et al., 2005 and Di Rienzi et al., 2013) when PEG-4000 was used. Importantly, some bacterial families disappeared while present in the initial sample and the fresh fecal sample: this encompasses *Firmicutes* belonging to uncultured *Clostridiales* of the cluster II and *Streptococcaceae*. When analyzing the overall diversity of each sample, the higher diversity indices were obtained for sample preserved with PEG-4000 for 6 months (Additional Data S4b). PCoA confirms the closer relationship of shorter preservation time (3 months) with the initial point while only the mixed CPAs DGP were able to sustain a microbiota after 6 months in a quite similar way than after 3 months (near confounded points with D3, Figure 3-C). Glycerol alone was however the worth treatment, even at 3 months, whatever the time being considered with other treatments. A heat map was generated using a Ward's distance matrix to ordinate the samples (Figure 4), which confirms the close relationship between initial inoculum and the one preserved with the three CPAs together for 3 months.

#### Assessment of archaeal components preservation

The choice of an initial methanogenic fecal sample allow the study of the susceptibility of some archaea to cryopreservation, *in extenso* of gut microbial components with a completely different membrane structure. A qPCR analysis of stools DNA revealed the presence of usual *Methanobacteriales* (as well *Mb. smithii* and *Ms. stadtmannae*), together with the far less known newly described *Methanomassiliicoccales* (Gaci et al., 2014) (Additional Data S1). As previously

mentioned, methane in the atmosphere of fermentations attested the survival of some of these *Euryarchaea*. Quantitative PCR showed that all the three main methanogenic groups (*Mb. smithii*, *Ms. stadtmannae* and *Methanomassiliicoccales*) were detected, from the initial point up to 6 months whatever the CPA being used, however with an increased proportion of *Mb. smithii* compared to the others (Figure 4, see Additional Data S5 for quantitative values).

#### DISCUSSION

Recent advances in molecular techniques and more specifically in DNA sequencing has already revealed how complex the human gut microbiota is. It is assumed that its diversity is very high and different among all individuals. Some common traits are defined in human allowing to classify three different so-called enterotypes (Arumugam et al., 2011) according to the microbial composition, but this seems however less stratified with existing gradients of key microorganisms among Human (Claesson et al., 2012). Moreover, this individual-specific microbiota is evolving throughout the lifespan, from its establishment at birth and first years to Elderly people. Its composition is also transiently disrupted by various factors (medications, infections, diet changes,...). At last, its biogeography shows various different patterns as well longitudinally throughout the gastrointestinal tract and transversally, from the host-human epithelial cells to the lumen (Donaldson et al., 2015). The fecal matter is however believed to reflect at least partly this microbial diversity and may be considered as a repertoire of microbes associated to human GIT. Despite this, our knowledge of the function of gut microbiota remains sparse: correlations and/or evidences are now provided for its involvement in the etiology of various human diseases. This encompasses digestive ones and extra-digestive ones (cardiometabolic diseases, cardiovascular diseases, mental health,...) (Wu et al., 2015 ; Mayer et al., 2014). Considering this, there are several important reasons to establish methods enabling the functional preservation of human fecal microbiota, mainly composed of strictly anaerobic bacteria, but also of archaea and yeasts. Among them, we can mention the possibility of shared samples collection by reference centers, the preservation of samples in large human clinical studies, but also the generation of safety inocula for fecal matter transplantation (FMT),

already used as a treatment in some *Clostridium difficile* infections for example, but which uses could be extent to other diseases (auto FMT after chemotherapy, prevention of some chronic diseases,...). These needs and consequently, the methods to be used, are in their infancy considering complex microbiota. The question is however how to test the reliability of preservation techniques. Molecular biology has become essential to assess the diversity of the gut microbiota by 16S sequencing (Karlsson et al., 2013; Milani et al., 2013), indicating however that an unneglectable part is still unknown. Its functions can also be partly and putatively addressed by metagenomics studies. However, these methods do not distinguish between viable but possibly in anabiotic state and dead cells, which become a real issue in case of preservation studies.

Here, we have proposed a way to test the viability of preserved cells from stools by letting them grow again and next by testing some indicators of the diversity and function of the gut microbiota (bacterial composition, metabolic behavior) encompassing one non-bacterial component, the methanogenic archaea. In this work, we pre-processed the sample by a preliminary culture preparation in order to eliminate non-living fecal components that could next interfere with the preservation. We also focused here on the cryopreservation of processed samples (not further followed by a lyophilization step), with an easy-to-perform method (4h at -20°C, followed next at -80°C). This step is likely a very important one, together with the CPA used, and should be addressed in the future: freezing up to -196°C and using liquid nitrogen for conservation can be valuable mean to increase viability overtime. Also, optimization of the cooling rate process is important. Due to the extreme diversity of microbes, these steps will have however to be empirically determined.

Among the CPAs having been tested, none gave a similar pattern compared with the initial point, both structurally and metabolically. This highlights the urgent needs of improvements of microbiota preservation processes that ultimately should be standardized and shared among laboratories and collection centers. Earlier studies demonstrated that DMSO is more preferred as CPAs than others for the preservation of consortium (Imaizumi et al., 2014). Here also, samples with DMSO alone or associated exhibited a better preservation. This cell-penetrating,

permeating agent, as is glycerol, has colligative properties that reduces salt concentration, triggers osmotic effects and prevents the nucleation and growth of ice crystals that further lead to membrane rupture (Imaizumi et al., 2014). It has better penetrating power than glycerol, this last being also known to cause a molecular reorganization of plasma membranes during freezing (Hammerstedt et al., 1990). It has therefore been suggested that glycerol should not be added more than few minutes before freezing (Salomon and Maxwell, 2000), a technically difficult requirement when working in anaerobic chamber, as needed for fecal microbiota processing. This may explain why glycerol gave worth preservation reliabilities in this study on some checked parameters, even when used associated with other CPAs. Using non-permeating, extracellular agents improve the osmotic imbalance during freezing. Here, PEG-4000 was the only one extracellular agent tested. Other (like trehalose, sucrose,...) could also be of interest but may favor more likely than PEG-4000 some groups of the microbiota at resuscitation that could use them as growth substrates and therefore were not tested. PEG-4000 showed good performance alone, and improved significantly the preservation when used together with permeating agents, likely by better preservation of the cell integrity, and therefore by limiting a shortcoming of permeating agents (Giraud et al., 2014). However, two bacterial families completely disappeared with the preservation, the *Streptococcaceae* and uncultured *Clostridiales* of the cluster II. Some additional CPAs and / or freezing processes could be tested specifically on some isolated members of these families, at least for *Streptococcaceae* and next, best method / CPA added and tested on the whole microbiota, to improve the overall efficiency of already tested CPAs. Methanogenic archaea, with their own specific membranes and cell walls were successfully preserved by all CPAs. Importantly, their diversity was also maintained, encompassing members of the *Methanomassiliicoccales*, for which data in gut as well as other environments are still very sparse despite a possible important role in the microbiota ecology and human physiology (Brugère et al., 2014). Therefore, any CPA seems reliable for human gut methanogens preservation.

Another important point of this study is that the duration of the preservation (6 months vs 3 months) led to a worth pattern in every case. This



indicates that the processes used here should not be intended for long-term storage, even if some CPAs showed better reliability over time. This could be overcome partially by frequent re-build of microbiota, for example using the process described here. However, this would lead in every case to time-consuming handlings and will not avoid microbiota drifts over time. Here, it would be of interest to determine if a  $-196^{\circ}\text{C}$  preservation would decrease this discrepancy observed over time.

## CONCLUSION

Sustained anaerobia, complex and very diverse microbial composition are some of the properties of the human gut microbiota which led to difficulties in preserving the functionalities / the viability of the microbiota. Reliable tools to test this viability are also challenging. Results obtained here provide some clues that cryopreservation can be used efficiently and that permeating and non-permeating CPAs can be cumulatively used in order to promote microbiota viability, despite being still insufficient.

## References

- Anderson, J.L., Edney, R.J., and Whelan, K. (2012) Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 36, 503-516. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05220.x.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium., Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rimini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Bork, P. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 473, 174-180. doi: 10.1038/nature09944.
- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H.M., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., Bardot, O., Raymann, K., Gribaldo, S., Peyret, P., O'Toole, P.W., and Brugère, J.F. (2014) Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics.* 13, 679. doi: 10.1186/1471-2164-15-679.
- 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. doi: 10.4161/gmic.26749.
- Cardona, S., Eck, A., Cassellas, M., Gallart, M., Alastrue, C., Dore, J., Azpiroz, F., Roca, J., Guarner, F., and Manichanh, C. (2012) Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol.* 12, 158. doi: 10.1186/1471-2180-12-158.
- Claesson, M.J., Jeffery, I.B., Conde, S., Power, S.E., O'Connor, E.M., Cusack, S., Harris, H.M., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G.F., Deane, J., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., O'Mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., Stanton, C., Marchesi, J.R., Fitzgerald, A.P., Shanahan, F., Hill, C., Ross, R.P., and O'Toole, P.W. (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 488, 178-184. doi: 10.1038/nature11319.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., and Relman, D.A. (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 6: e280. doi:
- Di Rienzi, S.C., Sharon, I., Wrighton, K.C., Koren, O., Hug, L.A., Thomas, B.C., Goodrich, J.K., Bell, J.T., Spector, T.D., Banfield, J.F., and Ley, R.E. (2013) The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria. *Elife.* 2: e01102. doi: 10.7554/eLife.01102.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2015) Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro3552.
- Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G.S., and Kauvar, A.J. (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery.* 44, 854-859.
- 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. doi: 10.1007/s00253-011-3462-5.

- Feria-Gervasio, D., Tottey, W., Gaci, N., Alric, M., Cardot, J.M., Peyret, P., Martin, J.F., Pujos, E., Sébédio, J.L., and Brugère, J.F. (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, 111-1118. doi: 10.1016/j.mimet.2013.11.015.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P., and Duncan, S.H. (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 9, 577-589. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156.
- Fouhy, F., Deane, J., Rea, M.C., O'Sullivan, Ó., Ross, R.P., O'Callaghan, G., Plant, B.J., and Stanton, C. (2015) The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations. *Plos ONE*. 10:e0119355. doi: 10.1371/journal.pone.0119355.
- Gaci, N., Borrel, G., Tottey, W., O'Toole, P.W., and Brugère, J.F. (2014) Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol*. 20, 16062-16078. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16062.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 312, 1355-1359.
- Giraud, S., Cudas, R., Hauet, T., Eugene, M., and Badet, L. (2014) Polyethylene glycols and organ protection against I/R injury. *Prog Urol*. 24 Suppl 1:S37-43. doi: 10.1016/S1166-7087(14)70062-4
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2005). PAST-Palaeontological Statistics, ver. 1.35. *Palaeontología Electrónica*, 4(9).
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., and Nolan, J.P. (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*. 11, 73-88.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46, 205-229.
- Imaizumi, K., Nishishita, N., Muramatsu, M., Yamamoto, T., Takenaka, C., Kawamata, S., Kobayashi, K., Nishikawa, S., and Akuta, T. (2014) A simple and highly effective method for slow-freezing human pluripotent stem cells using dimethyl sulfoxide, hydroxyethyl starch and ethylene glycol. *Plos ONE*. 9:e88696. doi: 10.1371/journal.pone.0088696.
- Kamada, N., Seo, S.U., Chen, G.Y., and Núñez, G. (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 13, 321-335. doi: 10.1038/nri3430
- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J., and Bäckhed, F. (2013) Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 62, 3341-3349. doi: 10.2337/db13-0844.
- Kerckhof, F.M., Courtens, E.N., Geirnaert, A., Hoefman, S., Ho, A., Vilchez-Vargas, R., Pieper, D.H., Jauregui, R., Vlaeminck, S.E., Van de Wiele, T., Vandamme, P., Heylen, K., and Boon, N. (2014) Optimized cryopreservation of mixed microbial communities for conserved functionality and diversity. *Plos ONE*. 9:e99517. doi: 10.1371/journal.pone.0099517.
- Laurin, V., Labbé, N., Juteau, P., Parent, S., and Villemur, R. (2006) Long-term storage conditions for carriers with denitrifying biomass of the fluidized, methanol-fed denitrification reactor of the Montreal Biodome, and the impact on denitrifying activity and bacterial population. *Water Res*. 40, 1836-1840.
- 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.
- Mayer, E.A., Knight, R., Mazmanian, S.K., Cryan, J.F., and Tillisch, K. (2014) Gut microbes and the brain: paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci*. 34, 15490-15496. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014.
- Mihajlovski, A., Alric, M., & Brugère, J. F. (2008). A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Research in microbiology*, 159(7), 516-521. doi: 10.1016/j.resmic.2008.06.007.
- Milani, C., Hevia, A., Feroni, E., Duranti, S., Turroni, F., Lugli, G.A., Sanchez, B., Martín, R., Gueimonde, M., van Sinderen, D., Margolles, A., and Ventura, M. (2013) Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene based analysis protocol. *Plos ONE*. 8:e68739. doi: 10.1371/journal.pone.0068739.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., and Beiko, R.G. (2014) STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*. 30, 3123-3124. doi: 10.1093/bioinformatics/btu494.
- Rothrock, M.J. Jr., Vanotti, M.B., Szögi, A.A., Gonzalez, M.C., and Fujii, T. (2011) Long-term preservation of anammox bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92, 147-57. doi: 10.1007/s00253-011-3316-1.
- Salamon, S., and Maxwell, W.M. (2000) Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 62, 77-111.
- Tottey, W., Denonfoux, J., Jaziri, F., Parisot, N., Missaoui, M., Hill, D., Borrel, G., Peyretailade, E., Alric, M., Harris, H.M., Jeffery, I.B., Claesson, M.J., O'Toole, P.W., Peyret, P., and Brugère, J.F. (2013) The human gut chip "HuGChip", an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *Plos ONE*. 8:e62544. doi: 10.1371/journal.pone.0062544.

Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., and Gordon, J.I. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med.* 11, 1:6ra14. doi: 10.1126/scitranslmed.3000322.

van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F., Tijssen, J.G., Speelman, P., Dijkgraaf, M.G., and Keller, J.J. (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 368, 407-415. doi: 10.1056/NEJMoa1205037.

Wu, H., Tremaroli, V., and Bäckhed, F. (2015) Linking Microbiota to Human Diseases: A Systems Biology Perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 26, 758-770. doi: 10.1016/j.tem.2015.09.011.

## TABLES

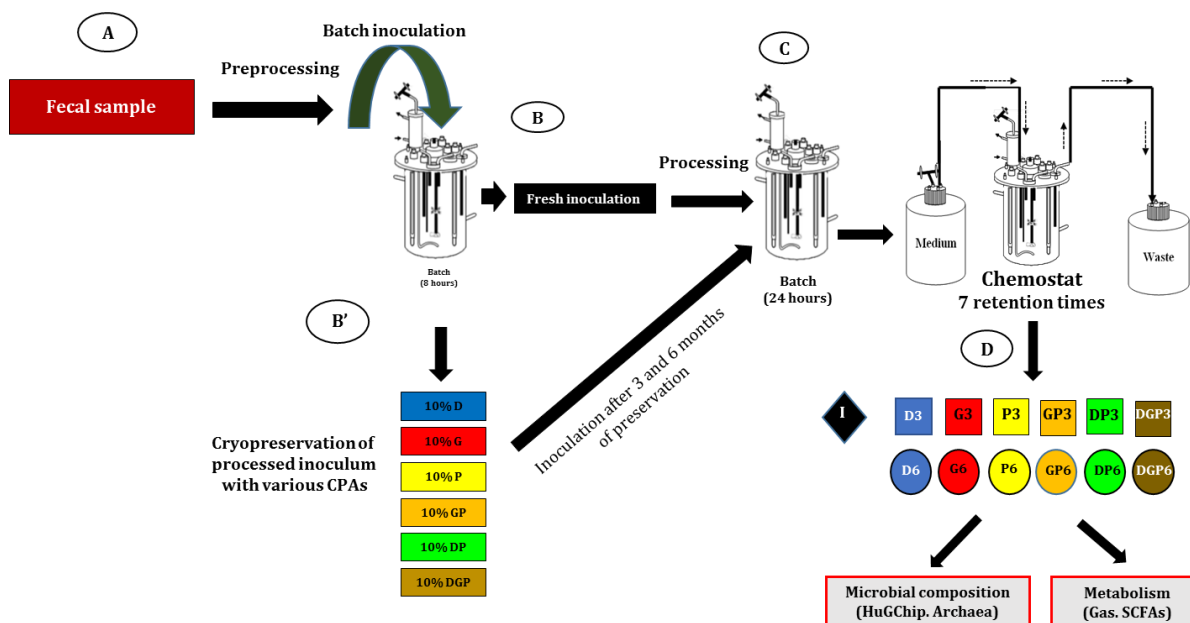
**Table 1: Number of positive hybridization signals and proportion compared to initial values.**

Sample	G3	G6	P3	P6	D3	D6	GP3	GP6	DP3	DP6	DGP3	DGP6
signals <sup>†</sup>	496	514	536	530	579	566	508	515	612	575	552	526
shared signals <sup>‡</sup>	420	425	436	432	471	466	424	430	460	448	451	439
Proportion <sup>‡</sup>	83,8%	86,8%	90,5%	89,5%	97,8%	95,6%	85,8%	87,0%	103,4%	97,1%	93,2%	88,9%

<sup>†</sup>Determined positive as a cut-off value of SNR superior to 20

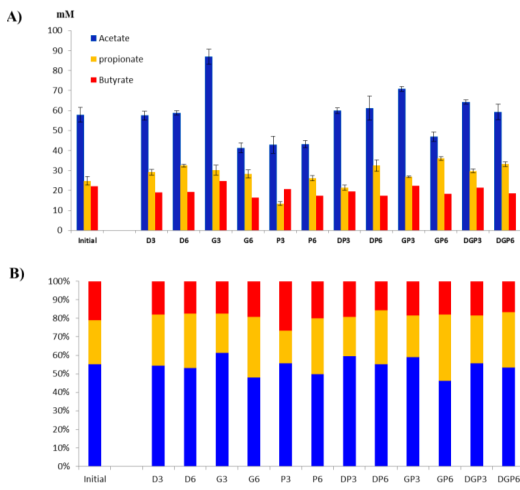
<sup>‡</sup>Compared to the initial fingerprint (592 positive signals).

## FIGURES



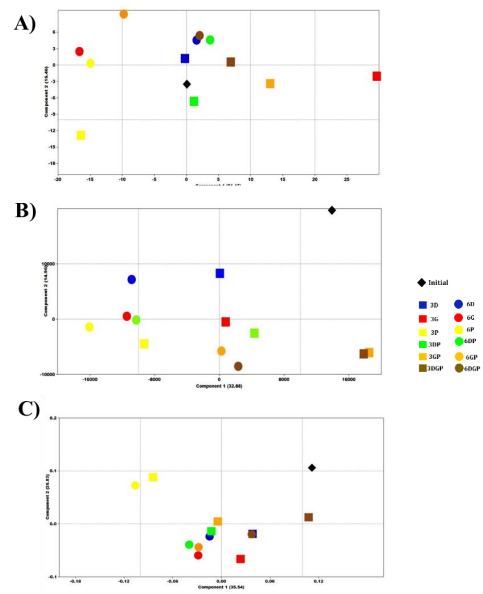
**Figure 1. Strategy and experimental design**

The timeline of fermentation experiments and sampling is depicted. (A) a first inoculum is generated from a fresh fecal sample, then used directly (B) or after 3 to 6 months of preservation at  $-80^{\circ}\text{C}$  with various CPAs, alone or in combinations (B'). During the ECSIM experiments (C), samplings are performed after 7 retention times of the chemostat process (D). These samples corresponding to the initial point (black diamond), the 3-months preserved inocula (squares) or the 6-months inocula (circles) are subjected to microbial analyses (HuGchip DNA microarray. quantification of archaea) and to analyses of fermentative gases and SCFAs. See M&M for further details.



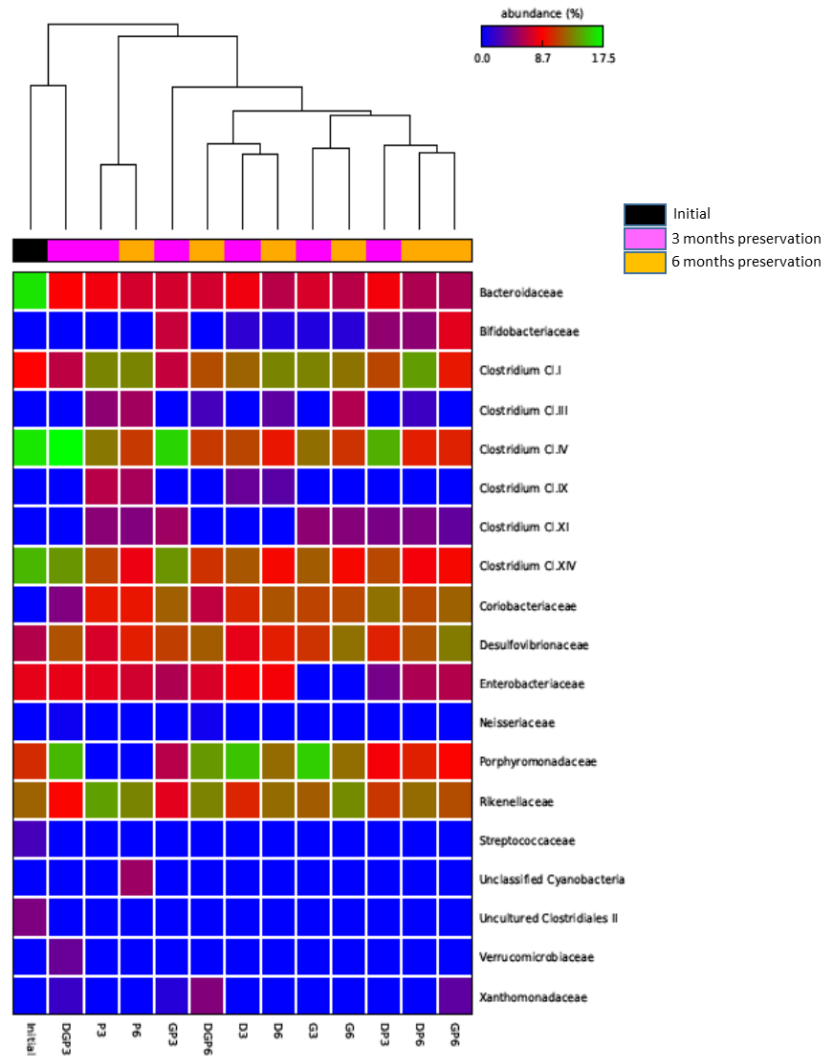
**Figure 2. Major SCFAs production**

Concentration (A) and proportion (B) of the three major SCFAs (Acetate, Propionate and Butyrate) in the reactors after inoculation with preserved microbiota. Complete results with other minor SCFAs are given in additional data S3

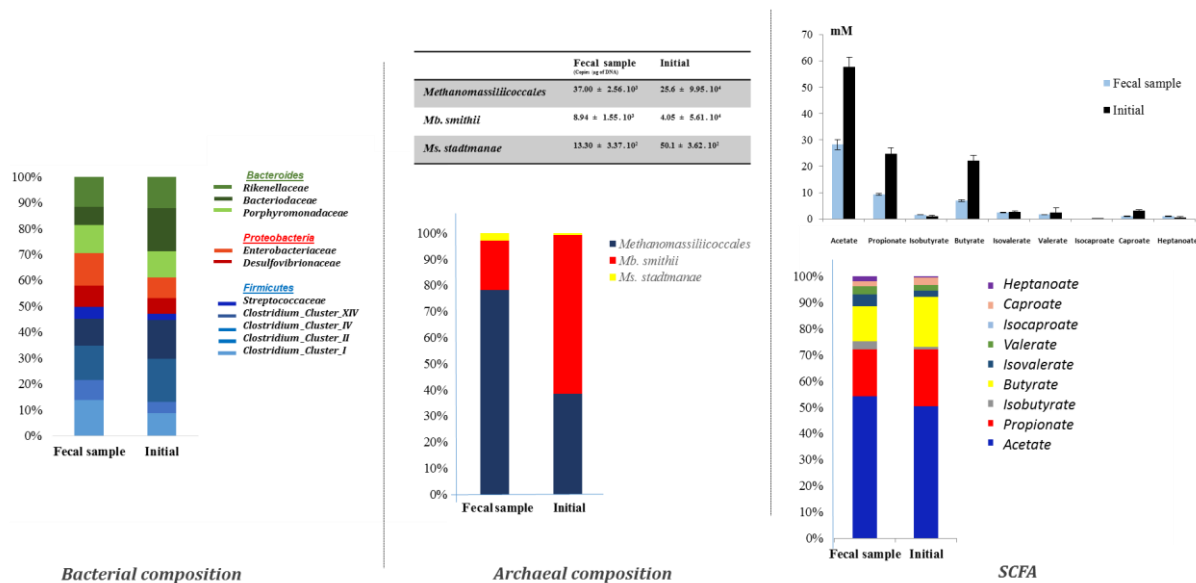


**Figure 3: PCoA analyses of microbial composition and metabolism**

PCoA analyses comparing the samples based on their SCFAs production (A), their HuGChip fingerprint (B) and their taxonomic composition at the family level (C).



**Figure 4. Heat map comparison among samples based on the microbial composition at the family taxonomic level**

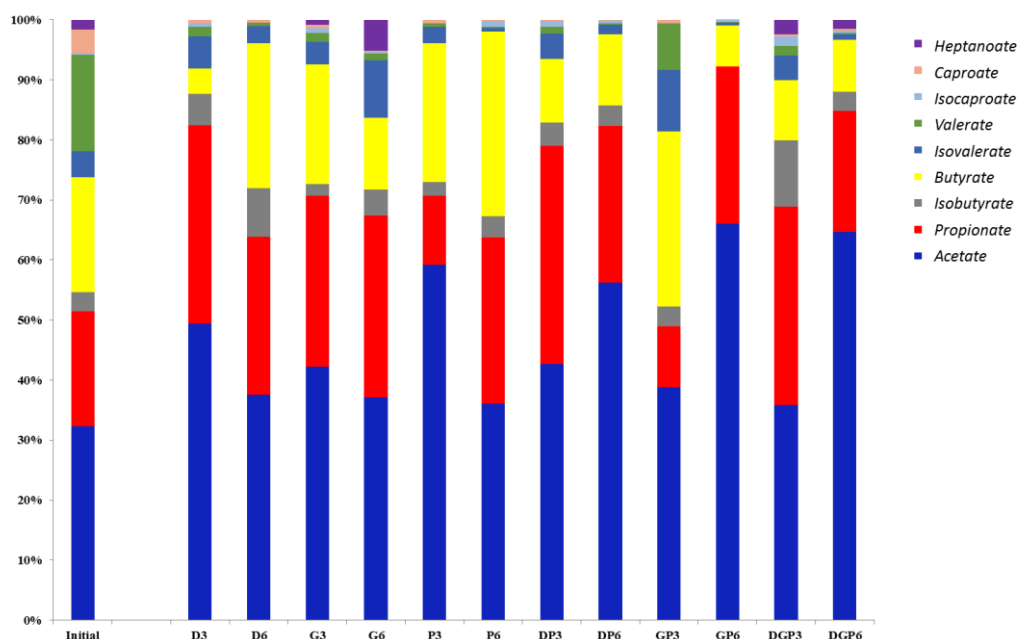
**Additional Data S1 Taxonomic and metabolic comparison between fecal microbiota used for this experiment and the microbiota observed after ECSIM simulation with fresh inoculum (reference point of the experiment)**

**Additional Data S2: gas proportion (in %) in the ECSIM atmosphere after completion of 7 retention times**

	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> and others
Initial	7.08 ± 0.15	41.25 ± 0.86	0.12 ± 0.03	0.00 ± 0.00	51.54 ± 0.73
D3	4.83 ± 0.81	49.62 ± 0.60	0.32 ± 0.05	0.00 ± 0.00	45.21 ± 0.56
D6	3.90 ± 0.19	51.20 ± 0.61	0.38 ± 0.06	0.01 ± 0.01	44.49 ± 0.86
G3	3.20 ± 0.22	45.62 ± 2.18	0.36 ± 0.06	0.00 ± 0.00	50.80 ± 2.45
G6	1.23 ± 0.27	52.76 ± 3.60	0.70 ± 0.08	0.00 ± 0.00	45.29 ± 3.44
P3	2.92 ± 0.32	51.64 ± 0.98	0.35 ± 0.16	0.00 ± 0.00	45.07 ± 0.54
P6	1.97 ± 0.28	53.22 ± 1.00	0.48 ± 0.04	0.00 ± 0.00	44.31 ± 0.73
DP3	1.50 ± 0.44	48.53 ± 2.77	0.44 ± 0.43	0.00 ± 0.00	49.52 ± 2.70
DP6	1.60 ± 0.35	49.10 ± 1.43	0.90 ± 0.09	0.00 ± 0.00	48.38 ± 1.67
GP3	2.49 ± 0.21	48.55 ± 2.52	0.54 ± 0.10	0.00 ± 0.00	48.41 ± 2.79
GP6	2.49 ± 0.34	44.46 ± 2.67	0.65 ± 0.08	0.00 ± 0.00	52.39 ± 2.26
DGP3	3.26 ± 0.50	49.18 ± 6.11	0.28 ± 0.02	0.00 ± 0.00	47.26 ± 6.23
DGP6	4.74 ± 0.63	46.55 ± 1.80	0.61 ± 0.02	0.00 ± 0.00	48.08 ± 2.29

## Additional data S3a: SCFAs production

(mM)	Acetate	Propionate	Isobutyrate	Butyrate	Isovalerate	Valerate	Isocaproate	Caproate	Heptanoate
Initial	57.79 ± 3.63	24.75 ± 2.14	0.91 ± 0.36	22.04 ± 2.15	2.60 ± 0.49	2.45 ± 1.81	0.13 ± 0.02	3.16 ± 0.45	0.63 ± 0.18
D3	57.43 ± 2.25	29.11 ± 1.51	3.48 ± 0.24	18.92 ± 0.20	4.94 ± 0.24	0.56 ± 0.07	0.30 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.00 ± 0.00
D6	58.73 ± 1.02	32.43 ± 0.72	2.15 ± 0.22	19.32 ± 0.66	2.43 ± 0.08	0.32 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.01	0.00 ± 0.00
G3	86.91 ± 3.75	30.19 ± 2.52	2.91 ± 0.17	24.80 ± 1.77	4.76 ± 0.33	1.01 ± 0.13	0.49 ± 0.08	0.22 ± 0.05	0.27 ± 0.07
G6	41.2 ± 2.49	28.25 ± 2.03	5.42 ± 0.29	16.47 ± 0.81	5.22 ± 0.64	0.48 ± 0.08	0.36 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.32 ± 0.34
P3	42.88 ± 4.29	13.45 ± 0.84	4.28 ± 0.16	20.62 ± 1.68	6.10 ± 0.20	0.62 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.18 ± 0.05	0.00 ± 0.00
P6	43.06 ± 1.78	26.10 ± 1.36	3.61 ± 0.17	17.41 ± 1.51	3.53 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.01	0.00 ± 0.00
DP3	59.85 ± 1.48	21.41 ± 1.26	3.88 ± 0.13	19.47 ± 0.37	4.20 ± 0.15	2.36 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.00 ± 0.00
DP6	61.18 ± 6.13	32.48 ± 2.84	3.15 ± 0.37	17.40 ± 1.30	3.24 ± 0.17	0.32 ± 0.03	0.46 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.00 ± 0.00
GP3	70.79 ± 1.14	26.89 ± 0.30	4.28 ± 0.10	22.33 ± 0.86	6.26 ± 0.30	2.66 ± 0.23	0.00 ± 0.00	0.25 ± 0.02	0.00 ± 0.00
GP6	46.84 ± 2.39	36.07 ± 0.95	3.58 ± 0.00	18.24 ± 0.25	3.61 ± 0.02	0.46 ± 0.00	0.44 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.00 ± 0.00
DGP3	64.24 ± 1.10	29.76 ± 1.02	2.89 ± 0.34	21.31 ± 0.31	4.78 ± 0.13	1.97 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.32 ± 0.07
DGP6	59.24 ± 3.92	33.15 ± 1.22	2.49 ± 0.19	18.51 ± 0.53	2.05 ± 0.05	0.31 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.31 ± 0.09

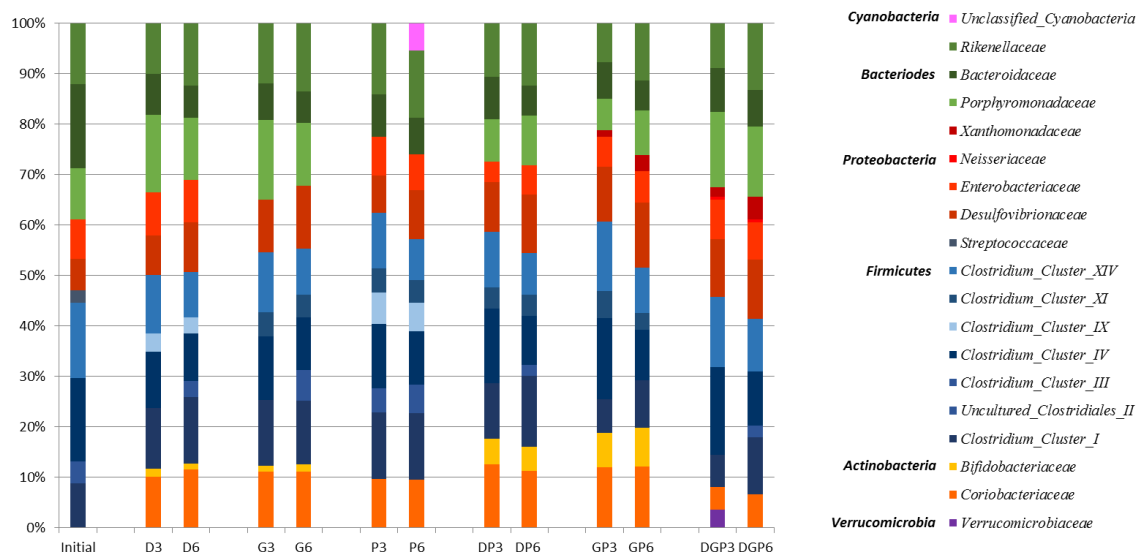
## Additional Data S3b: SCFAs proportion





## Additional Data S4a:

Taxonomic composition of microbiotas: proportion of bacteria at the phylum and family level (figure).



7

## Additional Data S4b: proportion of bacteria at the phylum and family level (table) and diversity indexes

Family	Initial	D3	D6	G3	G6	P3	P6	DP3	DP6	GP3	GP6	DGP3	DGP6
Verrucomicrobiaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
Coriobacteriaceae	0,00	0,10	0,12	0,11	0,11	0,10	0,09	0,13	0,11	0,12	0,12	0,04	0,07
Bifidobacteriaceae	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,05	0,05	0,07	0,08	0,00	0,00
Clostridium_Cluster_I	0,09	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,11	0,14	0,07	0,10	0,06	0,11
Uncultured Clostridiales II	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clostridium_Cluster_III	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06	0,05	0,06	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02
Clostridium_Cluster_IV	0,17	0,11	0,09	0,13	0,10	0,13	0,11	0,15	0,10	0,16	0,10	0,17	0,11
Clostridium_Cluster_IX	0,00	0,04	0,03	0,00	0,00	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Clostridium_Cluster_XI	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,03	0,00	0,00
Clostridium_Cluster_XIV	0,15	0,12	0,09	0,12	0,09	0,11	0,08	0,11	0,08	0,14	0,09	0,14	0,10
Streptococcaceae	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Desulfovibrionaceae	0,06	0,08	0,10	0,10	0,13	0,07	0,10	0,10	0,11	0,11	0,13	0,11	0,12
Enterobacteriaceae	0,08	0,08	0,08	0,00	0,00	0,08	0,07	0,04	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07
Neisseriaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Xanthomonadaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,02	0,05
Porphyromonadaceae	0,10	0,15	0,12	0,16	0,12	0,00	0,00	0,08	0,10	0,06	0,09	0,15	0,14
Bacteroidaceae	0,17	0,08	0,06	0,07	0,06	0,08	0,07	0,08	0,06	0,07	0,06	0,09	0,07
Rikenellaceae	0,12	0,10	0,12	0,12	0,13	0,14	0,13	0,11	0,12	0,08	0,11	0,09	0,13
Unclassified_Cyanobacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>

	Initial	D3	D6	G3	G6	P3	P6	DP3	DP6	GP3	GP6	DGP3	DGP6
Simpson_1-D	0,8774	0,8941	0,8986	0,8829	0,8934	0,898	0,9068	0,8969	0,9015	0,8984	0,9057	0,8854	0,8965
Shannon_H	2,18	2,299	2,353	2,193	2,293	2,336	2,427	2,326	2,385	2,369	2,413	2,273	2,335

#### II.1.2.1.4 Conclusion et perspectives

Il semble très difficile de maintenir le microbiote initial quel que soit le cryoprotecteur utilisé. La congélation atteint sévèrement la viabilité des microorganismes. Disposer de selles fraîches qui resteraient identiques à chaque inoculation pourrait être une alternative à ce problème, mais ne peut que difficilement être envisageable si des répétitions expérimentales sur le long terme sont nécessaires. Néanmoins, la conservation d'un inoculum reste à privilégier, pour d'autres cas que le celui qui nous préoccupe dans cette thèse : en effet, il serait souhaitable que des techniques de conservations fonctionnelles de microbiotes fécaux, efficaces et standardisables, puissent émerger. Ainsi, les échantillons pourraient être partagés entre laboratoire plus facilement, rendant également possible l'accès a posteriori d'échantillons provenant d'études menées même sur de large cohortes pour diverses expérimentations fonctionnelles / métaboliques. Également, la thérapie par transplantation de microbiotes fécaux (FMT, Fecal Microbiota Transplantation) qui suscite un grand intérêt et de grands espoirs pour certaines pathologies, pourrait gagner en sécurité. Enfin, de manière très intéressante pour l'avenir des études menées au laboratoire, les différentes méthodes de conservation ont permis de maintenir la viabilité de la population méthanogène, à la fois pour les *Methanobacteriales* et les *Methanomassiliicoccales*. Ces dernières restent très méconnues au niveau cellulaire, mais apparemment assez diversifiées dans les tractus digestifs animaux et humains. Ainsi, il peut être conclu que ces dernières sont conservables et étudiables dans le système ECSIM.

#### II.1.2.2 Étude *in vitro* de l'effet du ralentissement du temps de transit sur l'activité régionale du microbiote colique humain

##### II.1.2.2.1 Contexte de l'étude

Le microbiote d'une personne âgée est souvent caractérisé par un temps de transit ralenti, plus particulièrement au niveau colique [331, 263]. Parallèlement, nous avons mentionné dans l'étude bibliographique que le microbiote intestinal de la personne âgée était modifié [260, 264]. Dans les perspectives de ces travaux de thèse, nous avons mentionné que la population archéenne méthanogène semble plus favorablement associée à la personne âgée, en particulier les *Methanomassiliicoccales* [17, 234, 14]. De plus, le méthanogène majeur *Mb. smithii* est associé à des temps de transits intestinaux longs, voir des constipations [332]. Elaborer un système *in vitro* s'approchant du colon de la personne âgée passe donc logiquement par un système présentant une simulation de temps de transit plus long, ce qui devrait également favoriser ensuite la colonisation par les archées méthanogènes. Cependant, dans quel compartiment anatomique du colon est-il plus vraisemblable de trouver des méthanogènes ? Les données bibliographiques semblent indiquer qu'il s'agit préférentiellement des parties distales [247], alors que les données chez le rat indiquent une colonisation bien plus antérieure [324]. Puisque le temps de transit semble associé à la colonisation par les méthanogènes, en tout cas pour *Mb. smithii*, on peut imaginer deux hypothèses : *Mb. smithii* pourrait bénéficier de

conditions environnementales favorables à son développement selon la nature du microbiote, lui-même influencé par le temps de transit lent retrouvé chez les personnes âgées. Inversement, *Mb. smithii* pourrait s'implanter suite à de légères modifications de l'environnement intestinal (baisse des sécrétions biliaires par exemple), induire des modifications du microbiote qui favoriseraient / entretiendraient un temps de transit ralenti. Cette dernière hypothèse est en partie soutenue par l'action qu'aurait le méthane sur la motilité intestinale. Des informations préliminaires à l'étude de la biologie des archées méthanogènes dans le tractus gastro-intestinal humain sont nécessaires : Pour savoir si le temps de transit crée une niche favorable aux archées méthanogènes, il est tout d'abord nécessaire de déterminer les modifications, métaboliques et taxinomiques, induites par un temps de transit ralenti. Pour cette raison, le système tri-étagé 3S-ECSIM [323] a été utilisé comme modèle en doublant le temps de rétention par rapport aux vitesses de débit de milieu habituelles : on obtient ainsi une simulation d'un temps de transit global d'environ 96 h, contre 48 h pour un transit classique. Cette modification du taux de dilution a été employée avec succès par l'équipe de G.T. MacFarlane [329] qui a pu détecter dans leur système tri-étagé dont est dérivé celui du laboratoire, l'impact d'une accélération du temps de transit (passant d'environ 66 h à 22 h). Cette approche nous permettra également de voir si les modifications tendent vers un microbiote fécal de personne âgée, indiquant si le temps de transit est un facteur clé dans la constitution du microbiote. A cette fin, il est donc essentiel d'utiliser comme répertoire bactérien initial, un microbiote fécal d'adulte en bonne santé. De plus, celui-ci doit être non-méthanogène afin de détecter si des modifications éventuelles sont bien indépendantes des méthanogènes.

### II.1.2.3 Synthèse des résultats

Outre la fermentation en elle-même, de nombreuses analyses ont été réalisées : biomasses, profils microbiens par utilisation de la biopuce exploratoire HuGChip (niveau taxinomique résolutif de la famille bactérienne), profils métaboliques, à la fois des gaz atmosphériques issus des fermenteurs, des AGCCs produits, et profil métabonomique du milieu fermentaire (par LC-MS/MS). Dans ce cadre, mon travail personnel a essentiellement été l'aide à la détermination des compositions microbiennes (analyse des résultats HuGChip) et la détermination / l'analyse des résultats de mesure des AGCCs produits. La biopuce HuGChip a permis de visualiser les modifications au niveau taxinomique qu'entraîne une augmentation du temps de transit sur un microbiote initial provenant d'un jeune adulte en bonne santé. Ceci comprend des modifications générales, telles que celles observées chez les personnes âgées : diminution de la quantité bactérienne totale et de la diversité bactérienne au niveau distal. C'est également le cas pour certains groupes bactériens, tels que l'augmentation des entérobactéries. De manière intéressante, une augmentation de la famille des *Clostridium cluster XIV* est observée (ainsi que des *Clostridium cluster IV*). De plus, une diminution voire parfois une disparition des bactéries sulfato-réductrices de la famille des *Desulfovibrionaceae* est observée.

L'analyse qualitative et quantitative des AGCC montre que l'augmentation simulée du temps de transit induit de profondes modifications : en particulier, la production des AGCCs majoritaires comme de l'ensemble des AGCC est augmentée. Cette augmentation concerne également les AGCC ramifiés.

#### II.1.2.3.1 *Résultats détaillés : Article scientifique*

Cette partie est présentée sous forme d'un article scientifique destiné à être soumis à publication dans une revue scientifique internationale

# Colonic transit time as a driven force of the gut microbiota composition and metabolism: *in vitro* evidence

Running title: *In vitro* microbiota changes with transit time

W. Tottey,<sup>\*</sup> D. Fera-Gervasio,<sup>\*</sup> N. Gaci,<sup>\*</sup> B. Laillet,<sup>†</sup> E. Pujos,<sup>†</sup> J-F. Martin<sup>†</sup> J-L. Sebedio,<sup>†</sup> B. Sion,<sup>\*</sup> J-F. Jarrige,<sup>\*</sup> M. Alric,<sup>\*</sup> J-F Brugère<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>EA 4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>†</sup>INRA, UMR 1019, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Nutrition Humaine, Saint-Genès Champanelle, France

## ABSTRACT

**Background** Human gut microbiota harbors numerous metabolic properties essential for the host's health. It is known to be modified in elderly people. Increase of transit time is notably observed with human ageing. Thus we tested the metabolic and compositional changes of a human gut microbiota induced by an increased transit time simulated *in vitro*. **Methods** The *in vitro* system ECSIM was used to simulate the environmental conditions of three different anatomical parts of the human colon in a continuous process. The retention times of the chemostat conditions were established to correspond to a typical transit time of 48h next increased to 96h by increasing the retention time. The bacterial communities, short chain fatty acid (SCFA) and metabolite fingerprinting were performed using respectively the HuGChip microarray, GC and GC-MS. **Key Results** Increase of transit time resulted in a decrease of biomass and of diversity in the more distal compartments. SCFA analyses and metabolite fingerprinting revealed an increase of activity corresponding to carbohydrate fermentation in the proximal compartments while protein fermentations were increased in the lower parts. **Conclusions & inferences** These findings correspond to results reported in the gut microbiota of patients affected by increased transit time as described for elderly patients. This provides the evidence that the increase of transit time, independently of other factors, affects the gut microbiota. Furthermore, this is one of the factors that could explain, at least partly, the modifications seen in the gut microbiota of elderly.

## Key Messages

- Ageing has been associated with modifications of the gut microbiota. It is important to understand factors which can affect the gut microbiota of elderly people and how to overcome their effects.
- The aim of the research is to examine the effect of an increase of transit time on the gut microbiota studied with an *in vitro* colon model
- Composition and activity of the microbial activity is affected with modifications frequently reported on studies of microbiota from elderly groups.
- This study shows that a representation of a microbiota from elderly individuals can be reproduced in an *in-vitro* model by increasing the system's retention time. Such models could be used to study potential treatments (e.g. pro/prebiotics) to overcome detrimental effects.

**Key words** : *In vitro* simulation of the colon, gut microbiota, fermentation, 3S-ECSIM, HuGChip, transit time, retention time, elderly, ageing, aging

## INTRODUCTION

The increase of transit time or even constipation is frequently observed among the human population. This has likely important consequences on the gut microbiome as the gut harbors a complex ecosystem composed of  $10^{14}$  microbial cells which present an important metabolic diversity (1) and notably contributes to the host's health and well-being (2). Indeed, the colonic transit rate evaluated through the stool consistency (categorized by the Bristol Stoll Scale) has been strongly associated with the gut microbiota composition (3), with loose stool corresponding more frequently to the *Prevotella* enterotype (4) and with more abundant *Bacteroides*

spp. (3). This increase of transit time is also one of the gastrointestinal modification encountered in elderly people either living in community or in institutions (5, 6) and for whom human gut microbiota variations have been associated (7-9). As ageing has been associated to a decrease sensitivity of taste and smell (10, 11) and diet determined as a key factor of the gut microbiota composition (12), these changes could lead to the consumption of a restricted, nutritionally imbalanced diet and *in fine* the modification of the gut microbiota (13, 14). To address the real part of the transit time influence, drugs have been administered to cohorts to change the patient transit time (15, 16). These studies reported a negative correlation between the increase of transit time and the fecal microbial

biomass. Furthermore, the increase of transit time was positively correlated with the increase of methanogens, of breath methane concentrations and pH while being inversely correlated to the proportion of sulfate reducing bacteria and the concentration of short chain fatty acids (SCFA) (16).

*In vitro* systems have been developed and used to study the human gut (17) overcoming ethical questions (18). In previous experiments conducted by G.T. MacFarlane and collaborators, an *in vitro* system was used to simulate the passage from an average colon transit (66,7h) to a quick colon transit (27,1h) by a change of retention time. This modification induced variations on the microbial community structure and metabolic activity (19, 20).

The objective of our study was to evaluate the impact of the increase of the transit time on the gut microbiota in three anatomical parts of the colon, at the metabolic and taxonomic level, and to determine to which extent it could contribute to the distinctive gut microbiota of elderly people. The 3 stage continuous culture system 3S-ECSIM (21) was used with a fecal microbiota from a healthy adult. The effect of retention time was tested, from a normal duration to an increased one (overall transit time of 48 to 96h) on the microbiota composition and metabolism.

## MATERIAL AND METHODS

### 3S-ECSIM procedure

The fecal aliquot was obtained from a healthy female volunteer (29 years old), without recent treatment with antibiotics and not being a breath methane-producer. Briefly, one 2-mL faecal aliquot with 30% (v/v) glycerol (22) was unfrozen on ice and used to inoculate a 5-mL preculture of fermentation medium, grown at 37°C for 10h. It was transferred for 15h into a 1-L Erlenmeyer flask containing 95 mL of fermentation medium and into a 2-L bioreactor (GPC- Global Process Concept Inc., France) previously N<sub>2</sub> flushed containing 900 mL of fermentation medium for a 24h batch culture at 37°C, pH= 5.7 and 400 rpm. The same operations were used for each of the three-stage bioreactors R1 (proximal - P), R2 (transversal - T) and R3 (distal - D) with operating volume of 1L for each. After the 24h batch condition, the procedure and medium used were as described previously (21) (Table 1). Briefly, an initial retention time of 48h was applied to the system and after a 240h of stabilisation; it was increased to 96h by a decrease of dilution rate and left to stabilize for 480h. Samplings were performed in each reactor over a 48-h period, for microbial and biochemical analyses (total of 6 samples per condition). No gases were flushed during the course of the continuous culture, the

anoxic environment being progressively and dynamically enriched by the gases originating directly from the microbiota metabolism. The acquisition and control software C-BIO was used for the batch and culture continuous conditions.

### *In vitro* microbiota growth

Microbiota growth was evaluated by spectrophotometry (620 nm, Beckman® Coulter DU 640B spectrophotometer) and dry weight measurements. The biomass was measured on 5 mL of culture that were first centrifuged (13,000 x g, 10 min), then the pellet was washed three times with distilled water before being deposited under vacuum and dried at 104°C onto a pre-weighted membrane (Polyamid 0.45 µm, Sartorius).

### HuGChip microarray analysis

A community analysis was performed at the phylum and family level using the HuGChip, an explorative phylogenetic microarray designed to target the 66 bacterial families usually recovered from the human gastro-intestinal tract (GIT), which provided positive correlations with data from pyrosequencing of amplicons and metagenomic analysis (23). Briefly, the bacterial DNA was extracted from a 0.250 mL sample of fermentation medium as described by Yu and Morrison (2004) and followed by the Qiagen's DNA stool kit (Qiagen Ltd., West Sussex, UK) (24). Small subunit RNA coding genes were then amplified by PCR and purified using the MinElute PCR purification kit (Qiagen Ltd., West Sussex, UK). One µg was then labeled using either Cy3 or Cy5 (Genomic DNA ULS labeling Kit, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and hybridizations/washings were performed following the manufacturers recommendations. Microarray scanning was performed on a SureScan microarray scanner (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

### SCFA analysis

Short-chain fatty acids were quantified from a bioreactor volume of about 200 µL. It was quickly sampled, deproteinized using 400 µL of cold methanol and centrifuged (8,000 x g, 10 min). The supernatant was stored at -20°C until the analyses. It was used to determine the level of acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, isovalerate, valerate, caproate, isocaproate and heptanoate using gas chromatography (HP 6890 series, column HP-INNOVAX 30 m x 250 µm x 0.25 µm, split ratio=25:1, Agilent technologies). 2-Ethyl-butyrates was used as an internal standard.

### Metabolomic Fingerprint

The same supernatant as used for SCFA analysis was used. Here, it was evaporated under nitrogen and the dry residue was dissolved in the injection solvent (50/50 water/acetonitrile with 0.1% formic acid). 6  $\mu$ L were then injected into a chromatographic system (Waters Acquity UPLC module, Saint Quentin en Yvelines, France). Separations were carried out at 30°C using a 2.1 x 50 mm Acquity UPLC HSS T3 column (Waters), with a particle size of 1.8  $\mu$ m at a flow rate of 0.4 mL/min. Plasma was eluted from the LC column using the following linear gradient (curve number 6): 0–2 min: 100% A; 2–15 min: 0–100% B; 15–22 min: 100% B; 22–26 min 100% A for re-equilibration. Solvent A was water and solvent B was acetonitrile, both solvents containing 0.1% formic acid. The UPLC system was coupled to a Waters Qtof-Micro (Saint-Quentin en Yvelines, France) equipped with an electrospray source and a lockmass sprayer to ensure accuracy. Experiments were carried out in positive ion mode with a scan range from 70 to 1000 m/z. Capillary voltage was set to 3 kV and cone voltage was optimized at 30 V. The scan time and the dwell time were fixed at 1 and 0.1s, respectively. ESI needle and drying gas temperatures were set at 120 and 450°C, respectively. The drying and nebulizing gas flows (nitrogen) were set to 50 and 500 L/h. All analyses were acquired by using the lockspray with a frequency of 5s to ensure accuracy. Leucine enkephalin was used as the lock mass. To avoid possible differences between sample batches, a Latin square was carried out to obtain randomized analytical sequences. Raw data files were converted to NetCDF format using the Waters DataBridge software. All LC–MS data were processed using XCMS (Benton et al., 2008, Smith et al., 2006) to yield a data matrix containing retention times, accurate masses and normalized peak intensities. An identification of the molecules was performed on the basis of their exact masses which were compared to those registered in Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (25) or in the Human Metabolome Database (26).

### Statistical methods

For microarray analyses, pixel intensity data was extracted using the Feature Extraction software (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca). The retained intensity value for each probe was the spot's median intensity signal. Specific scripts developed with the Delphi and C++ signal were used to automatically perform data extractions as defined previously (23). SCFAs means were analyzed using one-way ANOVA variance analysis and multiple comparison tests were further performed using Tukey's test (KaleidaGraph 4.03, Synergy Software): differences were considered significant for p values

less than 0.05. For LC-MS experiments, data were normalized before analyses in order to get the same sum of signal on each spectrogram and analyzed using  $\text{Log}_{10}$  values. Normalized data are given as supplementary material Table S1. A PCA was also performed using PAST based on a Var-Covar matrix (27).

## RESULTS

### Retention time affects overall and specific gut microbiota communities

The change of retention time passing from a total of 48h to 96h induced a significant decrease of biomass in the T96 and D96 reactors which simulate the transversal and distal colon respectively (Figure 1). The bacterial community was next determined at the bacterial family taxonomic level. Some diversity indexes were used to assess the richness, evenness and species abundance in each compartments and allowed underlining an overall effect of a treatment on the ecosystem. They indicated modifications, with Shannon diversity indexes in the reactor 2 and 3 decreased with the slower retention time compared to the quicker one (Figure 1). When considering the proportions of bacterial families in both conditions, the *Clostridium* cluster IX family was increased in the 3 reactors with the increased retention time. Other changes were dependent of each simulated region: the first reactor, simulating conditions similar to the proximal colon, was the least affected: the main modifications were the diminution of *Clostridium Cl. I* and of the bacteria belonging to the family *Desulfovibrionaceae*. Furthermore, the apparition of bacteria from the family *Enterobacteriaceae* and the increase of *Coriobacteriaceae* were seen (Figure 1). In the reactor simulating the transversal colon, an increase of the *Clostridium Cl. XIV* with the higher the retention time was observed associated with a decrease of the families *Clostridium Cl. I*, *Coriobacteriaceae* and *Porphyromonadaceae*, and a disappearance of *Desulfovibrionaceae*. Finally, the third reactor simulating the distal colon was characterized by the most important diversity and where the modifications were the most important: an increase of the relative abundance of *Enterobacteriaceae*, and in a lesser extent of *Bacteroidaceae* and *Lactobacillaceae*, a decrease of the one of *Porphyromonadaceae* and loss of some uncultured *Clostridium* and of bacteria belonging to the *Rikenellaceae* family was observed. A Principal Component Analysis illustrates this changes induced by the retention time in each reactor (Figure 2.A): Microbial communities at the 2 different retention times coming from the same reactor shows a common clustering while microbial

communities of the three reactors, whatever being the retention time applied, are more distantly related.

### Retention time affects fermentative activities

As structural modifications were induced by the change of retention time, a qualitative and quantitative analysis of short-chain fatty acids (SCFA), one essential metabolic activity of the microbiota was performed. SCFA production is mainly formed of acetate, propionate and butyrate, this last being the fuel of intestinal epithelial cells. The increase of retention time induced an increase of total SCFAs in the first and second compartments. In the proximal-colon simulating reactor, this was principally due to the main SCFAs which are acetate, propionate and butyrate, while in the transversal simulating part T96, this was also due to longer and branched fatty acids in addition to propionate and butyrate (Table 2). In the third reactor, total SCFAs remains unaffected quantitatively, but a significant decrease of acetate was seen, partly compensated by a significant increase of longer and branched SCFA. This reveals a change in fermentative activities indicative of a higher putrefaction activity with the increase of the retention time.

### Retention time affects metabolic behavior of microbiota

A metabolomic analysis of the media of each reactor at both retention times was performed and revealed 554 different ions of over 100Da (Supplementary table 1). About half of them were quantitatively affected, indicating important metabolic shifts in the system: Overall qualitative changes with the increase of retention time were however limited: only one ion appeared in R1 and respectively 13 and 6 metabolites disappeared in R2 and R3 (Figure 3a). The most affected compartment was the one simulating the proximal colon, with a majority of increases (167 of the 203 significantly modified ions, Figure 3b). On the contrary, in following compartments (T96 and D96), the majority of impacted ions decreased. This indicates likely a decrease of possible microbial dietary intakes in the lower parts of the 3S-ECSIM when retention time increase, due to a better energy retrieval in the upper part.

## DISCUSSION

Ageing is frequently associated with gut microbiota modifications which can be explained by many different factors (12). Here, we hypothesize that an increase of transit time, which is frequently associated with elderly people (5), could be among those factors. Indeed, in baboon, ageing leads to an

abnormal neuronal stimulation from the myenteric plexus and by impairments in the cholinergic mechanism, therefore affecting the smooth muscle colonic contractile response (28). The aim of this study was to determine to which extent the transit time, considered as an independent factor, (i) could affect the microbiota and consequently its metabolic activity and (ii) could explain microbiota changes observed in elderly people. Multi-compartmental *in vitro* continuous culture systems allow the replication of the different physico-chemical conditions encountered in the colon. Numerous systems have been developed and allowed to study the impact of prebiotics, probiotics and antibiotics (29, 30) on the gut microbiota or even of the microbial composition at colon micro-environments (31, 32). The system used here has the particularity to maintain anaerobiosis due to the metabolic activity of the microorganisms constituting the microbiota. It also enables microbiota differentiations between the compartments from a common fecal bacterial repertoire and leads to similar microbial signatures between the distal compartment and the fecal inoculum (21). In the present study, we increased the retention time of media in each compartment in order to simulate an increase of transit time, from a normal one (48h total intestinal transit time) to a slow one (96h). This was realized by adjusting media supply rates, with no other parameters changes in the entry of the *in-vitro* system.

This retention time change induced modifications to the reconstituted gut microbiota such as a reduction of biomass, which is in line with *in-vivo* modifications reported with a medication-induced reduction of transit time in Humans (15). This also induced a decrease of total bacteria in the compartments of the system simulating the transversal and distal colon (data not shown) which is also frequently associated with the gut microbiota of elderly people (33-35). Furthermore, this increase of retention time decreased the gut microbiota diversity in the transversal and distal compartment of the system as seen in the fecal microbiota of elderly people (36, 37). Consequently, an important metabolic shift, but mainly at a quantitative level was observed: the proximal colon simulating reactor was the most affected. When tested *ex-vivo* on rats duodenum at various dilutions, the liquid media from reactors did not affect the motility either when retrieved from elevated retention time or normal retention time (data not shown). Therefore, it seems that these metabolites changes do not in turn affect the transit time.

The important metabolic shift in the proximal part together with the increase of total



SCFA when retention time increases suggests an increase of carbohydrate fermentation in this compartment as previously reported (19). This has several consequences: first, carbohydrates availability become lower in the next compartments, resulting in increased putrefaction by specialized groups, and, second, this induces a decrease in microbial diversity: this is also confirmed by an increase of the concentration of longer and branched fatty acids (typical of protein fermentation) and with the limited metabolic activity in the compartments simulating the transversal and distal colon.

*Clostridium* cluster IX spp. increased in the 3 compartments of our system, principally in the first compartment: this family includes bacteria belonging to the *Veillonella* genus which are however not capable to use carbohydrates as energy substrate: they metabolize lactate in propionate and use amino acids as an energy source (38) and therefore their increased presence in the first and second reactor sustains the observed increase of propionate. Furthermore, in the second and third fermentors the increase in branched fatty acid would suggest an increase of proteolytic bacterial activity that is frequently reported in the elderly people (39). Also, our results support the decrease of *Porphyromonadaceae* and of *Rikenellaceae* (40) and the increase of *Enterobacteriaceae* (7, 41, 42) observed in the gut microbiota of elderly people. At last, no changes in *Bacteroidaceae* were observed in any reactors, agreeing with the recent finding that these bacterial species were associated with loose stool (3). Therefore, *in-vitro* results obtained in this study provide strong elements that transit time seems a major driven force of the gut microbiota composition.

It also provides clues about the prevalence and abundance of methanogenic archaea, and among them, of the most important one *Methanobrevibacter smithii* (*Mb. smithii*), which are increased in elderly people (43, 44). They are described as being correlated with an increase of transit time and inversely correlated to sulfate reducing bacteria (16). Here, the initial stool from a healthy adult was chosen without methanogens, which was confirmed by the absence of CH<sub>4</sub> in the gas produced by any reactor. In a recent study, we showed that the inoculation and development of *Mb. smithii* induced a specific increase of

*Clostridium Cl. IV* and *Cl. XIV* (45), agreeing with one of the three human enterotypes, the so-called *Ruminococcus-Mb. smithii* one (4). Here also, without methanogens, and mainly in the second reactor, the increase of retention time induced an increase of *Clostridium Cl. XIV*, possibly providing a favorable ecological nest for methanogens: Two complementary non-exclusive mechanisms may be proposed: (i) in a similar way described for this methanogen and *Bacteroides thetaiotaomicron* (46), a mutualistic partnership may exist between these two groups, as *Mb. smithii* in turn favors the communities that degrade cellulose (47). Moreover, (ii) increasing the retention time led to the decrease of one major competitor group of methanogenic archaea, the sulfate-reducing bacteria (disappeared in the T96 reactor), where *Clostridium Cl. XIV* are the most increased. This has important physiological issues as it has been proposed that methane, one end-product of the gut metabolic processes, mediates slower transit time (48), and would therefore sustain, even favor the slower transit time of elderly people.

*In vitro* systems have several limitations with their reproduction of the colonic environment. The main limit is that the interactions between the microbiota and the host are not reproduced: among them, the absorption of water and of nutrients which lead *in vivo* to fecal consistency modifications, has likely also importance towards the microbial development. However, our results show that such system can replicate modifications seen in the gut microbiota of elderly people. The development of such models could help understanding the impact of a factor on the gut microbiota and studying how some treatments could overcome deleterious bacterial developments. *In vitro* systems do not require the validation by ethic committees and could allow pre-clinical tests (18).

In conclusion, although *in vitro* systems present some limitations, they allowed the independent study of the effect of a single factor. The one used here revealed that transit time, simulated through retention time, is a driven force of the gut microbiota and explained, at least partly, modifications seen in the gut microbiota of elderly people, inducing the structural and metabolic changes of the gut microbiota with other capital elements such as nutrition and health.

## References

1. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; **464**: 59-65.
2. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley E. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology & Motility* 2013; **25**: 4-15.

3. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* 2015; gutjnl-2015-309618.
4. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; **473**: 174-180.
5. Madsen JL, Graff J. Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age and ageing* 2004; **33**: 154-159.
6. Rao SS, Go JT. Update on the management of constipation in the elderly: new treatment options. *Clinical interventions in aging* 2010; **5**: 163.
7. Biagi E, Nylund L, Candela M, et al. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 2010; **5**: e10667.
8. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; **108**: 4586-4591.
9. Jeffery IB, Lynch DB, O'Toole PW. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME journal* 2015.
10. Weiffenbach J, Bartoshuk L. Taste and smell. *Clinics in geriatric medicine* 1992; **8**: 543-555.
11. Doty RL, Shaman P, Applebaum SL, Giberson R, Sikorski L, Rosenberg L. Smell identification ability: changes with age. *Science* 1984; **226**: 1441-1443.
12. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; **488**: 178-184.
13. Biagi E, Candela M, Turrioni S, Garagnani P, Franceschi C, Brigidì P. Ageing and gut microbes: Perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacological Research* 2012.
14. O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science* 2015; **350**: 1214-1215.
15. Stephen AM, Wiggins H, Cummings J. Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man. *Gut* 1987; **28**: 601-609.
16. El Oufir L, Flourie B, Des Varannes SB, et al. Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* 1996; **38**: 870-877.
17. Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology* 2012; **30**: 17-25.
18. Venema K, van den Abbeele P. Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2013; **27**: 115-126.
19. Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microb Ecol* 1998; **35**: 180-187.
20. Child MW, Kennedy A, Walker AW, Bahrami B, Macfarlane S, Macfarlane GT. Studies on the effect of system retention time on bacterial populations colonizing a three-stage continuous culture model of the human large gut using FISH techniques. *FEMS microbiology ecology* 2006; **55**: 299-310.
21. Feria-Gervasio D, Tottey W, Gaci N, et al. Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobia to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods* 2014; **96**: 111-118.
22. Feria-Gervasio D, Denis S, Alric M, Brugère J-F. In vitro maintenance of a human proximal colon microbiota using the continuous fermentation system P-ECSIM. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; **91**: 1425-1433.
23. Tottey W, Denonfoux J, Jaziri F, et al. The human gut chip "HuGChip", an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *PLoS One* 2013; **8**: e62544.
24. Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 2004; **36**: 808-812.
25. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 2000; **28**: 27-30.
26. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: D521-526.
27. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 2001; **4**(1): 9pp.
28. Tran L, Meerveld GV. In a non-human primate model, aging disrupts the neural control of intestinal smooth muscle contractility in a region-specific manner. *Neurogastroenterology & Motility* 2014; **26**: 410-418.
29. Kovatcheva-Datchary P, Egert M, Maathuis A, et al. Linking phylogenetic identities of bacteria to starch fermentation in an in vitro model of the large intestine by RNA-based stable isotope probing. *Environmental microbiology* 2009; **11**: 914-926.
30. Payne S, Gibson G, Wynne A, Hudspeth B, Brostoff J, Tuohy K. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 2003; **4**: 1-8.
31. Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane GT. Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71**: 7483-7492.
32. Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, et al. Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *The ISME journal* 2012; **7**: 949-961.
33. Hopkins M, Sharp R, Macfarlane G. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001; **48**: 198-205.
34. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 3575-3581.
35. Mäkituokko H, Tiihonen K, Tynkkynen S, Paulin L, Rautonen N. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *British Journal of Nutrition* 2010; **103**: 227.
36. Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 6113-6122.
37. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research* 2010; **38**: e200-e200.
38. Bernalier-Donadille A. Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroentérologie clinique et biologique* 2010; **34**: S16-S22.
39. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 2007; **102**: 1178-1186.
40. Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, Molenaar D, et al. 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* 2009; **11**: 1736-1751.
41. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology* 2009; **9**: 123.
42. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, et al. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72**: 1027-1033.
43. Mihajlovski A, Dore J, Levenez F, Alric M, Brugère JF. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ Microbiol Rep* 2010; **2**: 272-280.
44. Fernandes J, Wang A, Su W, et al. Age, Dietary Fiber, Breath Methane, and Fecal Short Chain Fatty Acids Are Interrelated in Archaea-Positive Humans. *J Nutr* 2013.
45. Tottey W, Gaci N, Borrel G, Alric M, O'Toole PW, Brugère J-F. In-vitro model for studying methanogens in human gut microbiota. *Anaerobe* 2015; **34**: 50-52.
46. Samuel BS, Gordon JL. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 10011-10016.
47. Chassard C, Goumy V, Leclerc M, Dell'homme C, Bernalier-Donadille A. Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS microbiology ecology* 2007; **61**: 121-131.
48. Pimentel M, Lin HC, Enayati P, et al. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006; **290**: G1089-G1095.

**TABLES:**

Table 1: Fermentation conditions used in the ECSIM system to simulation a normal and a slow transit time by a modification of the retention time.

Reactor	pH	Dilution rate (h <sup>-1</sup> )	Retention time (h)	Minimum doubling time (h)
<b>Simulation of a 48 h transit</b>				
R1 - P48	5,8	0.080	12.48	8.65
R2 - T48	6,2	0.056	17.76	12.31
R3 - D48	6,8	0.056	17.76	12.31
<b>Simulation of a 96 h transit</b>				
R1 - P96	5,8	0.040	24.96	17.3
R2 - T96	6,2	0.028	35.52	24.62
R3 - D96	6,8	0.028	35.52	24.62

Table 2: SCFA analysis at the two different retention times for each reactor.

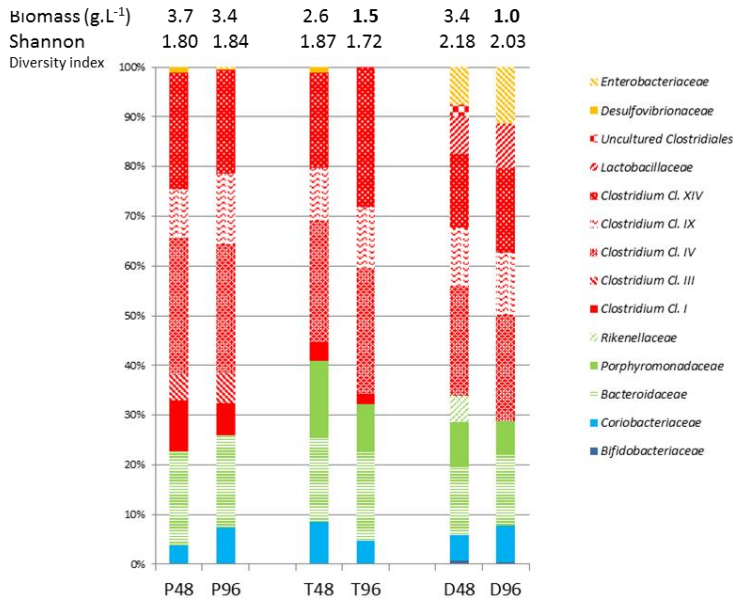
Conc (mM)	P48	T48	D48	P96	T96	D96
Acetate	50.2±1.7	19.7±1.5	26.1±2.2	<b>60.8±1.5</b>	19.9±3.5	<b>20.3±1.4</b>
Propionate	19.9±0.6	5.4±1.7	8.7±1.1	<b>22.7±1.3</b>	<b>8.6±0.9</b>	8.6±0.4
Butyrate	14.1±1.5	3.4±0.1	9.0±1.0	<b>17.1±0.4</b>	<b>9.5±0.9</b>	11.6±2.5
TOTAL APB	84.2±0.7	28.5±3.2	43.8±4.2	<b>100.6±3.1</b>	<b>38.0±4.8</b>	40.5±4.3
Valerate	2.9±0.1	0.8±0.0	3.3±0.6	2.8±0.1	<b>1.3±0.2</b>	<b>1.7±0.3</b>
Caproate	2.1±0.1	0.7±0.1	2.3±0.1	2.0±0.0	<b>0.9±0.0</b>	<b>1.8±0.2</b>
Heptanoate	0.7±0.1	0.7±0.1	1.6±0.1	0.7±0.0	0.7±0.0	1.7±0.3
Isobutyrate	4.9±0.3	1.3±0.1	2.7±0.4	4.7±0.1	<b>3.4±0.0</b>	2.8±0.6
Isovalerate	4.2±0.5	1.0±0.1	2.5±0.2	3.7±0.1	<b>3.5±1.0</b>	<b>6.1±1.0</b>
Isocaproate	2.5±0.0	1.0±0.1	2.3±0.1	2.6±0.1	<b>1.4±0.1</b>	<b>1.3±0.1</b>
TOTAL SCFA	101.5±0.4	33.8±3.7	58.5±5.7	<b>117.0±3.4</b>	<b>49.1±5.9</b>	55.7±6.3

Values reported in the table are corrected values (e.g. the concentration in the reactor T48 corresponds to the concentration measured in the reactor to which the concentration of the reactor P48 was subtracted).

Numbers in bold are SCFA concentrations at the slow retention time which are significantly different to the values obtained in the same reactor at the normal simulated transit time.

**FIGURES:**

**A**



**Figure 1: Microbial analysis of the gut microbiota in each reactor at the two different simulated transit time.**

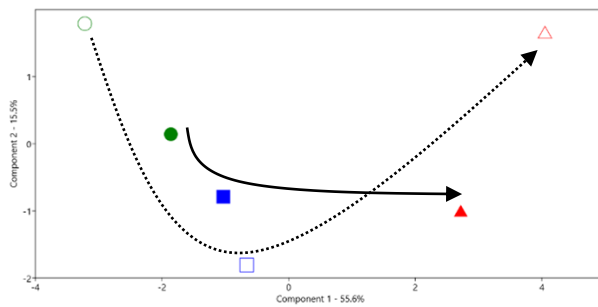
(A) Bacterial family proportions in each reactors: The numbers in bold correspond to values obtained at the slow simulated transit time which are significantly different when compared to the values obtained in the same reactor at the normal simulated transit time ( $p < 0.05$ ). Shannon diversity index characterizes the diversity in a community, i.e. species abundance and evenness. Biomass is indicated in g of dry matter per liter of medium.

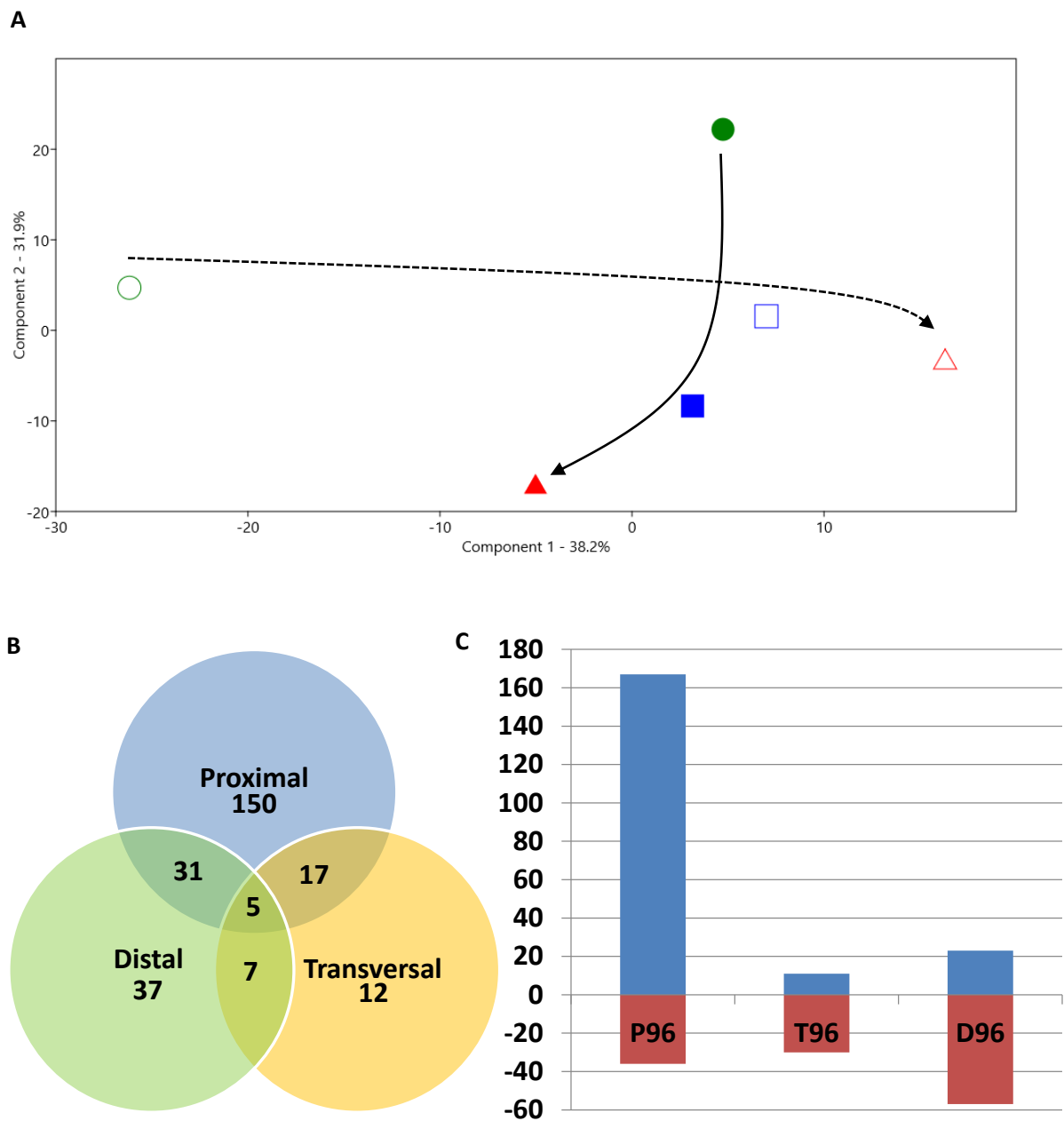
Phyla are depicted in blue (*Actinobacteria*), green (*Bacteroidetes*), red (*Firmicutes*) and orange (*Proteobacteria*)

(B) Correlation matrix based PCoA of the microbial profiles obtained with the three reactors at the 2 simulated transit times.

Empty symbols, 48h transit time simulation; Filled symbols, 96h transit time simulation; Circles, proximal part; Squares, transversal part; Triangle, distal part.

**B**





**Figure 2: Analysis of the metabolomic data obtained for each reactor at the two different simulated transit times.**

A) Correlation matrix based PCoA analysis of metabolites profiles in each reactor (Empty symbols, 48h transit time simulation; Filled symbols, 96h transit time simulation; Circles, proximal part; Squares, transversal part; Triangle, distal part)

B) Venn diagram of the 259 ions which are significantly modified with the increase of the simulated transit time, showing shared ions among the different simulated anatomical parts. C) Graphic representation of the proportion of ions which are significantly increased (blue) and decreased (red) in the three reactors with the simulated increase of transit time.

#### II.1.2.3.2 Conclusion et perspectives

Le système 3-ECSIM permet l'étude du microbiote intestinal en isolant les facteurs (exogènes ou endogènes) à tester s'affranchissant des paramètres liés à l'hôte. L'établissement d'un temps de renouvellement du milieu plus lent a permis de retrouver des résultats établis *in vivo* chez la personne âgée souvent caractérisée par un temps de transit lent. Ainsi, le temps de transit participerait pour une part non-négligeable dans la modification structurelle et fonctionnelle du microbiote colique, chez la personne âgée, à côté d'autres éléments capitaux tels que la nutrition, l'absorption et la santé. Il est possible que cette nouvelle niche créée soit plus favorable à la prolifération des archées méthanogènes. En effet, l'augmentation de bactéries de type *Clostridium cluster XIV* et la diminution / disparition des *Desulfovibrionaceae* plaide en faveur de l'instauration d'un environnement plutôt favorables aux méthanogènes de type *Mb. smithii*. La famille *Clostridium cluster XIV* contient notamment des bactéries du genre *Ruminococcus spp.* Ces dernières se trouvent en proportion plus importantes dans un des trois entérotypes décrits par Arumugam et al. en 2012, avec le terme évocateur d'entérotipe *Ruminococcus-Methanobrevibacter*, où ces deux organismes se retrouvent associés [333]. On connaît déjà l'apport synergique de *Mb. smithii* dans l'efficacité de fermentation de *B.thetaiotaomicron* [231] et l'avantage mutuel qu'en tirent ces deux organismes. Il est possible que de tels liens existent également entre certains membres de *Clostridium cluster XIV* et *Mb. smithii* : ceci expliquerait (i) cette co-association *Ruminococcus - Methanobrevibacter* retrouvée fréquemment chez l'Homme, et (ii), l'installation de cette dernière chez la personne âgée, où, de par la diminution du temps de transit, *Clostridium cluster XIV* se retrouve augmenté. Des expériences menées en co-inoculation d'animaux gnotobiotiques permettraient d'apporter des éléments de réponse. Enfin, la diminution / disparition des *Desulfovibrionaceae* est également un élément extrêmement favorable à *Mb. smithii* ainsi qu'à l'ensemble des méthanogènes hydrogénotrophes, en réduisant un compétiteur pour l'hydrogène.

#### II.1.2.4 Élaboration d'un modèle *in vitro* d'étude des archées méthanogènes dans un environnement intestinal simulé

##### II.1.2.4.1 Contexte de l'étude

Des études précédentes, il peut être conclu que les outils *in vitro* de type ECSIM permettent de simuler un environnement colique de personne âgée (étude sur la simulation du temps de transit) et que le développement d'archées méthanogènes y est possible : ceci est vrai à la fois de manière théorique (étude sur la simulation du temps de transit) et de manière réelle (révélée avec l'étude sur les cryoprotecteurs). Il est donc maintenant envisageable de mettre en place un modèle *in vitro* d'étude des archées méthanogènes dans le microbiote intestinal humain. Ce modèle doit idéalement permettre de maintenir des microbiotes fécaux humains avec leur composante méthanogène, permettre d'inhiber spécifiquement la composante méthano-

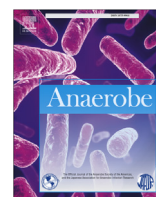
gène, et inversement, permettre d'introduire des archées méthanogènes dans des microbiotes non-méthanogènes.

#### II.1.2.4.2 Synthèse des résultats

Il a été possible de maintenir un microbiote méthanogène-positif (*Mb. smithii*) à des taux comparables à ceux observés dans le microbiote fécal initial dans le système mono-étagé ECSIM. Celui-ci a cependant dû être placé à un pH de 6.2. Un essai préliminaire à pH= 5.75 s'est en effet avéré infructueux. Ce développement s'est caractérisé par la production de méthane. Il a été également possible d'inhiber le développement de *Mb. smithii* par ajout dans le fermenteur d'un inhibiteur spécifique de la méthyl-coM réductase MCR, dernière enzyme commune de la méthanogénèse. Cet inhibiteur, le BES (2-bromo-ethane sulfonate), a provoqué une disparition de méthane dans l'atmosphère du fermenteur, et une diminution progressive du nombre de cellules de *Mb. smithii* dans le fermenteur, mesuré par qPCR. Le taux de diminution de *Mb. smithii* est compatible avec celui d'un lavage progressif de l'archée du fermenteur, indiquant une très probable inhibition de l'archée. De plus, l'archée méthanogène principale du microbiote intestinal humain, *Mb. smithii* souche ATCC 35061 a pu être inoculée et implantée *in vitro* avec succès à la fois dans un microbiote colique non méthanogène et dans le microbiote méthanogène précédent. L'analyse des groupes taxinomiques réalisée avec la biopuce HuGChip confirme également que les groupes reportés dans l'étude précédente (*Clostridium clusters I, IV* et *XIV*) sont fortement associés à la présence de *Mb. smithii*, et qu'à l'inverse un antagonisme existe avec les sulfato-réducteurs *Desulfovibrionaceae* qui deviennent indétectables en présence de *Mb. smithii* et réapparaissent après inhibition des méthanogènes par le BES. L'introduction *in vitro* de *Mb. smithii* dans un microbiote non-méthanogène s'est avérée possible. Cependant, les conséquences sur le microbiote ont été drastiques avec une modification profonde et une perte de diversité très importante.

#### II.1.2.4.3 Résultats détaillés : Article scientifique

Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans le journal Anaerobe comme note technique, en tant que co-1er auteur avec William Tottey. Nous avons tous deux œuvré aux expériences de fermentation. Mon apport plus particulier concerne la mesure du taux de méthanogènes et la culture de la souche inoculée *Mb. smithii* ATCC 35061, ainsi que la mesure des gaz atmosphériques.



## Technical note

*In-vitro* model for studying methanogens in human gut microbiota

William Tottey<sup>a,1</sup>, Nadia Gaci<sup>a,1</sup>, Guillaume Borrel<sup>b</sup>, Monique Alric<sup>a</sup>, Paul W. O'Toole<sup>b</sup>, Jean-François Brugère<sup>a,\*</sup>



<sup>a</sup> EA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> School of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Ireland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 April 2015

Received in revised form

12 April 2015

Accepted 13 April 2015

Available online 14 April 2015

## ABSTRACT

Reported failures with gnotobiotic animal models led us to establish an *in-vitro* model of reciprocal conversion of methanogenic and non methanogenic microbiota from human fecal samples. Consequences on gas and microbiota compositions are reported. This should facilitate the study of the controversial role of gut methanogens in human health.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Keywords:

*Methanobrevibacter smithii*

Colon

*In vitro* systems

Human gut archaea

Gut microbiota

ECSIM

The human gut microbiota is a very abundant and diverse ecosystem reaching  $10^{12}$  microorganisms per gram of feces and is composed of around 400 different bacterial species per individuals [1]. Several archaeal species are also recovered, mostly methanogens of two main orders, Methanobacteriales and Methanomassiliicoccales [2] that can be carried independently [3]. Methanogens have been related to various disease conditions encompassing irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease, colorectal cancer, anorexia or obesity, and some species can activate dendritic cells [4], but their role in human health remains ambiguous [2]. Inversely, due to their unique metabolic properties [5], Methanomassiliicoccales representatives have been also recently proposed as potent probiotics ("Archaeobiotics") towards prevention of cardiovascular disease or trimethylaminuria [6]. Prevalence of methanogens in human gut is age/geographical/diet/host genetic dependent [2,3]. One of them, *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*) [7] can be found at very high level in fecal matter and is positively correlated with the enterotype dominated by the genus *Ruminococcus* [1]. It shows typical adaptations to the human

gut like adhesion-like proteins with substrate-regulated expression and glycans mimicking those found in the gut [8,9].

*M. smithii* was successfully cultured in axenic mice with or without colonization with *Bacteroides thetaiotaomicron* [10], but it was reported that the colonization of *M. smithii* with a consortium of human gut-derived bacterial members was not achieved in this model [3,8]. Due to unclear role in health and disease, as well as potent probiotics use, there is a need of models to help better understand the biology and ecology of methanogens in the gut. Gibson et al. (1988) achieved to study methanogenesis and sulfate reduction in their 3 stage continuous culture system, with the communities harboring these metabolic functions already present in the fecal sample [11]. We therefore planned to establish a model based on the ECSIM system [12] to study the role of methanogens in human gut microbiota, using *M. smithii* as a model organism. This *in-vitro* model presents the unique property to maintain a gut microbiota under anaerobia generated by the own metabolism of the fermentor. We tried first to culture an inoculum derived from a human fecal sample presenting *M. smithii* (Mbs<sup>+</sup> sample) as the sole methanogenic archaeon detected (negative PCR tests for *Methanosphaera stadtmanae* and Methanomassiliicoccales [13]; no methane detected in batch cultures). It was used to inoculate two ECSIM systems, fed with the same medium. *M. smithii*, as other gut methanogenic archaea, has a slow doubling time and is associated to slow intestinal transit times [7]. A dilution rate of  $0.04 \text{ L h}^{-1}$ ,

\* Corresponding author. EA-4678 CIDAM, 5e CBRV, Université d'Auvergne, Place Henri Dunant, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

E-mail address: [jf.brugere@udamail.fr](mailto:jf.brugere@udamail.fr) (J.-F. Brugère).

<sup>1</sup> The authors want to be known that William Tottey and Nadia Gaci should be considered as co-first authors due to their equal contribution to this work.



corresponding to a retention time (RT) of 25 h in these 1-L fermentors, was therefore applied (over 3 times its normal doubling time). Experiments were led at pH 6.2 rather than more acidic ones, *M. smithii* being known to develop at pH near neutrality [14]. The stabilization of the chemostats was considered after 8 RT ( $8 \times 25 = 200$  h). At this time ( $T_0$  of the experiment), fermentors showed a methanogenic activity with little methane detected in the gas phase (Fig. 1B and data not shown). In one of the two fermentors, we then added 10 mL of a pure culture of *M. smithii* ATCC 35061 (OD<sub>600nm</sub> = 0.40) and the fermentations were further continued for an additional 8 RT ( $T_{200}$ ). This led to a little increase of the load of *M. smithii* as determined by qPCR (Table 1): around  $10^{10}$ – $10^{11}$  copies of the *mcrA* gene (encoding the subunit  $\alpha$  of the methyl-CoM reductase, specific to methanogens) per mL of fermentation medium were detected (Table 1). This corresponds to an *M. smithii* (*mcrA*)/total bacteria load (16S rRNA gene) ratio of around respectively 1.0% and 3.4%, compared to an initial ratio of 6.0% in the Mbs<sup>+</sup> stool sample. Importantly, this overload had very

**Table 1**

*M. smithii* loads through *mcrA* gene copies determined by qPCR assay (n = 3).

	Mbs <sup>+</sup> stool	Mbs <sup>+</sup> stool	Mbs <sup>-</sup> stool
Stools <sup>a</sup>	10.92 (12.14)	10.92 (12.14)	ND (11.93)
$T_0$ <sup>b</sup>	9.02 (11.97)	9.03 (11.98)	ND (11.59)
		+ <i>M. smithii</i>	
$T_{200}$ <sup>b</sup>	10.02 (12.00)	10.61 (12.08)	10.08 (12.07)
	+ BES	+ BES	+ BES
$T_{400}$ <sup>b</sup>	6.99 (12.19)	7.92 (12.16)	7.37 (12.12)
% <i>M. smithii</i> copies, $T_{400}$ vs $T_{200}$	0.09	0.20	0.19

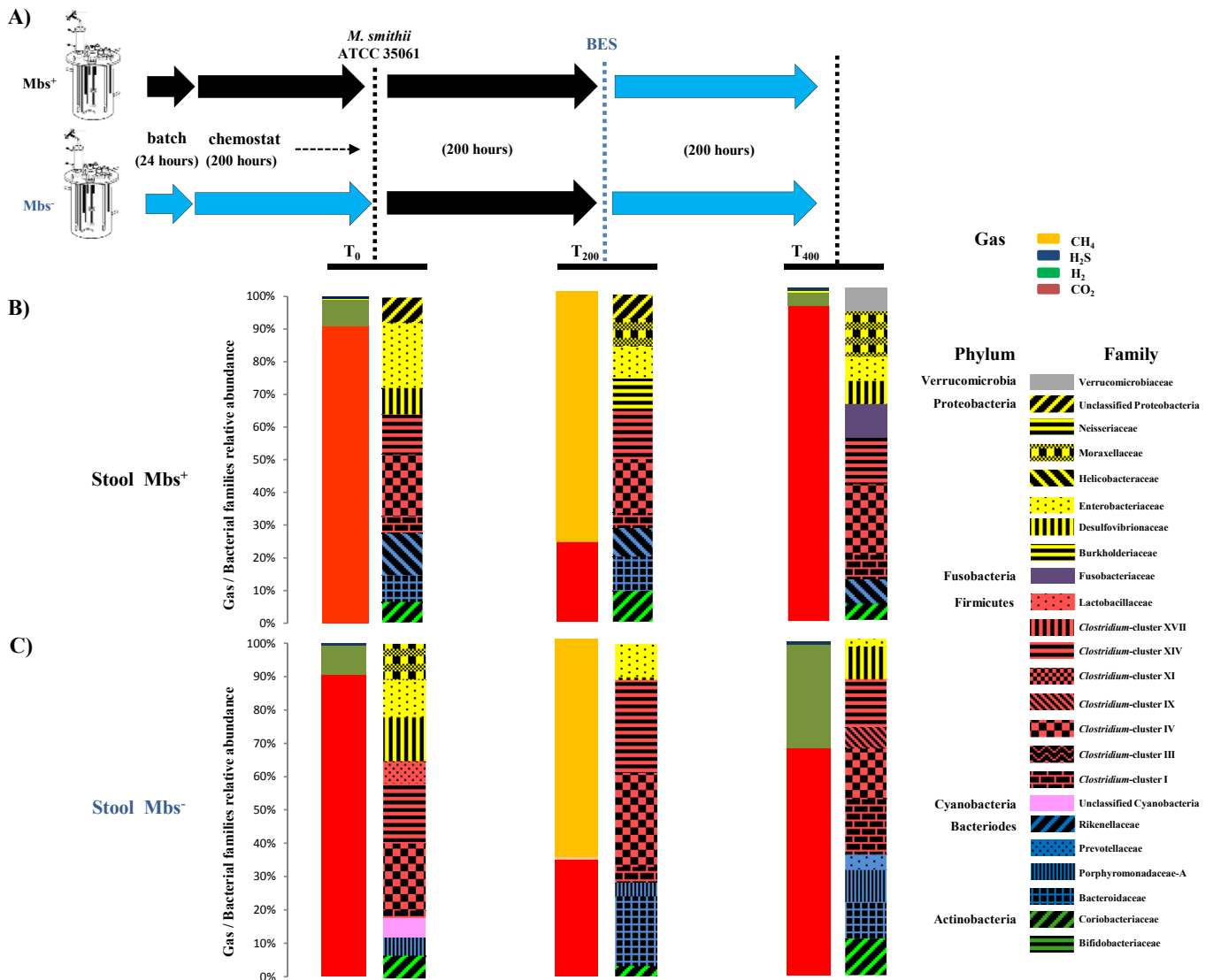
ND: None detected.

In brackets stands the bacterial load (in Log<sub>10</sub> of 16S gene copies per mL of medium).

<sup>a</sup> Log<sub>10</sub> of *M. smithii* per g of stools.

<sup>b</sup> Log<sub>10</sub> of *M. smithii* per mL of medium.

slight effect on bacterial composition when analyzed with the HuGChip [15] (correlation between probes signals:  $R^2 = 0.91$  between the two fermentors after *M. smithii* addition, vs  $R^2 = 0.95$



**Fig. 1.** Gas and microbial composition in bioreactors in presence/absence and addition/inhibition of *M. smithii* ATCC 35061. Time course and design of experiments are shown in the upper part (A) with indication of the addition of *M. smithii* ATCC 35061 ( $T_0$ ) and of the methanogen-specific inhibitor BES ( $T_{200}$ ). These fermentations studies were also conducted with no addition of *M. smithii* on an initially Mbs<sup>+</sup> inoculum derived from human stools (not shown, see text for further details). Results obtained on an initially Mbs<sup>+</sup> inoculum (B) and on an Mbs<sup>-</sup> inoculum (C) are depicted with the relative abundances of gas (left histogram of each pair) and of bacterial families of the microbiota (right histogram of each pair). The legends for gas (upper part) and bacterial families (lower part) are indicated on the right part of the figure.

before, data not shown).

We also performed a third fermentor in the same conditions, but using an initial inoculum devoid of *M. smithii* (Mbs<sup>-</sup> sample), as determined by qPCR assays/batch cultures. As expected, no methane was detected after stabilization (Fig. 1C). Two hundred hours after addition of 10 mL of a pure culture of *M. smithii* ATCC 35061 (similarly to initially Mbs<sup>+</sup> fermentor), methane was detectable at a high gas proportion (around 70%, Fig. 1C). This methane production (about twice as rapid than in Mbs<sup>+</sup> fermentors) was likely due to a rapid metabolic and ecological adaptation of *M. smithii*. Interestingly, *M. smithii* reached similar levels (around Log<sub>10</sub> = 10 of *mcrA* gene copies, with an *M. smithii*/bacteria ratio (*mcrA*/16S gene copies) of 1.0%, Table 1).

Influence of *M. smithii* in these consortia initially containing or devoid of *M. smithii* was addressed by adding once BES (2-bromoethanesulphonic acid) at a final concentration of 10 mM, a specific inhibitor of methanogens [16]. The inhibitory effect was clearly detectable with a complete disappearance of methane in the atmosphere (Fig. 1B and C, T<sub>400</sub>) and a number of *mcrA* gene copies falling to Log<sub>10</sub> = 7.0–7.9 (Table 1), 200 h after. These values corresponded to 0.09%/0.20% of the values obtained just before BES addition (Table 1), indicating likely a wash effect (expected theoretical values: 0.39% after 8 RT). Hydrogen sulfide reappeared in all fermentors (0.8–0.9%, Fig. 1B and C, T<sub>400</sub>), with similar levels than initially detected with the Mbs<sup>-</sup> inoculum (Fig. 1C, T<sub>0</sub>). The microbial composition also indicated that Desulfovibrionaceae (the main group of sulfate-reducing bacteria (SRB) of the gut microbiota) was shown to disappear with *M. smithii* development (detection threshold around 0.1%, [15]) and to reappear following BES treatment (Fig. 1). This negative correlation ( $r_s = -0.841$ , two-tailed p value <0.05, n = 6) is likely due to a mutual exclusion from competition towards H<sub>2</sub>, agreeing with other data showing that archaea competitively displace sulfate-reducing bacteria in the human gut microbiota [16,17]. Whether SRBs have been reactivated from a stable maintained pool, or from a not yet-washed SRBs pool remains to be determined. Also, a positive correlation was observed between the development of *M. smithii* and the abundance of the bacteria belonging to the family Bacteroidaceae ( $r_s = 0.886$ , two-tailed p value <0.05, n = 6) together with a trend towards an increase of bacteria of the *Clostridium* clusters IV and XIV when the archaeon develops in the initially Mbs<sup>-</sup> inoculum (Fig. 1B). This supports that *M. smithii* is strongly correlated with some Firmicutes of the *Clostridium* clusters I, IV and XIV closely related to cultured acetogens [18].

Therefore, this experimental procedure provides an alternative to animal models, as *M. smithii* failed to be established in conventionalized rodents with human gut microbiota [3,10]. Some of the remaining gaps concerning microbial relationships between methanogens and other human gut microbes and their environment (diet, xenobiotics,...) could be addressed by this model, considering however the absence of host cells–microbiota interactions. This encompasses (but not limited to) energy harvesting through SCFA, detection of species/gene expressions modulated by addition/inhibition of methanogens, which would help to decipher their possible role in human diseases and their potential as novel

probiotics.

## Acknowledgements

This work was supported by PhD grant awarded by the European Union and the Auvergne Council to WT and by the French Ministry of Higher Education and Research to NG. We are grateful to Amandine Maurin and Sylvain Denis for their technical help during the experiments.

## References

- [1] M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende, et al., Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature* 473 (2011) 174–180.
- [2] N. Gaci, G. Borrel, W. Tottey, P.W. O'Toole, J.-F. Brugère, Archaea and the human gut: new beginning of an old story, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 16062.
- [3] J.K. Goodrich, J.L. Waters, A.C. Poole, J.L. Sutter, O. Koren, R. Blekhman, et al., Human genetics shape the gut microbiome, *Cell* 159 (2014) 789–799.
- [4] C. Bang, K. Weidenbach, T. Gutschmann, H. Heine, R.A. Schmitz, The intestinal archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells, *PLoS One* 9 (2014) e99411.
- [5] G. Borrel, N. Parisot, H.M. Harris, E. Peyretailade, N. Gaci, W. Tottey, et al., Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine, *BMC Genomics* 15 (2014) 679.
- [6] J.-F. Brugère, G. Borrel, N. Gaci, W. Tottey, P.W. O'Toole, C. Malpuech-Brugère, Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease, *Gut Microbes* 5 (2014) 5–10.
- [7] D. Kunkel, R.J. Basser, M.D. Makhani, K. Chong, C. Chang, M. Pimentel, Methane on breath testing is associated with constipation: a systematic review and meta-analysis, *Dig. Dis. Sci.* 56 (2011) 1612–1618.
- [8] E.E. Hansen, C.A. Lozupone, F.E. Rey, M. Wu, J.L. Guruge, A. Narra, et al., Pan-genome of the dominant human gut-associated archaeon, *Methanobrevibacter smithii*, studied in twins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 4599–4606.
- [9] B.S. Samuel, E.E. Hansen, J.K. Manchester, P.M. Coutinho, B. Henrissat, R. Fulton, et al., Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 10643–10648.
- [10] B.S. Samuel, J.L. Gordon, A humanized gnotobiotic mouse model of host–archaeal–bacterial mutualism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10011–10016.
- [11] G.R. Gibson, J.H. Cummings, G.T. Macfarlane, Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 2750–2755.
- [12] D. Fera-Gervasio, S. Denis, M. Alric, J.-F. Brugère, *In vitro* maintenance of a human proximal colon microbiota using the continuous fermentation system P-ECSIM, *Appl. Microbiol. Biot.* 91 (2011) 1425–1433.
- [13] A. Mihajlovski, J. Doré, F. Levenez, M. Alric, J.F. Brugère, Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity, *Env. Microbiol. Rep.* 2 (2010) 272–280.
- [14] T.L. Miller, M. Wolin, E.C. de Macario, A. Macario, Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces, *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 227–232.
- [15] W. Tottey, J. Denonfoux, F. Jaziri, N. Parisot, M. Missaoui, D. Hill, et al., The human gut chip “HuGChip”, an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level, *PLoS One* 8 (2013) e62544.
- [16] G. Gibson, J. Cummings, G. Macfarlane, Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine, *J. Appl. Bacteriol.* 65 (1988) 241–247.
- [17] A. Strocchi, J. Furne, C. Ellis, M. Levitt, Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H<sub>2</sub> in the human colon, *Gut* 35 (1994) 1098–1101.
- [18] C. Hoffmann, S. Dollive, S. Grunberg, J. Chen, H. Li, G.D. Wu, J.D. Lewis, F.D. Bushman, Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents, *PLoS One* 8 (2013) e66019.

#### II.1.2.5 Conclusions et perspectives de l'ensemble des études *in vitro*

La culture de méthanogènes dans des microbiotes maintenus en système *in vitro* et la réussite à la fois de leur implantation dans des microbiotes non-méthanogènes et de leur inhibition spécifique ouvrent de nouvelles perspectives. A cela s'ajoute la réussite de la conservation de microbiotes fécaux porteurs de méthanogènes de l'ordre des *Methanobacteriales* et des *Methanomassiliicoccales*. Ainsi, il devient théoriquement possible de tester les différents méthanogènes dans des études similaires à celle décrite précédemment. Il devient également possible d'intervenir sur les sources initiales de substrat. Parmi les autres méthanogènes à tester, ceci concerne en priorité *Ms. stadtmanae* et les diverses *Methanomassiliicoccales*. Un seul essai a été réalisé, non-décrit ici, avec un microbiote non méthanogène et l'addition de la seule *Methanomassiliicoccale* isolée et disponible à ce jour, *Mmc. luminyensis*. Ceci s'est avéré infructueux et le manque de temps ne nous a pas permis de réaliser de nouveau une telle expérience. Les causes de cet échec sont inconnues, et peuvent être techniques. Cependant, il est également possible que l'usage d'autres méthanogènes nécessitent la mise au point d'autres conditions. Le laboratoire dispose des outils *in vitro* pour continuer ce type d'expérimentation, afin de connaître les déterminismes et les conséquences au niveau du microbiote humain de la personne âgée de la présence d'archées méthanogènes. Par d'autres approches, il est également possible de déterminer le rôle, en particulier métabolique, que ces archées peuvent avoir au niveau de tractus gastro-intestinal humain.



## CHAPITRE II.2

### CAPACITÉS MÉTABOLIQUES DES MÉTHANOGENÈS DU TRACTUS DIGESTIF : QUELS SUBSTRATS DE MÉTHANOGENÈSE ?

Les archées méthanogènes ont pour obligation, pour leur survie, de réaliser ce métabolisme particulier qu'est la méthanogenèse décrite en étude bibliographique. Ce métabolisme peut se faire selon différentes modalités, questions que l'on peut adresser grâce à des souches isolées et/ou à partir de données génomiques. Certaines données semblent acquises, telles que l'utilisation de méthanol et d'H<sub>2</sub> par *Ms. stadtmanae*, ou l'utilisation du CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub> ou du formate par *Mb. smithii*. Cependant, ce dernier, hautement prévalent, est-il réellement limité à cette seule capacité ? De plus, l'augmentation de la diversité en méthanogènes de la personne âgée entraîne-t-elle de nouvelles capacités métaboliques résultant de l'utilisation de nouveaux substrats de méthanogenèse ?

#### II.2.1 UTILISATION DU MÉTHANOL PAR *Mb. smithii* ?

##### II.2.1.1 Rappel du contexte et objectif de l'étude

*Mb. smithii* est le méthanogène le plus répandu et abondant de l'intestin humain, pouvant représenter jusqu'à 10 % des microorganismes anaérobies [2, 237]. Il est détecté chez plus de 50 % de la population adulte [228, 17, 301]. Cette prédominance est expliquée (i) par sa capacité à moduler les voies métaboliques d'autres souches fermentaires de l'intestin tel que *Bacteroides thetaiotaomicron* [230] et (ii) par une grande variété de molécules d'adhésion permettant de coloniser l'environnement intestinal [231, 224]. Cette archée est connue pour être hydrogénotrophe, utilisant le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub> lors de la méthanogenèse. Elle peut également utiliser le formate, selon la même voie métabolique [226, 2, 237]. L'analyse des capacités adaptatives de *Mb. smithii* à l'environnement intestinal entreprise par Samuel et Gordon (2007) a signalé la présence de gènes impliqués dans l'utilisation du méthanol et de l'éthanol [231]. En préambule à cette étude, nous avons enquêté sur les différentes souches de *Mb. smithii* identifiées dans le TD humain. La présence de gènes *mtaABC* dédiés à l'utilisation de méthanol lors de la méthanisation est avérée dans le génome de 22 des 23 souches intestinales connues (Tableau 2, Gaci et al., 2014). Seule la souche DSM 2374 fait exception. Cependant, le génome de cette souche, issu du « Human Microbiome Project » est partiellement incomplet et la présence

de ces gènes ne peut être totalement exclue. Dans l'étude qui suit, nous avons vérifié si les gènes *mtaABC* de *Mb. smithii* étaient fonctionnels. La capacité d'utilisation de méthanol par des souches intestinales de *Mb. smithii* pourrait en effet fournir des explications supplémentaires au potentiel adaptatif de cette archée à l'origine de son abondance intestinale. Ainsi, nous avons testé sa capacité à utiliser le méthanol à partir de 3 souches intestinales dont celles où les gènes nécessaires semblent absents (DSM 861, DSM 2375 et DSM 2374). Bien que les preuves génomiques soient absentes, d'autres composés méthylés comme la TMA ou encore des substrats plus complexes tel que la pectine (pourvoyeur intestinal de méthanol, [334]) ont également été testés.

#### II.2.1.2 Matériel et méthodes

##### II.2.1.2.1 Souches et milieu de culture

Trois souches de *Mb. smithii* d'origine fécale humaine ont été obtenues à partir de la collection allemande de micro-organismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) : ces souches sont DSM 2374, DSM 2375 et DSM 861 (ATCC 35061), dont les génomes sont répertoriés respectivement sous les numéros d'accèsion ABYV00000000, ABYW00000000 et CP000678.1. Pour leur croissance, elles ont été maintenues dans les conditions préconisées par DSMZ, sous 80 % H<sub>2</sub> et 20 % CO<sub>2</sub>. Une version modifiée du milieu DSMZ 141 ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) réduit sous N<sub>2</sub> a été utilisée pour la culture. Cette modification correspond en l'ajout d'une solution d'acides gras à chaînes courtes contenant les acides : valérique, iso-valérique, 2-méthylbutyrique et isobutyrique, selon les préconisations du milieu DSMZ 119. Ce milieu final est réparti à raison de 5 mL dans des tubes de Hungate puis autoclavé. Au moment des inoculations, 50 µL de solution de vitamines de Balch [77] sont ajoutés. Les inoculations et les transferts sont effectués de manière aseptique en condition d'anaérobie. Les incubations sont réalisées à 37 °C sous agitation.

##### II.2.1.2.2 Culture de *Mb. smithii* en présence de méthanol

Les premiers tests ont été menés sur la souche de référence *Mb. smithii* DSM 861, afin de tester les concentrations éventuellement optimales d'une utilisation du méthanol : ainsi, des concentrations de 0, 20, 40, 60 et 80 mM de méthanol ont été testées, en culture sous seule présence initiale d'H<sub>2</sub> dans la phase gazeuse. La croissance en présence de 20 % CO<sub>2</sub> et 80 % H<sub>2</sub> a été mise en place en tant que témoin positif. La croissance des méthanogènes a été suivie par l'analyse du méthane produit dans la phase atmosphérique, tous les trois jours pendant 17 jours (microGC-3000 ; Agilent Technologies). A l'issue, les cultures ont été congelées à -80 °C pour des tests moléculaires ultérieurs.

#### II.2.1.2.3 Croissance de *Mb. smithii* avec du méthanol en présence de différents gaz

La croissance en présence de méthanol ainsi que la dépendance à l' $H_2$  a également été analysée avec les trois souches. Environ  $10^6$  unités formant colonies (UFC) / mL des souches DSM 2374, DSM 2375, et DSM 861 ont été cultivées en présence de 40 mM de méthanol avec de l' $H_2$ , en présence de  $H_2$  /  $CO_2$  (80 :20) (contrôle positif) ou sous  $N_2$  ou  $CO_2$ . La croissance de *Mb. smithii* a été vérifiée par la mesure de la production de méthane (microGC-3000 ; Agilent Technologies) ainsi que par le suivi du nombre de copies du gène *mcrA*.

#### II.2.1.2.4 Consommation de méthanol lors de la méthanogenèse

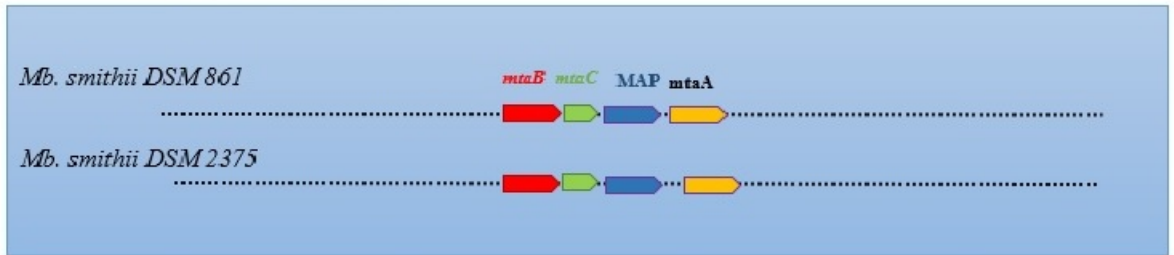
La consommation du méthanol lors de la méthanogenèse a été vérifiée par chromatographie en phase liquide à haute performance (Agilent 1100). 1 ml de la phase liquide de la culture de *Mb. smithii* DSM 861 a été analysé après une semaine d'incubation à 37 °C, en présence de méthanol seul ou avec de l' $H_2$ .

#### II.2.1.3 Résultats

##### II.2.1.3.1 Organisation des gènes de la méthanogenèse méthylo-trophe des *Methanobacteriales* du tractus digestif

*Ms. stadtmanae*, la première méthanogène connue pour sa capacité à utiliser le méthanol détient quatre copies du cluster *mtaABC*. Trois d'entre eux sont successifs et le quatrième est éloigné de 700 Kb. L'enquête menée sur les génomes des souches *Mb. smithii* a révélé que la quasi-totalité était porteuse de gènes de méthytransférases *mtaABC* nécessaires pour la conversion du méthanol en méthane. Seulement une seule copie de *mtaABC* est observée pour chacune d'entre elles. Ces gènes sont notamment observés pour chacune des souches DSM 861 et DSM 2375. Leur organisation est illustrée sur la figure II.2.1 . Le gène MAP codant la protéine Methyltransferase Activation Protein est également associé. Cette protéine, spécifique à un type de méthytransférase donné, permet la réduction du cobalt à l'intérieur du groupement prosthétique corrinnoïde (état Co(I)), dans un processus ATP-dépendant [335]. Ce maintien de l'état réduit (par réactivation) est nécessaire pour assurer la fixation puis le transfert du groupement méthyl (ici du méthanol). Une analyse phylogénétique du produit du gène *mtaB* montre un rapprochement avec celui de l'autre *Methanobacteriale* *Ms. stadtmanae*, mais distant de celui des *Methanosarcinales* [83].

*Methanobrevibacter smithii*



*Methanosphaera stadtmanae* DSM 3091

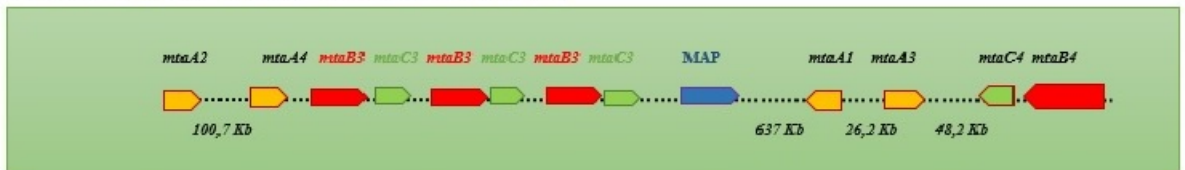


FIGURE II.2.1: Organisation des gènes impliqués dans l'utilisation du méthanol

En orange ceux codant les méthylcobalamine : coenzyme M méthyltransférases (*mtaA*) ; en rouge ceux codant les méthyl-compound :corrinoïde méthyltransferases (*mtaB*) ; en vert ceux codant les composés méthylés :corrinoïde protéines (*mtaC*). La localisation du gène MAP codant une protéine activatrice de méthylatransférase (similaire à celles nécessaires aux méthyltransférases dédiées au méthanol) est également indiqué, en bleu. :



### II.2.1.3.2 Utilisation de méthanol par *Mb. smithii* DSM 861

#### a) Effet dose-dépendant

Afin de déterminer d'une part si le méthanol est un substrat de méthanogenèse pour *Mb. smithii* et d'autre part, la concentration optimale pour son utilisation, la souche *Mb. smithii* DSM 861 a été cultivée en présence d'H<sub>2</sub> et de diverses concentrations de méthanol variant de 0 mM à 80 mM. Le suivi de la production de méthane, montre une croissance dose-dépendante (Figure II.2.2). En effet, tous les tubes montrent une production de CH<sub>4</sub> décelable dès le 3<sup>ème</sup> jour d'incubation, comprise entre 0,5 et 1,4 % de l'atmosphère. Par la suite, une augmentation de la production de méthane est observée dans tous les tubes tout au long de l'expérience. Un maximum est atteint pour les souches cultivées en présence 20 mM de méthanol (7,2 %) au bout de 17 jours. La concentration de 80 mM donne une production similaire à celle obtenue en absence de méthanol, signifiant probablement un effet toxique pour la souche. Une quantité importante et équivalente de méthane a été observée dans les tubes de 10 et 40 mM de méthanol, présentant un maximum de 6,25 % de CH<sub>4</sub>. À 60 mM de méthanol, la production de méthane reste faible, montrant qu'on avoisine déjà l'effet potentiellement toxique observé à 80 mM. Curieusement, une production significative de méthane a été observée dans les tubes dépourvus de méthanol (témoin théoriquement négatif). Ceci semble indiquer que le milieu de culture présente ou génère des substrats de méthanogenèse. Ainsi, pour valider nos résultats, nous avons entrepris deux études complémentaires : d'une part, une ré-édition de l'expérience avec quantification du méthanol, et d'autre part une analyse de la quantité de transcrits du gène *mtaB* (impliqué dans l'utilisation du méthanol) et du gène *mcrA* (impliqué dans la dernière étape de la méthanogenèse) par rt-q-PCR.

#### b) Consommation du méthanol

Pour cette expérience avec la souche DSM 861, une seule concentration de méthanol a été utilisée (40 mM), dans des conditions de culture par ailleurs identiques aux précédentes. Le dosage de méthanol a été effectué en présence ou non d'H<sub>2</sub> et de méthanol à 40 mM (Figure II.2.3). La culture de *Mb. smithii* incubée en présence uniquement de méthanol sans H<sub>2</sub> ne présente ni croissance (augmentation de DO), ni production de CH<sub>4</sub>. Le dosage du méthanol montre une concentration initiale  $51,2 \pm 1,3$  mM au temps initial (J<sub>0</sub>), qui reste inchangée après 7 jours d'incubation ( $50,3 \pm 2,4$  mM). En revanche, les cultures incubées en présence de méthanol et d'H<sub>2</sub> présentent une croissance au 7<sup>ème</sup> jour parallèlement à une diminution de la concentration de méthanol dans le milieu, passant de  $36 \pm 5,8$  mM à  $27,5 \pm 8,5$  mM. L'effet (consommation de méthanol) est net pour deux des trois tubesensemencées.

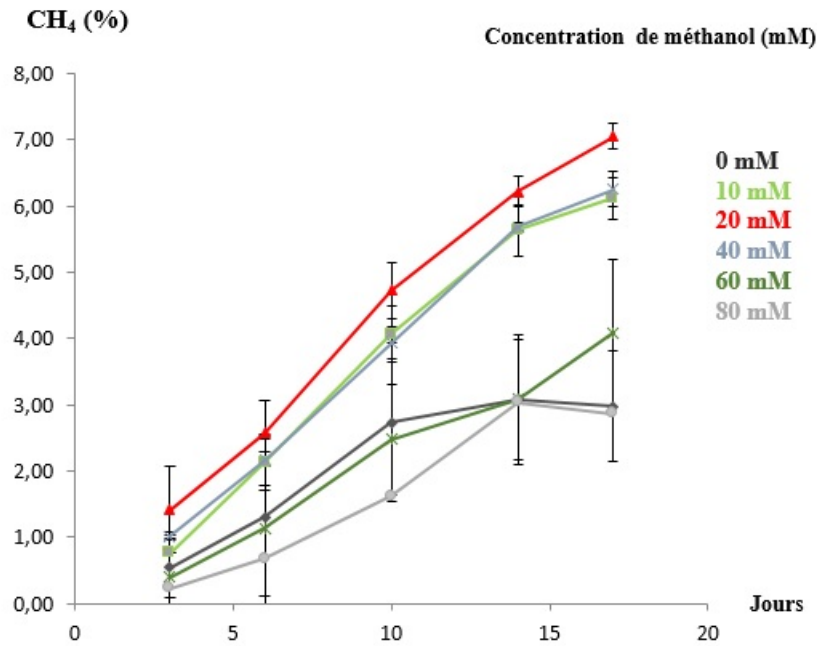


FIGURE II.2.2: Production de méthane par *Mb. smithii* DSM 861 cultivée en présence de concentrations croissantes de méthanol et d'H<sub>2</sub>

La croissance de *M. smithii* DSM 861 a été suivie en présence de concentrations croissantes en méthanol (0 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM et 80 mM) par la production de méthane. Les valeurs, ainsi que les barres d'erreurs représentées, résultent de la moyenne de trois réplicats. NB : Pour plus de clarté, les barres d'erreurs des mesures du point 80 mM n'ont pas été représentées

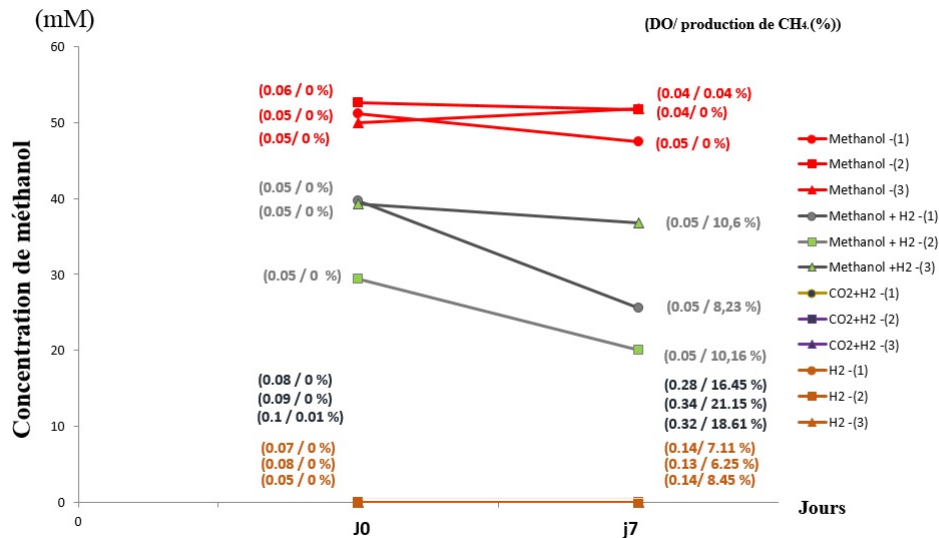


FIGURE II.2.3: Consommation du méthanol par *Mb. smithii* DSM 861

La consommation de méthanol par *Mb. smithii* DSM 861 a été mesurée par HPLC à temps initial et après 7 jours de croissance. Chaque test est représenté par deux points reliés par une barre. Aucune moyenne n'est représentée du fait de la variation de concentration initiale en méthanol. Entre parenthèses sont représentées les valeurs de la densité optique, suivie de celle de la proportion de CH<sub>4</sub>.

Dans l'expérience précédente (a), après 17 jours de culture. Les transcrits du gène *mtaB* (impliqué dans l'utilisation du méthanol) et du gène *mcrA* (impliqué dans la dernière étape de la méthanogenèse) ont ensuite été quantifiés par rt-q-PCR. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à la quantité du transcrit d'ARN 16S puis rapportés à la condition de référence (condition témoin), c'est-à-dire aux transcrits observés en culture en présence de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> (Figure II.2.4). Une surexpression du gène *mtaB* en présence de méthanol est observée par rapport à la croissance en présence du CO<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>. Cette surexpression est également dose dépendante, conformément à ce qui est observé pour la production de méthane. Le taux d'expression atteint une augmentation maximale de 25 fois en présence de 20 mM de méthanol. Le gène est même sous-exprimé à 60 et 80 mM de méthanol. Curieusement, on observe une répression du gène *mcrA* en présence de méthanol par rapport à une croissance en présence de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>. Cette diminution d'expression est limitée à 4 fois à 60 mM de méthanol mais s'avère plus importante aux autres concentrations, y compris en absence de méthanol (sous H<sub>2</sub> seul).

#### II.2.1.3.3 Utilisation de méthanol par diverses souches *Mb. smithii*

Pour tester la constance de l'utilisation de méthanol chez l'espèce *Mb. smithii*, les souches intestinales humaines DSM 861, DSMZ 2375 et 2374 DSMZ ont été testées. Cultivées dans les conditions initiales usuelles de 80 % d'H<sub>2</sub> et 20 % de CO<sub>2</sub>, ces pré-cultures ont été utilisées pour inoculer de nouveaux milieux, dans lesquels le méthanol a été rajouté à une concentration de 40 mM et les cultures effectuées en présence d'H<sub>2</sub>. Pour vérifier le caractère hydrogénotrophe, deux autres tests ont été effectués, en remplaçant l'H<sub>2</sub> par du CO<sub>2</sub> ou du N<sub>2</sub>. Comme observé sur la figure II.2.5, toutes les souches de *Mb. smithii* maintenues sous H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> croissent. Par ailleurs, aucune souche méthanogène n'a été capable de former du méthane à partir de méthanol en présence de N<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub> seul. Les deux souches de *Mb. smithii* DSM 861 et DSMZ 2375 dont les génomes portent les gènes *mtaABC* produisent du méthane à partir de méthanol et de l'H<sub>2</sub>. Cette production est perçue 48 heures après l'incubation. Le taux de méthane produit en présence de méthanol est significativement plus faible comparé au méthane produit en présence de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Le taux de production est, respectivement, de 4 et 8 fois pour les souches DSMZ 2375 et DSM 861. Le rapport de la production de méthane en présence de méthanol est d'environ 3 à 5% de l'atmosphère totale par rapport à la croissance dans les conditions usuelles (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>), qui peut atteindre 23 %. Cependant, aucune différence significative n'a été observée lorsque le méthanol (40 mM) est ajouté à cette condition (méthanol, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>). Cela suggère que la voie méthanogène à base de dioxyde de carbone est la voie habituelle pour la production de méthane par *Mb. smithii*. Les contrôles négatifs (maintenues sous CO<sub>2</sub> ou sous N<sub>2</sub>) ont été incubés pendant 1 semaine supplémentaire et aucune production de méthane n'a été détectée. La souche *Mb. smithii* DSMZ 2374 n'a montré aucune croissance en présence de méthanol en tant que substrat. Cela est compatible avec les données génomiques actuelles, ou le génome, bien qu'incomplet, ne possède aucun gène *mtaABC*. Les mesures de croissance basées sur la quantification du gène *mcrA* ou sur la mesure de CH<sub>4</sub> sont en tous points compatibles (parties droite et gauche de la figure II.2.5).

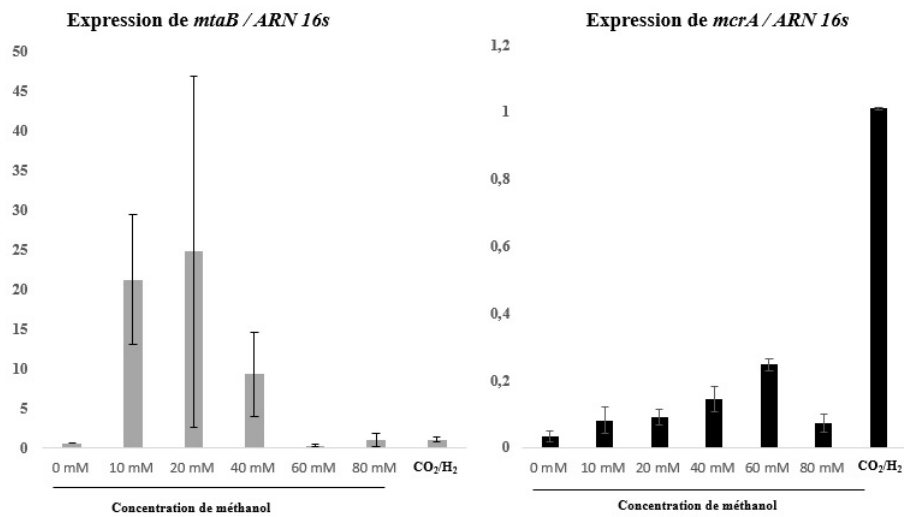


FIGURE II.2.4: Variation de l'expression de gènes de la méthanogenèse de *Mb. Smithii* DSM 861 cultivée en présence d'H<sub>2</sub> et de concentration croissante de méthanol

L'expression du gène *mtaB* spécifique à l'utilisation du méthanol (gris) et du gène *mcrA* nécessaire à toute méthanogenèse (noir) est exprimée de manière relative à la quantité d'ADN codant l'ARN16S après 17 jours de culture en présence de concentrations croissantes de méthanol (0 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM et 80 mM). Les valeurs ainsi que les barres d'erreurs représentées résultent de la moyenne de trois réplicats

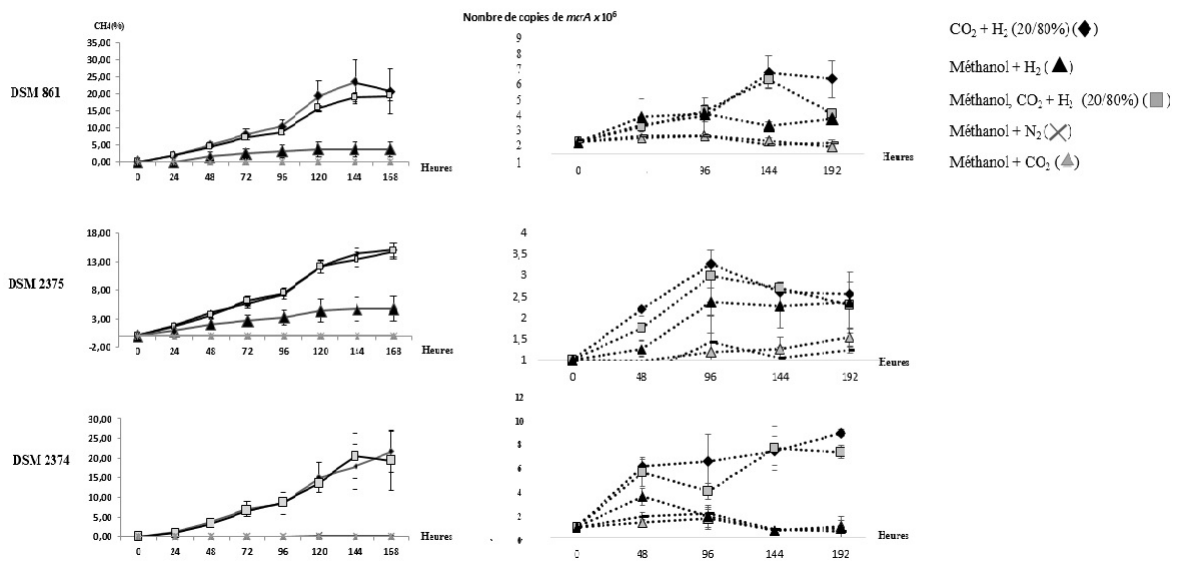


FIGURE II.2.5: Croissance de différentes souches de *Mb. smithii* en présence du méthanol et dépendance en H<sub>2</sub>

La croissance a été suivie par mesure de CH<sub>4</sub> produit (à gauche) et par quantification du gène de méthanogenèse *mcrA* (à droite). Toutes les valeurs ainsi que les barres d'erreurs sont les moyennes de trois réplicats.

#### II.2.1.3.4 D'autres substrats possibles pour *Mb. smithii* ?

Nous avons également exploré d'autres voies méthanogènes méthylotrophes. Pour cela, deux types de substrats méthylés ont été testés, la triméthylamine (TMA), composé tri-méthylé simple, utilisé les *Methanosarcinaceae*, et la pectine, composé polysides dont le métabolisme bactérien intestinal conduit à la formation de méthanol [336]. Les génomes de *Mb. smithii* ne montrent pas de présence de gènes permettant l'utilisation des méthylamines, dans une voie commune à celle du méthanol (voie méthylotrophe). La TMA a été ajoutée à 5 mM (soit 15 mM d'équivalent méthyle) en présence ou non d' $H_2$ . Aucune croissance n'a été notée, conformément à la génétique de ces organismes (résultats non montrés). La pectine a été rajoutée à une concentration de 2 g/L et la croissance testée en présence ou non d' $H_2$ . Du méthane a été détecté en présence de pectine et d' $H_2$ . En effet, à l'exception de la souche DSMZ 2374 où la croissance reste faible, toutes les autres souches de *Mb. smithii* testées ont montré une croissance avec  $H_2$  en milieu supplémenté en pectine (Figure II.2.6). Les premières traces de  $CH_4$  ont été observées 48 heures après l'inoculation. La concentration de méthane atteint 3 % après 11 jours d'incubation. Cette proportion reste 3 à 7 fois inférieure à celle observée en présence de  $CO_2$  et  $H_2$ . De plus, cette croissance s'accompagne d'une surexpression du gène *mtaB* et d'une diminution de l'expression du gène *mcrA* tout comme observé avec le méthanol, en tout cas pour la souche DSM 861, seule testée au niveau de l'expression génique (Figure II.2.7). Ces résultats suggèrent que la pectine peut être utilisée en tant que substrat alternatif pour la méthanogenèse par les souches DSM 2375 et DSM 861, cependant entraînant, tout comme le méthanol, des vitesses de croissance plus lentes.

#### II.2.1.3.5 Discussion : une méthanogenèse méthylotrophe chez *Mb. smithii* ?

Le méthanol est généralement considéré comme un déchet métabolique du corps humain, en raison de sa nature toxique [337, 338]. Il peut être absorbé par l'organisme par inhalation, ingestion ou par diffusion cutanée. Il est mortel à une dose supérieure à 0,3 g / kg [339]. Lorsqu'il est ingéré, il est rapidement acheminé vers les reins et les poumons pour être éliminé en tant que déchet. Au niveau du foie, les enzymes hépatiques comme les alcool- et formaldéhyde-déshydrogénases (ADHs) le métabolisent en formaldéhyde, acide formique et dioxyde de carbone. L'accumulation de l'acide formique crée une acidose métabolique pouvant entraîner une toxicité oculaire [340]. Le méthanol est naturellement présent dans le corps, issu de notre alimentation. Il provient principalement des fruits et légumes riches en pectine, qui une fois atteint le colon, est dégradé par des communautés fibrinolytiques [341, 342], libérant du méthanol. Il est acquis que le méthanol est converti par les organismes méthanogènes intestinaux en  $CH_4$  [343]. Cette voie métabolique est réalisée par *Ms. stadtmanae*, auquel il peut être ajouté *Mmc. luminyensis*, membre de l'ordre *Methanomassiliicoccales*, comme l'ont montré les travaux de Dridi et al. (2012) [90]. Ils contribuent ainsi à la détoxification du milieu intestinal humain.

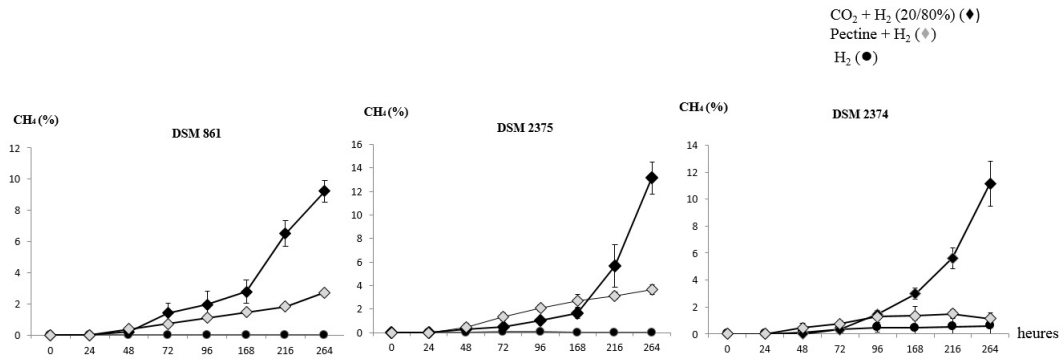


FIGURE II.2.6: Croissance de différentes souches de *Mb. smithii* en présence de pectine et d'H<sub>2</sub>  
La croissance de *Mb. smithii*, visualisée par la production de méthane, est testée en présence de 2 g/L de pectine. Toutes les valeurs et les barres d'erreurs présentées sont le résultat d'une moyenne de trois réplicats

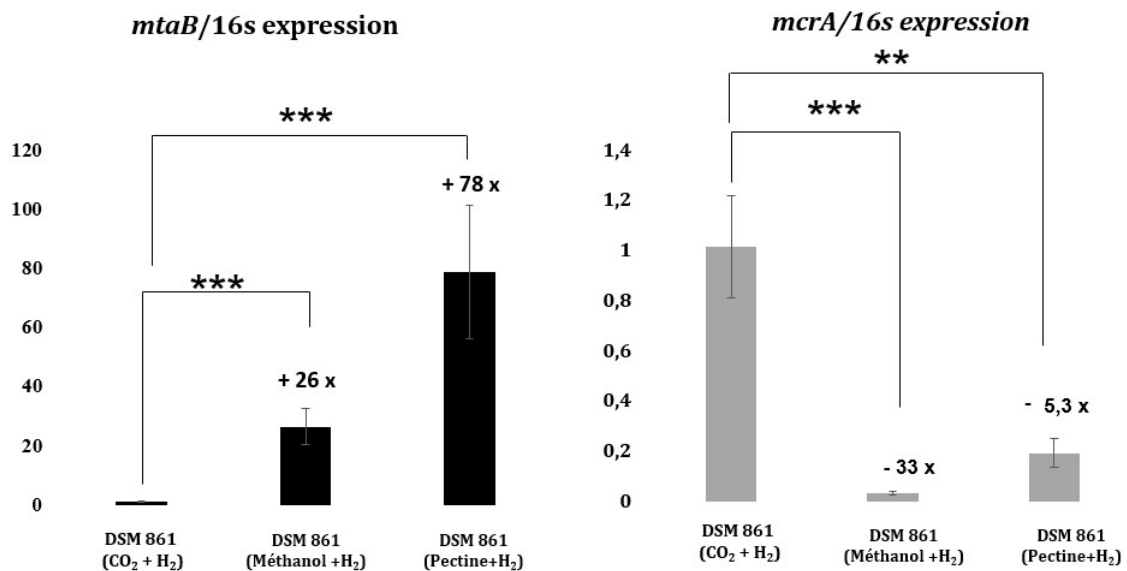


FIGURE II.2.7: Expression des gènes *mtaB* and *mcrA*  
Expression des des gènes *mtaB* and *mcrA* de la souche *M. smithii* DSM 861 présence de différents substrats de méthanogénèse. l'expression des gènes *mtaB* (en noir) et *mcrA*(en gris) de la souche DSM 861 a été estimée dans trois conditions i) en présence méthanol et d'H<sub>2</sub>, ii), de pectine et d'H<sub>2</sub> et iii)du CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>. Les valeurs ainsi que les bars erreurs présentées ici sont le résultat de la moyenne de quatre réplicats. Une ANOVA à un facteur et une analyse par le test de Tukey post-hoc a été utilisée pour vérifier la significativité des résultats. Les astérisques montrent une différence significative comparée au groupe de contrôle (CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>) (\*\*, P < 0.05 , \*\*\*, P < 0.005)

Cette hypothèse est également soutenue par la plus grande prévalence de *Methanosphaera spp.* chez les animaux frugivores. Néanmoins, la prévalence de ces méthanogènes reste faible dans la population humaine et peut au mieux être estimée à environ une personne sur deux [17, 234, 314]. Notons toutefois que d'autres bactéries commensales intestinales sont capables d'utiliser le méthanol, en particulier la bactérie acétogène réductrice *Eubacterium limosum* [344]. Lors de l'isolement de *Mb. smithii* [226], les caractérisations phénotypiques, biochimiques et immunologiques ont été menées, tandis qu'une croissance positive a été observée en présence de H<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>, une faible croissance a été observée en présence de formate et aucune n'a été enregistrée en présence de méthanol, d'acétate ou de TMA en tant que substrat. Toutefois, les expériences ont été réalisées sous 1 atm de CO<sub>2</sub> [226] sans ajout d'H<sub>2</sub> omettant la possibilité que l'espèce soit une méthanogène hydrogénotrophe obligatoire. Dans cette étude, nous avons repris une partie des expériences de Miller et coll. avec d'autres souches, en ajoutant de l'H<sub>2</sub>. Cet ajout a permis de voir une croissance chez les souches *Mb. smithii* DSM 861 et DSM 2375 en présence de méthanol comme substrat unique mais pas dans les cultures dépourvues de H<sub>2</sub>. Ces souches sont donc bien des hydrogénotrophes obligatoires. Cependant, la croissance reste lente et plus faible comparée à celle obtenue en présence de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. Cette faible croissance pourrait être due à i) un reste de CO<sub>2</sub> non détectable par le microGC 3000, ii) l'utilisation d'un autre composé présent et ou généré dans le milieu, ou iii), à une faible expression des gènes *mtaABC*. La première hypothèse est peu probable, car des taux de CO<sub>2</sub> non détectables n'auraient vraisemblablement pas permis une croissance aussi élevée que celle détectée. La deuxième ne peut pas être exclue définitivement à ce stade de nos connaissances, et on peut envisager que du formate ou du CO<sub>2</sub> soit généré, à faibles doses, au cours de l'expérience. L'utilisation du méthanol est avérée par les expériences de suivi de sa concentration. Cependant, celle-ci est-elle bien à des fins de méthanogenèse? Seules d'autres expériences complémentaires permettraient de répondre définitivement à cette question, en particulier l'utilisation de méthanol marqué (par exemple avec l'isotope stable (<sup>13</sup>C)). Différents arguments concourent pourtant à supposer le méthanol comme substrat de méthanogenèse, et en particulier la surexpression importante du gène *mtaB* en présence de méthanol. Celle-ci reste toutefois insuffisante pour maintenir une croissance telle que celle observée en conditions de culture hydrogénotrophe. La présence d'un seul opéron de *mtaABC* contre trois chez *Ms. stadtmanae* ou quatre chez *Mmc. luminyensis* [89, 83] pourrait constituer une limite ne permettant pas une utilisation optimale de ce substrat. En effet, des duplications des gènes chez des souches exclusivement méthylotrophes semblent nécessaires. Dans ce cas, quel est l'avantage sélectif pour *Mb. smithii*, dont même certaines souches pourtant d'origine humaine ne présentent pas la capacité d'utiliser le méthanol? De plus, une diminution de l'expression du gène *mcrA* en présence de méthanol et d'H<sub>2</sub> par rapport aux conditions de CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub> interroge, tout comme l'énergétique de ces métabolismes : en effet, la voie hydrogénotrophe peut être considérée comme la voie usuelle pour *Mb. smithii*, même si ce n'est pas énergétiquement la plus rentable (Tableau I.1.2, Chapitre 2). La prise en compte de ces différents éléments amènent à formuler l'hypothèse que *Mb. smithii* est principalement un méthanogène réalisant une méthanogenèse hydrogénotrophe. Dans l'environnement intestinal auquel il s'est particulièrement bien adapté, il trouve en effet CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> en quantité pour croître. Vis

à vis d'autres méthanogènes méthylotrophes ne reposant que sur le méthanol (en particulier *Mb. stadtmanae*), il s'avère peu compétitif, permettant une niche écologique pour ces autres méthanogènes, lui permettant par contre de survivre en cas de diminution du CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub> ou d'un usage temporaire de ces éléments par d'autres espèces mieux adaptées. *Mb. smithii* répond alors à cette perturbation en ralentissant fortement sa croissance (expression diminuée de *mcrA*). Par ailleurs, le méthanol semblant toxique pour *Mb. smithii* à des doses peu différentes, cette méthanogenèse ralentie pourrait lui permettre de diminuer la concentration de méthanol dans son environnement immédiat. Nos expériences montrent que la pectine peut être utilisée par *Mb. smithii* seul en culture. La pectine est un polysaccharide de poids moléculaire élevé, composé d'acides galacturoniques liés par des liaisons alpha (1-4). Des molécules de rhamnopyranoses sont reliées par des liaisons alpha (1-2) à des chaînes de sucres simples (galactose, mannose, glucose et xylose). Elle est principalement retrouvée dans la peau des fruits et légumes, notamment les agrumes (contenant 0,5% à 3,5% de pectine). La pectine exerce des effets bénéfiques multiples sur la santé : elle prévient la vidange gastrique plus communément appelée le syndrome de dumping [345], contribue à améliorer le métabolisme des lipides et le taux de cholestérol sérique présent dans le sang [346], a un rôle dans la prévention des infections intestinales, l'athérosclérose, le cancer, l'obésité [347] ainsi que le diabète en réduisant la concentration plasmatique de l'insuline et du glucose [348]. C'est une fibre soluble qui résiste à la digestion enzymatique chez les humains. Sa dégradation nécessite le microbiote colique qui conduit à la formation de formate, d'acétate, d'acétone et de méthanol. Les micro-organismes pectinolytiques initialement connus sont des espèces des genres *Aerobacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* et *Enterococcus* [349]. Il a été montré qu'*Erwinia carotovora* avait la capacité à produire du méthanol à partir de pectine au niveau de lumière intestinale [350]. Cette dégradation nécessite des méthylestérases de pectine. Jusqu'à présent, aucune archée n'est connue pour ses propriétés pectinolytiques. Pourtant, la production de méthane est ici observée dans nos expériences en présence de pectine et d'H<sub>2</sub> et le gène *mtaB* est alors surexprimé (Figure II.2.6 ). Dans notre étude génomique, aucun gène ne correspondant à une enzyme pectinolytique n'a cependant été détecté.

#### II.2.1.3.6 Conclusion et perspectives

Le port des gènes de méthanogenèse de type méthylotrophe chez les quelques *Methanobacteriales* reste une énigme [89, 83], mais cautionne une origine très ancienne de la méthanogenèse, probablement initialement d'origine méthylotrophe. Ces gènes procurent vraisemblablement un avantage à *Mb. smithii* en lui permettant une adaptation à un environnement extrêmement concurrentiel comme la lumière intestinale. Ces derniers résultats constituent des indices supplémentaires permettant d'expliquer l'abondance relative de *Mb. smithii* et complètent les études basées sur l'étude des génomes de *Mb. smithii* [231, 15]. La possibilité d'utiliser le méthanol et la pectine pourrait l'aider à nouer des liens syntrophiques avec d'autres membres de l'intestin, et lui permet un éventail métabolique plus large.



## II.2.2 *Methanomassiliicoccales* INTESTINALES

La mise en place de nouvelles approches moléculaires pour l'étude de la diversité des archées méthanogènes du tube digestif a permis de montrer une diversité bien supérieure à celle révélée par les études culturelles. Les études de microbiologie classique n'avaient jusqu'alors permis de mettre en évidence que les deux *Methanobacteriales* *Mb. smithii* et *M. stadtmanae* parmi le millier d'espèces bactériennes peuplant le tractus digestif. Cependant, même avec des techniques moléculaires récentes, le choix des marqueurs moléculaires et des amorces utilisées reste déterminant. Ainsi, un nouveau design d'amorces pour le gène *mcrA* spécifique des méthanogènes révélait la présence d'un 7<sup>e</sup> ordre méthanogène [13], appelé dorénavant ordre des *Methanomassiliicoccales* [16]. Des séquences affiliées à cette lignée de méthanogènes ont été précédemment retrouvées dans de nombreux environnements anaérobies, sur la base de la séquence de l'ARN 16S, sans qu'elles puissent pour autant être affiliées à des méthanogènes. En effet, ce 7<sup>e</sup> ordre se caractérise par sa présence sur un lignage archéen (*Thermoplasmata*) dont jusqu'alors les membres retrouvés étaient thermo-acidophiles et aérobies, ne laissant pas présager la présence de microorganismes anaérobies et méthanogènes. La complexité en méthanogènes de certains environnements ne permettait pas de relier les archées identifiées par leur séquence 16S aux méthanogènes identifiées par leurs séquences *mcrA*. C'est le cas notamment de digesteurs anaérobies ou du rumen [351, 352, 132]. Dans ce dernier environnement était ainsi décrit un lignage, le groupe Rumen Cluster-C (RCC) [353, 92] que l'on sait maintenant appartenir aux *Methanomassiliicoccales*. Il en est de même chez l'Homme, où l'étude de Scanlan et al. (2008) sur la diversité en méthanogènes humains révélait des méthanogènes proches des *Methanosarcinales* [233], en définitif membres du 7<sup>e</sup> ordre [13]. Cependant, c'est l'isolement de *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 à partir d'excréments humains [90] qui a définitivement clos le débat en prouvant une méthanogenèse méthylotrophe à partir de méthanol, mais H<sub>2</sub> dépendante, chez un organisme appartenant au lignage *Thermoplasmata*.

### II.2.2.1 Caractérisation du 7<sup>e</sup> ordre basée sur des données génomiques de différents membres intestinaux des *Methanomassiliicoccales*

A mon arrivée au laboratoire, les données génomiques d'une autre *Methanomassiliicoccales* étaient disponibles, obtenues à partir d'une approche métagénomique sur un enrichissement de culture de selles humaines sous méthanol et H<sub>2</sub>. Ce génome correspondant à l'espèce candidate *Ca. Methanomethylophilus alvus* (*Mmp. alvus*) [91] était annoncé le mois suivant celui de *Mmc. luminyensis* B10 [311]. Le génome de ce dernier était et reste incomplet, formé de 27 contigs. Le génome de *Ca. Methanomethylophilus alvus*, donné sous forme d'un chromosome circulaire unique apportait de nouveaux éléments quant à la biologie des *Methanomassiliicoccales* : présence des gènes pour une méthylotrophie à partir de méthylamines, possibilité d'encodage de la pyrrolysine [91], mais aussi à attribuer un rôle présumé de ces archées dans leur environnement, indiquant leurs propriétés métaboliques avant preuves expérimentales.

### II.2.2.2 *Methanomassiliicoccales, un ordre présentant des lignages environnementaux différents*

Comme le montre la figure II.2.8, réalisée à partir de séquences *mcrA* et 16S provenant du laboratoire et de bases de données publiques [83], l'ordre des *Methanomassiliicoccales* présente des clusters : un premier comprenant *Mmc. luminyensis*, plusieurs membres retrouvés dans différents environnements, dont le TGI humain : ce cluster dénommé *Mmc. luminyensis-like* ou cluster mixte regroupe à la fois des séquences issues de sols, de stations d'épuration et des séquences retrouvées dans l'environnement digestif. Comparativement, l'espèce *Ca. Methanomethylophilus alvus* appartient à un cluster différent, où les séquences proviennent quasi exclusivement d'environnements digestifs. Ce cluster est ainsi baptisé *alvus-like cluster* ou cluster digestif, où est retrouvé le roupe RCC du rumen. Enfin, un troisième cluster peut être identifié, dans lequel aucun membre digestif n'est identifié. Ce dernier forme le cluster Pavin, du nom d'un lac auvergnat au fond duquel (-80 m) des séquences *mcrA*, 16S, et du gène de méthylotrophie à partir de méthanol *mtaB*, toutes associées aux *Methanomassiliicoccales*, ont été retrouvées [83]. Il comprend des environnements lacustres profonds, des sédiments marins, et d'autres environnements extrêmes. Cette analyse montre aussi des lignées de *Thermoplasmata*, certaines méconnues, le plus souvent aérobies, parfois acidophiles ou thermo-acidophiles.

#### II.2.2.2.1 *Génomique comparative de différents membres des Methanomassiliicoccales*

Dans ce contexte de disponibilité initiale de 2 génomes, il m'a été confié la tâche de la recherche des gènes impliqués dans la méthanogenèse méthylotrophe chez les *Methanomassiliicoccales* ainsi que ceux permettant la synthèse de la pyrrolysine. En effet, comme décrit dans l'étude bibliographique, ces deux éléments sont liés quant à la méthanogenèse à partir de composés méthylés de type méthylamines. En parallèle, un enrichissement d'une troisième *Methanomassiliicoccales* du tractus gastro-intestinal, différente, était réalisé par l'emploi de méthanol et H<sub>2</sub>, suivi de comparaison de croissances par qPCR. Cette souche, devenue par la suite *Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*, provient de fèces d'une personne âgée de 93 ans de sexe féminin. Elle complète notre vision des *Methanomassiliicoccales* associées à l'Homme, et appartient au cluster mixte.

##### *a) Nouveau génome affilié aux membres du cluster mixte*

A partir des enrichissements de *Ca. Mmc intestinalis*, un nouveau génome a pu être obtenu. Ceci a pu être possible à partir d'un enrichissement de l'ordre de 30%, basé sur la proportion d'ADN codant l'ARN16S de cette *Methanomassiliicoccale* et des bactéries. Ce génome complet, circulaire, présente une taille intermédiaire avec les deux précédents, d'environ 1,9 Mpb. un G+C % de 41,3, atypique par rapport aux 2 précédents connus, et partage 98 % d'homologie

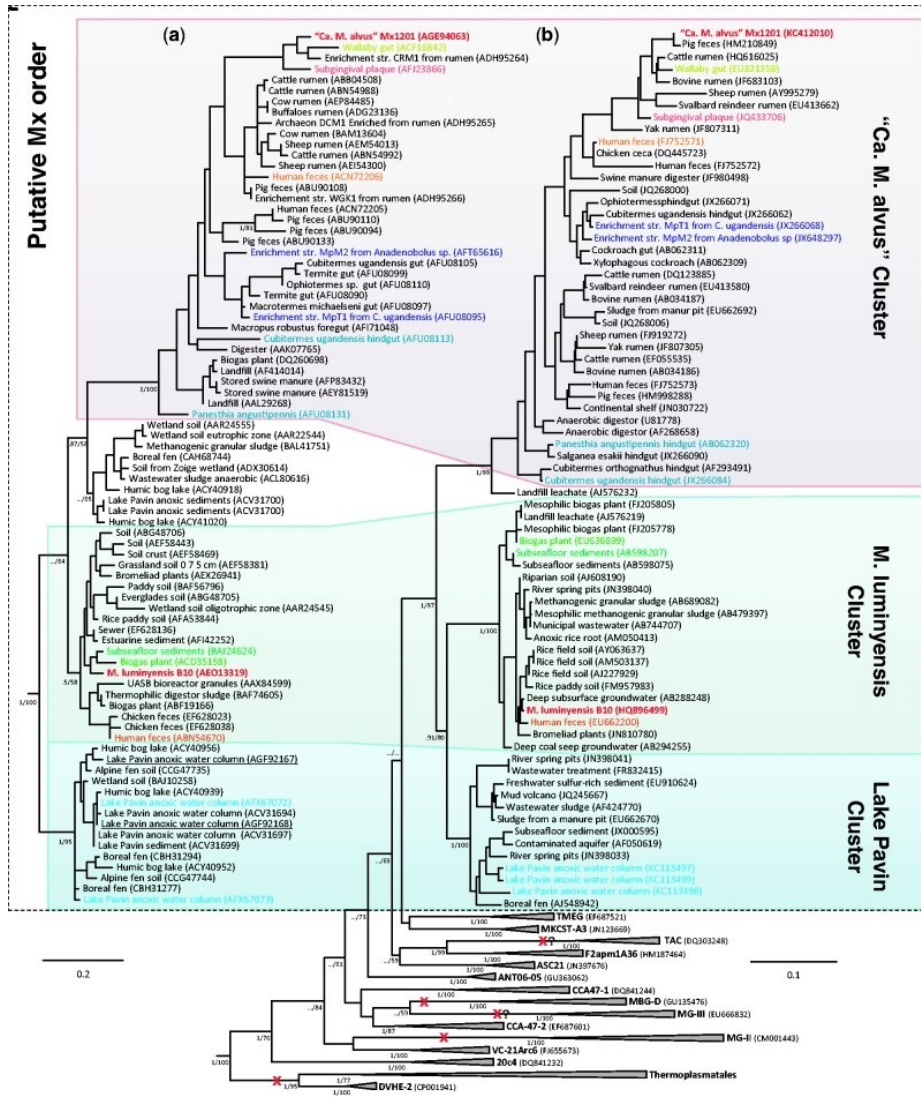


FIGURE II.2.8: Diversité des *Methanomassiliococcales* et leurs relations évolutives au sein du lignage *Thermoplasmata*.

Phylogénie des *Methanomassiliococcales* réalisée par la méthode du maximum de vraisemblance de la protéine *McrA* (a) et de l'ARNr 16S (b) mettant en évidence l'organisation de l'ordre en 3 clusters potentiels, correspondant à des origines environnementales différentes. La proximité des *Methanomassiliococcales* et d'autres lignées *Thermoplasmata* est indiquée, entre autre avec les *Thermoplasmatales* et les groupes DVHE2, MG-II et MBG-D [83].

avec l'ARNr 16S *M. luminyensis*. La recherche des gènes de méthanogenèse que j'ai entreprise a révélé la présence des gènes nécessaires à une méthanogenèse méthylotrophe, à partir de méthanol et de méthylamines, ainsi que la présence des gènes nécessaires à l'encodage de la pyrrolysine. Ces résultats génomiques ont été annoncés dans l'article, "Genome Sequence of "Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis" Isoire-Mx1, a Third *Thermoplasmatales*-Related Methanogenic Archaeon from Human Feces", présenté en annexe 3 et dont je suis co-auteur.

b) Données concernant la méthanogenèse, issues de la comparaison de génomes

Grâce à ce 3<sup>ème</sup> génome, nous disposons de données génomiques de 3 membres intestinaux humains provenant de 2 des 3 lignages décrits pour cet ordre. Il a donc été entrepris des analyses génomiques comparatives afin d'en tirer des informations générales quant à cet ordre, tant au niveau génomique, génétique, physiologique et environnemental. Étonnamment, les gènes nécessaires à une méthanogenèse hydrogénotrophes sont tous absents (résultats de G. Borrel), ce qui rend cet ordre unique au sein des méthanogènes (Figure II.2.9) [83].

Mon travail de génomique comparative a concerné plus particulièrement les gènes impliqués dans la méthanogenèse méthylotrophe. A partir des données annotées et corrigées manuellement (prédiction des cadres de lectures par Glimmer3 [354], annotation notamment par RAST [355] et l'utilisation de BLAST associée à des bases de données genbank, EMBL et SWISS-Prot), les gènes correspondant à l'utilisation de composés méthylés ont pu être déterminés : un tableau récapitulatif donne leur numéro d'accèsion et leur nombre de copies (Tableau II.2.1). Si la majorité des gènes nécessaires sont présents, à l'exception de ceux nécessaires à l'utilisation du diméthylsulfide chez *Ca. Mmc. intestinalis*, des variations de nombre sont cependant visibles au niveau des méthyltransferases spécifiques à chaque substrat. La souche *M. luminyensis B10* supplante les autres souches en termes de nombre de gènes. Les gènes impliqués dans l'utilisation du méthanol, que ce soit des gènes codant pour Methyl-compound corrinoid proteins ou les méthyltransferases correspondantes sont au nombre de 3 dans le genre *Methanomassiliicoccus* contre 1 chez *Ca. Mmp. alvus*. On compte 4 duplications de méthyltransferases spécifiques au monométhylamine (*mtmB*), et 4 Methyl-compound corrinoid proteins (*mtmC*) chez *Mmc. luminyensis* alors qu'on observe que 2 gènes de chaque chez les deux autres souches. Cette tendance est observée sur la quasi-totalité des gènes de la méthanogenèse. La carte physique illustrant l'organisation des gènes de la méthanogenèse méthylotrophe chez les différentes souches intestinales des *Methanomassiliicoccales* au sein des génomes (Figure II.2.10) montre que les gènes communs de la méthanogenèse de type *mcr* sont regroupés et se suivent sans interruption, sauf pour un gène *mcrC* de *Ca. Mmc. intestinalis* éloigné des autres gènes. Les gènes *mtaB* et *mtaC* sont étroitement associés dans ces génomes, cela suggère qu'ils forment une unité de transcription comme chez d'autres méthanogènes [356, 89]. De manière similaire à *mtaB* et *mtaC*, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans l'utilisation de méthylamines (*mtmBC*, *mtbBC* et *mttBC*) sont en étroite association, il s'agirait également d'unités de transcription. *Ca. Mmp. alvus* possède trois homologues de

*mtaA/mtbA* formant d'apparentes unités de transcription isolées. Les gènes dupliqués ne se suivent pas forcément et sont disséminés un peu partout dans le génome.

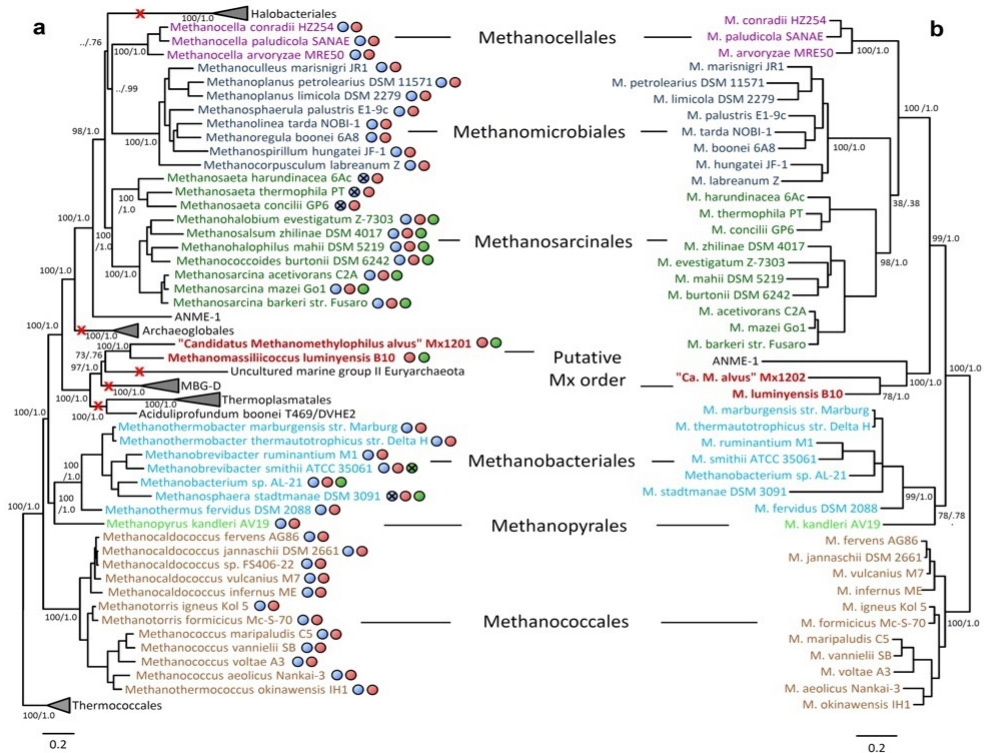


FIGURE II.2.9: Relations phylogénétiques des archées méthanogènes et caractéristiques des *Methanomassiliicoccales*.

La phylogénie des 7 ordres méthanogènes est représentée à partir de données issues de 57 protéines ribosomales à droite et de McrA-B-C-D-G à gauche (maximum de vraisemblance). À droite, les croix rouges indiquent la perte complète de la faculté de méthanogénèse. Les points rouges indiquent la présence du gène *mcrA*. Les groupes capables de méthanogénèse hydrogénéotrophe sont indiqués par un point bleu, une méthanogénèse méthylotrophe est indiquée en vert. Lorsque les cercles sont barrés, les gènes nécessaires sont en partie présents, mais la méthanogénèse n'est pas fonctionnelle pour cette voie. Seule les *Methanomassiliicoccales* présentent l'absence totale de la voie hydrogénéotrophe [83].



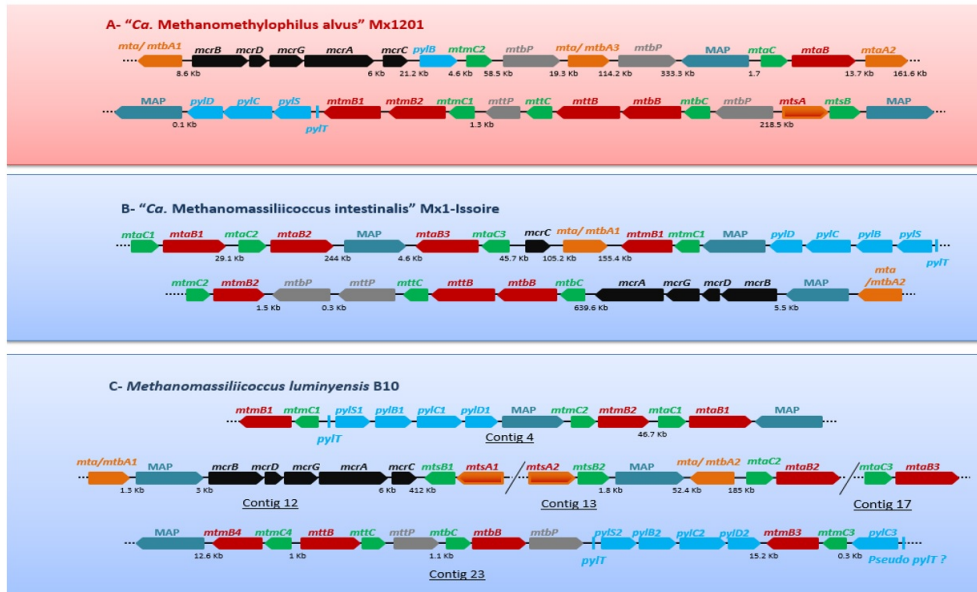


FIGURE II.2.10: Organisation des gènes impliqués dans l'utilisation des substrats méthylés (méthanol ; MMA ; DMA ; TMA et DMS)

En noir sont représentés les gènes de l'opéron *mcrBDCGA* impliqués dans la dernière étape de la méthanogénèse (commune à tous les types de méthanogénèse) ; en orange ceux codant les méthylcobalamine : coenzyme M méthyltransférases ; en rouge ceux codant les méthyl-compound :corrinoïde méthyltransferases ; en vert ceux codant les méthyl-compound :corrinoïde protéines ; en gris, ceux dont le rôle est encore incertain En bleu clair sont représentés les gènes codants les composants nécessaires à la synthèse et à l'insertion traductionnelle du 22<sup>ème</sup> acide aminé, la pyrrolysine, impliquée dans l'activité catalytique des méthyltransferases responsables de la méthanogénèse à partir de méthylamines.

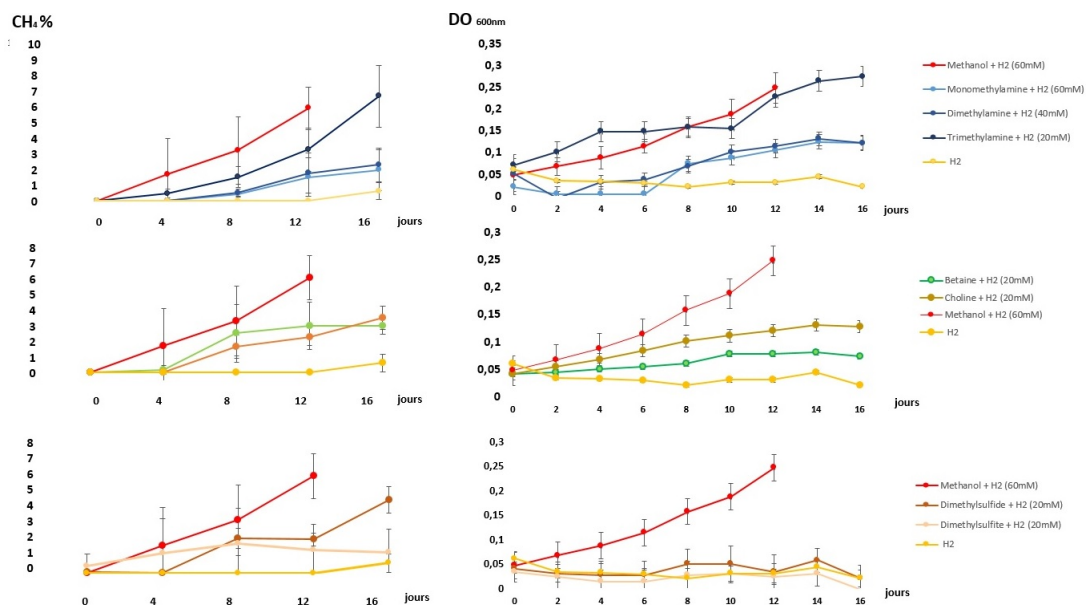


FIGURE II.2.11: Croissance de *Mmc. luminyensis* en présence de substrats méthylés (méthanol, MMA, DMA, TMA, choline, bétaine, DMS, DMT)

La croissance de *Mmc. luminyensis* en présence de différents substrats méthylés (signalées avec différentes couleurs) a été suivie par mesure de CH<sub>4</sub> produit (figures à gauche) et de densité optique (figures sur la droite). Pour plus de clarté, seules les cultures en présence d'H<sub>2</sub> ont été rapportées. Les valeurs ainsi que les barres erreurs présentées ici sont le résultat de la moyenne de trois réplicats.

On constate ainsi qu'une méthanogenèse pourrait être possible à partir de méthanol (avérée par la souche isolée et par les enrichissements culturels), de méthylamines (aussi bien les mono-, di- et tri-méthylamines) et potentiellement de diméthylsulfide, à l'exception de *Ca. Mmc. intestinalis*. Notons également que les analyses traductionnelles virtuelles des gènes de méthyltransférases MT impliquées pour les méthylamines (*mtmB*, *mtbB* et *mttB*) sont toutes interrompues par un signal stop codé par le codon ambre UAG. Ceci est équivalent aux méthyltransférases de ces composés chez les *Methanosarcinaceae* [105].

### c) Système Pyl des *Methanomassiliicoccales*

Au-delà du nombre de copies, l'organisation génomique des gènes impliqués dans la méthanogenèse méthylo-trophe varie également avec une étroite association avec les gènes impliqués dans la synthèse et l'utilisation traductionnelle de la pyrrolysine que j'ai également recherchés (Figure II.2.10). Cette pyrrolysine est un composant essentiel du site catalytique des méthyltransférases impliquées dans la méthanogenèse méthylo-trophe à partir de MMA, DMA et TMA. Des différences significatives existent pour ces derniers. Ainsi, le gène *pylB* nécessaire à la synthèse de Pyl à partir de deux lysines (cf. étude bibliographique) est détaché des autres gènes nécessaires chez *Ca. Mmp. alvus*, en sens transcriptionnel inversé. De plus, le gène *pylS* codant la Pyl-ARNt synthétase est incomplet par rapport à celui retrouvé chez les *Methanosarcinaceae* et ressemble davantage au gène *pylSc* retrouvé chez les bactéries. En effet, chez ces rares dernières codant Pyl, la Pyl-ARNt synthétase est codée en deux gènes, *pylSn* et *pylSc* codant respectivement les parties équivalentes à la partie Nter et Cter de la Pyl-ARNt synthétase des *Methanosarcinaceae*. Ces résultats sont décrits plus en détail dans l'article « Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7th order of methanogens : implications for the evolution of a genetic code expansion cassette » dont je suis co-auteur est présenté en annexe 4.

Outre ces résultats, il présente des études phylogénétiques sur les différentes protéines de ce système, des données quant à la forme et structure de l'ARNt-Pyl. Surtout, il redonne sous forme d'hypothèse, une vision cohérente de l'origine et de la distribution de cette capacité génétique originale dans le vivant, intimement liée à la méthanogenèse des composés méthylés de type méthylamines.

Une comparaison génomique générale a été réalisée avec les représentants des *Methanomassiliicoccales* cultivées à partir du tractus gastro-intestinal. Mon travail a consisté, comme mentionné ci-dessus, en l'analyse des gènes impliqués dans la méthanogenèse méthylo-trophe et dans l'encodage de la pyrrolysine. Cependant, de nombreuses autres données en résultent : Ainsi, ces 3 génomes ne montrent que 658 séquences codantes partagées (Figure 3, article présenté en annexe 5). Ce core génome présente environ 18 à 30 % de séquences d'origine bactériennes et seulement 0.3% de séquence eucaryotiques. L'une des premières caractéristiques mise en évidence est la dispersion des gènes de l'ARN ribosomal dans le génome (Figure 1, article présenté en annexe 5). Étonnamment, ces souches ne présentent pas d'histones eucaryotiques, habituellement présentes chez les *Euryarchaeota*. Il a également été noté que toutes



TABLE II.2.1: Gènes impliqués ou suspectés être impliqués dans la méthanogenèse méthylootrophe : partie 1

		<i>Methanomassiliicoccales</i>	
Espèce	<i>M. luminyensis</i> B10	<i>Ca. M. instinalis</i>	<i>Ca. M. alvus</i>
Taille du génome (Mb)	2.62	1.93	1.67
GC%	60.5%	41.3%	55.6%
<b>Gènes communs de la méthanogenèse</b>			
<i>mcrA</i>	WP_019176774.1	AGN26871.1	AGI85144.1
<i>mcrB</i>	WP_019176771.1	AGN26874.1	AGI85141.1
<i>mcrC</i>	WP_019176783.1	AGN26006.1	AGI85151.1
<i>mcrD</i>	WP_019176772.1	AGN26873.1	AGI85142.1
<i>mcrG</i>	WP_019176773.1	AGN26872.1	AGI85143.1
<b>Gènes communs à l'utilisation des composés méthylés (méthanol, mono-diméthyl-triméthylamine)</b>			
<b>Methylcobalamine :: coenzyme M methyltransferases</b>			
<i>mta/mtbA1</i>	WP_019176765.1	AGN26883.1	AGI85133.1
<i>mta/mtbA2</i>	WP_019177502.1	AGN26087.1	AGI85698.1
<i>mta/mtbA3</i>			AGI85263.1
<b>Gènes dédiés à l'utilisation du méthanol</b>			
<b>Methyl-compound : corrinoïd methyltransferases</b>			
<i>mtaB1</i>	WP_019176360.1	AGN25681.1	AGI85683.1
<i>mtaB2</i>	WP_019177726.1	AGN25711.1	
<i>mtaB3</i>	WP_019178088.1	AGN25966.1	

TABLE II.2: Gènes impliqués ou suspectés être impliqués dans la méthanogenèse méthylootrophe : partie 2

<b>Gènes dédiés à l'utilisation du méthanol</b>			
<b>Methyl-compound : corrinoid methyltransferases</b>			
<i>mtaB1</i>	WP_019176360.1	AGN25681.1	AGI85683.1
<i>mtaB2</i>	WP_019177726.1	AGN25711.1	
<i>mtaB3</i>	WP_019178088.1	AGN25966.1	
<b>Methyl-compound corrinoid proteins</b>			
<i>mtaC1</i>	WP_019176359.1	AGN25680.1	AGI85682.1
<i>mtaC2</i>	WP_019177725.1	AGN25710.1	
<i>mtaC3</i>	WP_019178087.1	AGN25967.1	
<b>Gènes dédiés à l'utilisation de la Methylamine</b>			
<b>Methyl-compound : corrinoid methyltransferases</b>			
<i>mtmB1</i>	WP_019176305.1		
	WP_019176306.1	AGY50174.1	AGI85862.1
<i>mtmB2</i>	WP_019176314.1		
	WP_019176315.1	AGY50175.1	AGI85863.1
<i>mtmB3</i>	WP_019178553.1		
	WP_019178554.1		
<i>mtmB4</i>	WP_019178516.1		
	WP_019178517.1		
<b>Methyl-compound corrinoid proteins</b>			
<i>mtmC1</i>	WP_019176307.1		
<i>mtmC2</i>	WP_019176313.1	AGN26247.1	AGI85864.1
<i>mtmC3</i>	WP_019178555.1		
<i>mtmC4</i>	WP_019178518.1	AGN26253.1	AGI85178.1

TABLE II.2.3: Gènes impliqués ou suspectés être impliqués dans la méthanogénèse méthylotrophe : partie 3

		<i>Methanomassiliicoccales</i>	
<b>Gènes dédiés à l'utilisation de la diméthylamine</b>			
<b>MC : corrinoïd méthyltransferases</b>	<b>mtbB</b>	WP_019178526.1	AGN26261.1
		WP_019178527.1	
<b>MC : corrinoïd proteins</b>	<b>mtbC</b>	WP_019178525.1	AGN26262.1
<b>Gènes dédiés à l'utilisation de la triméthylamine</b>			
<b>MC : corrinoïd méthyltransferases</b>	<b>mttB</b>	WP_019178519.1	AGN26259.1
		WP_019178520.1	AGN26258.1
<b>MC corrinoïd proteins</b>	<b>mttC</b>	WP_019178521.1	AGN26257.1
<b>Gènes dédiés à l'utilisation du diméthylsulfide</b>			
<b>Methylcobalamin : : coenzyme M méthyltransferases</b>			
	<b>mtsA1</b>	WP_019177199.1	AGI86076.1
	<b>mtsA2</b>	WP_019177441.1	
<b>MC : corrinoïd méthyltransferases</b>	<b>mtsB1</b>	WP_019177198.1	AGI86077.1
		WP_019177442.1	
<b>Gènes dont le rôle est encore inconnu</b>			
<b>MC corrinoïd proteins</b>			
	<b>mtxC1</b>	WP_019176763.1	AGI85166.1
	<b>mtxC2</b>	WP_019178649.1	
	<b>mtxC3</b>	WP_019177907.1	

les trois arborent, comme communément chez les archées, un cycle TCA partiel. Comparées aux souches intestinales connues (*Mb. smithii* et *Ms stadtmanae*), peu de gènes impliqués dans la synthèse de la paroi ou de la membrane sont présents. Les différences à l'intérieur de l'ordre sont nombreuses. Ces trois génomes de *Methanomassiliicoccales* présentent des disparités concernant l'usage des codons. Ceci est particulièrement vrai quant à l'usage du codon *ambre* UAG, pouvant servir de codon stop ou de moyen d'encodage de la pyrrolysine (Figure 5 de l'article présenté en annexe 5, également visible dans les données supplémentaires à l'article, Table S2 et Table S12).

### c) Conclusion et perspectives

Les *Methanomassiliicoccales* semblent être très versatiles. Les séquences qui leur sont affiliées sont disséminées dans divers environnements. Elles font partie d'un groupe monophylétique incluant des méthanogènes et des non-méthanogènes (par exemple les *Thermoplasmatales*). Génétiquement, elles disposent d'une utilisation différentielle des codons, en particulier *ambre*, qui serait liée à la disponibilité des méthylamines dans leur parcours évolutif. Ces analyses ont également révélées des adaptations particulières à l'environnement digestif. Parmi elles, un gène codant la choloylglycine hydrolase conférant une résistance aux sels biliaires dans le TGI n'est présent uniquement que chez *Ca. Mmp. alvus*, le seul représentant du cluster digestif analysé. Le génome de *Ca. Mmp. alvus* est le plus réduit et présente une sélection de gènes destinés à l'adaptation intestinale probablement issus de commensales du tractus digestif. Inversement, *Mmc. luminyensis* a la taille de génome la plus large (2,6 Mpb), présente un potentiel adaptatif plus élevé, expliquant sa récente adaptation, une présence plus opportuniste, voire aléatoire dans l'environnement digestif. Précédemment décrite, *Ca. Mmc. intestinalis* possède une taille de génome intermédiaire aux deux autres, et est phylogénétiquement plus proche de *Mmc. luminyensis*. Sa richesse en (A + T)% pourrait témoigner d'un phénomène d'évolution rapide en cours ainsi que d'une rationalisation du génome de *Ca. M. intestinalis* : ceci suggère une évolution à l'œuvre amenant vers un phénomène d'adaptation à l'environnement intestinal de ce membre du cluster mixte. Les capacités métaboliques au niveau des substrats de méthanogenèse semblent néanmoins être inchangées : les *Methanomassiliicoccales* sont des méthylophes obligatoires, d'après les données physiologiques avec le méthanol comme source de groupement méthyl. Elles se caractérisent également par l'absence des six premières étapes de la méthanogenèse hydrogénotrophe. En leur sein, seule *Ca. Mmc. intestinalis* ne semble pas capable d'utiliser le diméthylsulfide, contrairement aux deux autres.

#### II.2.2.3 Capacités métaboliques réelles des *Methanomassiliicoccales* intestinales : implications dans le tractus digestif humain

À l'issue des travaux précédents, il résulte que les *Methanomassiliicoccales* intestinales possèdent l'arsenal génétique conférant la possibilité d'une méthanogenèse à partir de méthyla-

mines, en considérant également la présence de l'encodage potentiel de la pyrrolysine. Cependant, les différences observées avec l'existant pour le système Pyl interrogent sur la fonctionnalité réelle de ce système chez les *Methanomassiliicoccales*, et en conséquence d'une réelle méthanogenèse à partir de méthylamines. Cependant, des arguments forts, sans preuve définitive, ont été apportés pour les membres du rumen RCC [92]. Dans cette étude, une diminution de RCC et des transcrits des gènes impliqués dans cette méthanogenèse a été observée, en réponse à une modification alimentaire diminuant la quantité de méthylamines. Cependant, des preuves directes sont nécessaires. Elles peuvent être obtenues grâce à la souche isolée *Mmc. luminyensis*. Ceci n'est pas anodin, concernant la triméthylamine TMA : Cette dernière est une molécule délétère issue du métabolisme du microbiote intestinal, obtenue à partir de différents nutriments comme la choline, la phosphatidylcholine, la L-carnitine ou l'oxyde de TMA (TMAO). Ces nutriments sont apportés par des aliments communs de notre alimentation (œuf, viande, produits marins et certains légumes...). La TMA est à l'origine de la triméthylaminurie, plus communément appelée « maladie de l'odeur du poisson pourri » [357, 358]. Cette maladie est due à une déficience génétique de l'enzyme Flavin containing MonoOxygenase 3 (FMO<sub>3</sub>), empêchant la conversion de la TMA générée au niveau intestinal en TMAO par le foie. Cette maladie rare est actuellement sans traitement réel : les moyens préventifs sont essentiellement des antibiothérapies au long cours, ou des approches alimentaires individu-dépendant, reflétant probablement en ceci les différences de microbiotes intestinaux de ces patients et leur capacité à produire de la TMA en fonction de ces aliments. Cette maladie se traduit par une odeur désagréable due à la TMA excrétée dans les fluides du corps humain (sueur, urines...). Cette odeur handicape socialement les personnes atteintes et amènent à des atteintes psychologiques extrêmement graves [357, 358]. Dans les cas habituels, la FMO<sub>3</sub> est fonctionnelle et conduit à la conversion hépatique de la TMA en TMAO, avant son excrétion par l'urine. Cependant, le TMAO, dont l'origine est strictement intestinal, liée au microbiote et à l'alimentation, est impliqué dans les maladies cardiovasculaires. Sa concentration plasmatique est un facteur de risque indépendant des autres (tabagisme, taux de cholestérol ou de triglycérides...) quant à la survenue d'accidents cardiovasculaires graves [359]. De plus, le TMAO participerait directement à la pathogenèse de l'athérosclérose, par divers mécanismes [360].

#### II.2.2.3.1 Capacités métaboliques de *Mmc. luminyensis* : tests culturaux

##### a) Données expérimentales

Pour vérifier la méthanogenèse méthylotrophe déduites des informations génomiques, *Mmc. luminyensis* (DSM 24529 / CSUR P135) [311] a été obtenue à partir de la collection allemande de microorganismes et cultures cellulaires (DSMZ, Braunschweig, Allemagne). Cette souche a été isolée à partir de fèces humaines. Elle a été maintenue dans les conditions préconisées par DSMZ, sous une atmosphère anaérobie composée de 80 % d'H<sub>2</sub> et 20 % de CO<sub>2</sub>, en milieu 119 DSMZ supplémenté de 40 mM de méthanol ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)). Le milieu 119 DSMZ a été préparé et réduit sous N<sub>2</sub>, distribué dans des tubes de Hungate à raison de 5 mL et autoclavé. Avant inoculation de *Mmc. luminyensis*, du tungstate de sélénium (0.4 mg/L) ainsi

que 50 µL d'un mélange de vitamines [77] sont ajoutés. Toutes les inoculations et les transferts sont effectués sous atmosphère anaérobie. *Mmc. luminyensis* est ainsi cultivé en présence de divers composés méthylés : méthanol (40 mM), TMA (20 mM), diméthylamine (40 mM), monométhylamine (60 mM), bétaine (20 mM), choline (20 mM), DMS (40 mM) et diméthyl-sulfite (40 mM) en présence ou non d'H<sub>2</sub>. Une culture en présence uniquement d'H<sub>2</sub> est également réalisée en tant que témoin. Les incubations se déroulent à 37 °C pendant 2 semaines. La croissance est suivie par analyse du méthane produit dans le tube et par mesure de la turbidimétrie, tous les trois jours. La culture de *Mmc. luminyensis* en présence de différents substrats méthylés (Figure II.2.11) montre que seules les cultures réalisées en présence d'H<sub>2</sub> présentent une croissance et une production de CH<sub>4</sub>. La croissance est plus intense en présence de méthanol et de triméthylamine. En effet, le taux de méthane détecté après une incubation de 12 jours atteint 6% pour une DO de 0,25 pour le méthanol et 3 % avec une DO de 0,23 pour le TMA. La production de méthane de cette dernière culture double après trois jours d'incubation supplémentaire. La culture a été arrêtée à ce point pour les cultures en présence de méthanol afin d'extraire les ARN : ceci a été réalisé en vue d'éventuelles expériences de RT-PCR, où les cultures sont stoppées au moment de l'atteinte de la phase stationnaire, ici estimée à une DO de 0,26. Les croissances en présence de la MMA et de la DMA restent semblables, pour des équivalents groupes méthyles identiques. Ces cultures produisent environ 2,5 % de méthane, après 16 jours d'incubation à 37 °C et ne dépassent pas une DO de 0,12. Parmi les autres composés méthylés, seules la choline et très faiblement la bétaine semblent promouvoir la croissance de la souche. Malgré la présence de CH<sub>4</sub>, l'absence de croissance détectée par turbidimétrie en présence de DMS ne permet aucune conclusion quant à son utilisation effective comme substrat de méthanogenèse. Une partie de ces expériences a été réalisée en parallèle dans un autre laboratoire (Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Ireland), concernant l'utilisation de la MMA, DMA et TMA. Elles ont donné des résultats similaires. Par ailleurs, pour cette dernière, la TMA a pu être dosée au cours de la culture.

#### b) Conséquences importantes en santé humaine

Ces résultats ont été exploités pour illustrer une publication scientifique, montrant que les propriétés métaboliques de la méthanogenèse des *Methanomassiliicoccales* pourraient être exploitées afin de dépléter la TMA intestinale par une transformation *in situ* en méthane de manière à en réduire l'absorption par l'intestin. Ceci limiterait donc les symptômes des patients atteints de triméthylaminurie, en abaissant la quantité de TMA dans les fluides corporeux, en particulier la sueur. Cela baisserait également la concentration du TMAO au niveau plasmatique pour tous les autres individus et permettrait donc une prévention des maladies cardiovasculaires. Cette remédiation de la TMA intestinale par métabolisation en CH<sub>4</sub> serait probablement sans incidences majeures pour l'Homme. Cette publication dont je suis co-auteur « Archaeobiotics : Proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease » est présentée en annexe 6. Le principe d'action de l'utilisation de ce type d'archée comme probiotique est indiqué sur la figure II.2.12.



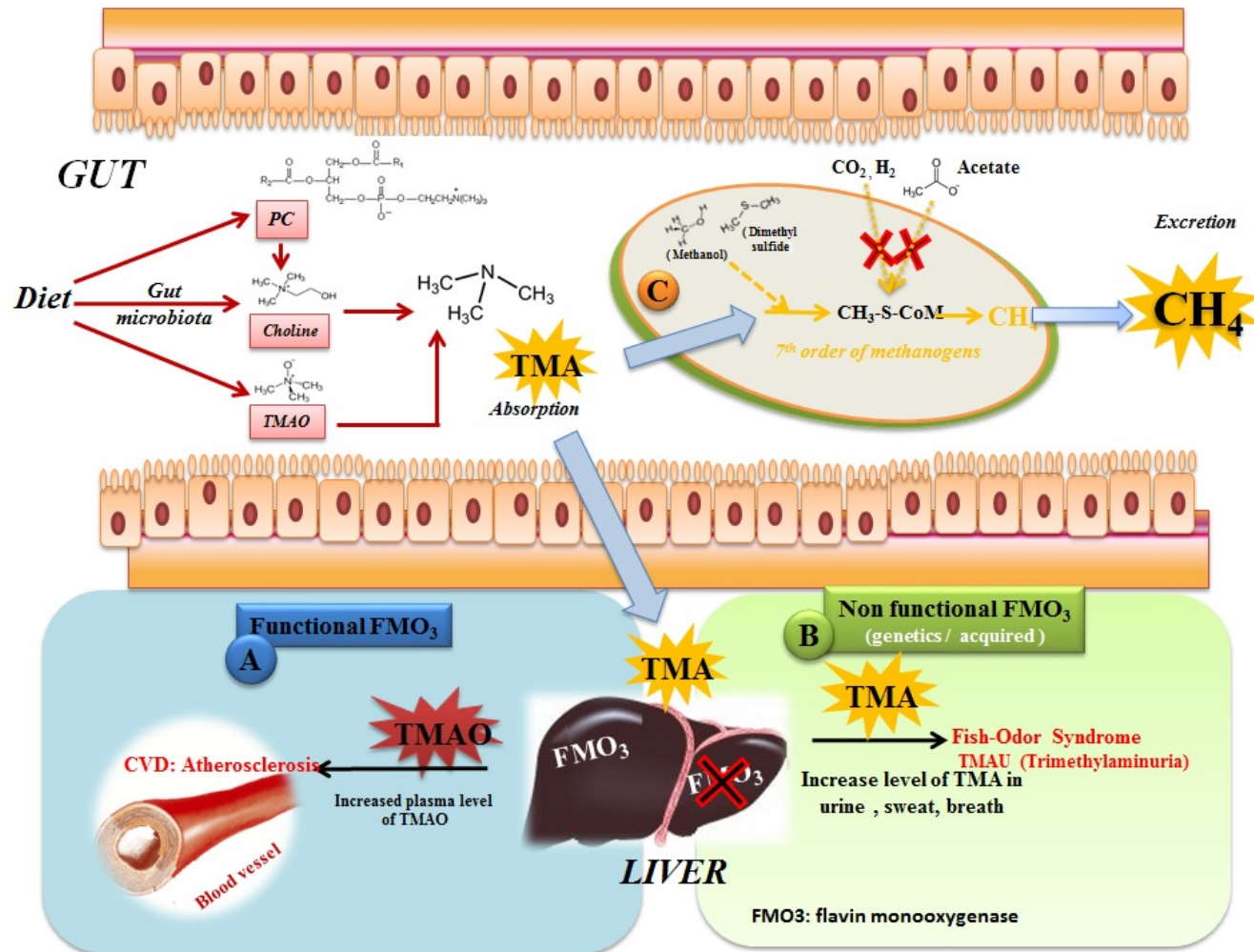


FIGURE II.2.12: Origine et métabolisme du TMA dans l'intestin humain

Dans l'appareil digestif la synthèse du TMA par le microbiote est réalisée à partir de la TMAO, la choline, phosphatidyl-choline et L-carnitine. La TMA est alors absorbée et redirigée vers le foie. Dans le cas de la voie (A) (l'enzyme FMO<sub>3</sub> est non fonctionnelle), un défaut partiel ou total dans le souffle, l'urine et la sueur est observé. Lorsque l'oxydation hépatique FMO<sub>3</sub> est fonctionnelle (B), l'augmentation de la TMAO dans le sang est associée à l'athérosclérose. Dans l'intestin, les archées méthanogènes du 7<sup>ème</sup> ordre sont en mesure d'effectuer la méthanogénèse utilisant des composés méthylés.



### c) Discussion

La méthanogenèse méthylotrophe se retrouve avérée pour cette souche de *Methanomassiliicoccales* qu'est *Mmc. luminyensis*, de manière strictement H<sub>2</sub>-dépendante, à partir de méthanol, des différentes méthylamines et potentiellement de molécules plus complexes telles que la choline ou la bétaine. En relation avec les données génomiques comparées, il est tentant d'étendre cette propriété à *Ca. Mmp. alvus*, représentant du cluster digestif. Cependant, les données génomiques d'un autre membre de ce cluster, *Ca. Methanoplasma termitum*, obtenues à partir d'un enrichissement d'un prélèvement de tractus digestif de termite, montre une absence de gènes de méthanogenèse à partir de TMA, de DMA, mais une présence de ceux permettant une méthanogenèse à partir de MMA [361]. Ceci est corroboré à des résultats de culture de l'enrichissement. Difficile donc de généraliser à l'ensemble des *Methanomassiliicoccales*, ou même à l'ensemble des organismes des clusters digestifs ou mixtes. Aussi, le rôle des gènes *mtaA* / *mtbA* est encore incertain. La faiblesse des similarités de séquences entre ces enzymes chez *Ca. Mmp. alvus* et *Mmc. luminyensis*, qui ne dépasse pas 50 % avec d'autres homologues chez les *Methanosarcinales*, pourrait refléter une spécialisation de substrat, vis-à-vis des méthylamines ou du méthanol. Une caractérisation fonctionnelle complète de ces protéines est donc nécessaire pour comprendre le mécanisme complet de la méthanogenèse méthylotrophe et ses intervenants. De plus, nous avons identifié des gènes pour des enzymes impliquées dans la méthanogénèse de sulfure de diméthyle (MtsAB) à la fois dans le génome de *Ca. M. alvus* et *Mmc. luminyensis*. Une telle gamme de substrats est inhabituelle chez les méthanogènes, et n'a été jusqu'à présent retrouvée que chez les *Methanosarcinales* [362]. Cependant, les résultats de nos expériences restent ambigus quant à une utilisation avérée du DMS chez *Mmc. luminyensis*.

Ces propriétés métaboliques exclusives (méthanogenèse méthylotrophe à partir de TMA, H<sub>2</sub>-dépendante) a amené à la proposition de l'utilisation de souches de *Methanomassiliicoccales* comme probiotiques. Sous le terme « Archaeobiotics » se cache une notion de probiotique de nouvelle génération, avec deux innovations majeures : la première est la proposition même de l'usage du troisième domaine du vivant, Archaea, à des fins probiotiques. La seconde indique un nouveau mode de conception de souches probiotiques, basée non plus sur des résultats empiriques d'observation de propriétés de souches ou d'analyses de cohortes, mais déterminées a priori à partir des données mécanistiques des pathologies que l'on souhaite prévenir. Ainsi, la TMA intestinale s'avère être la cible importante sur laquelle agir, à la fois pour la triméthylaminurie et la prévention de pathologies vasculaires. En conséquence, au travers des propriétés réelles ou supposées de classes d'organismes, on peut rechercher des souches qui accompliront l'objectif recherché, dans ce cas la déplétion de la TMA intestinale en composé inerte qu'est le méthane.

### d) Conclusion et perspectives

Étant donné la prévalence dans le TGI humain plutôt rare de *Mmc. luminyensis* comparativement à d'autres lignées de *Methanomassiliicoccales*, en particulier du cluster digestif, on peut s'interroger sur la pertinence de ce type de micro-organismes comme modèle d'étude pour

ce concept d'"archaeobiotics". Cependant, il reste le seul disponible isolé. À cet fin, de même que pour une meilleure connaissance des *Methanomassiliicoccales*, d'autres isolats seraient nécessaires. Cependant, ce concept pourrait d'ores et déjà être validé en reprenant / adaptant le modèle *in vitro* d'études des archées méthanogènes intestinales décrit dans la première partie de ces résultats.

#### II.2.2.3.2 *Ca. Methanomethylophilus alvus* : capacités métaboliques et isolement

##### a) Contexte de l'étude

La souche initiale de *Ca. Mmp. alvus* n'est connue qu'au travers de son génome, obtenu par enrichissement cultural à partir de fèces humain. Comme *Mmc. luminyensis*, elle utilise l'hydrogène comme donneur d'électrons et le méthanol comme accepteur final d'électrons pour produire du méthane [91]. C'est cette particularité qui a permis son enrichissement au niveau du consortium et a rendu possible l'obtention des données de son génome [91]. Comme déjà mentionné, elle fait partie du clade intestinal des *Methanomassiliicoccales* et présente ainsi un grand intérêt pour une meilleure connaissance de l'ordre et de son évolution, de la biologie des *Methanomassiliicoccales* et de leur rôle dans l'intestin, ainsi que pour valider le concept "archaeobiotics". C'est pourquoi une partie importante de ma thèse a été consacrée à la tentative d'isolement et à la caractérisation d'une souche *Mmp. alvus*. Pour ce faire, nous avons tenté tout d'abord enrichir les cultures en archées, notamment en testant également d'autres nouveaux substrats spécifiques selon les révélations obtenues par les données génomiques. Toutefois, les composants tronqués du système Pyl met le doute quant à la fonctionnalité des méthyltransférases spécifiques aux méthylamines. Dans cette partie nous avons vérifié la capacité de *M. alvus* à utiliser la MMA et la TMA et par conséquent également, mais indirectement, la fonctionnalité de l'encodage Pyl.

##### b) Matériel et méthodes

Les enrichissements initiaux ont été réalisés dans le milieu 119 DSMZ dans lequel la solution de vitamines de Balch (1979) [77], 60 mM de méthanol et 0,4 mg/ L de tungstate de sélénium sont ajoutés. Les cultures de consortium sont réalisées en présence de 2 bar d'H<sub>2</sub>. Le méthanol a également été remplacé par différents composés méthylés tels que la MMA (60 mM) et la TMA (20 mM) de manière à avoir des équivalents groupements méthyle similaires et autoriser des analyses comparatives. La croissance a été suivie par quantification d'un fragment de 118 pb du gène codant pour l'ARN 16S des *Methanomassiliicoccales*, à l'aide du couple d'amorces spécifiques Fw GGGGTAGGGGTAAAATCCTG et Rv CGGGGTATC-TAATCCCGTTT, alors que les bactéries étaient quantifiées à l'aide d'amorces universelles.

La proportion de CH<sub>4</sub> produite a également été mesurée dans cette expérience. Pour l'isolement, le consortium a été utilisé pour ensemercer un milieu solide selon la technique des roll-tubes (Hungate et Marcy et al., 1973). Cette technique consiste à rajouter de l'agar (1,5 % m/v) dans des tubes de Hungate contenant le milieu, avant autoclavage. Après stérilisation du milieu (121 °C pendant 20 min), le milieu est maintenu à 55 °C dans un bain-marie.

Le consortium microbien, à raison de 1/10<sup>ème</sup> ainsi que les additifs (méthanol 40 mM, vitamine Vancomycine 25 mg/L; 50 mL vitamine Balch) sont alors inoculés. Une série de dilution du consortium est également réalisée. Après inoculation, les tubes sont aussitôt roulés sur la glace de manière à gélifier le milieu en une fine couche de gélose sur les parois du tube. Les roll-tubes sont incubés pendant plusieurs jours, semaines à 37 °C. Des analyses de gaz sont régulièrement effectuées pour détecter une éventuelle croissance de méthanogènes. Les colonies des tubes présentant une haute concentration de CH<sub>4</sub> sont repiquées en milieu liquide sous une atmosphère riche en H<sub>2</sub>, en condition anaérobie. Un suivi de méthane est une seconde fois réalisé sur ces nouvelles cultures. Les cultures des tubes montrant une production de méthane passent par une étape de purification. Celle-ci est réalisée par une cascade de dilutions pour se débarrasser d'éventuels contaminants. Des vérifications continues sont faites par observation au microscope photonique. Pour une description caractéristique de la souche, une observation en microscopie électronique (Hitachi H-7650 à 80 KV équipé d'une caméra numérique Hamamatsu) a été réalisée par Christelle Blavignac, CICS, université d'Auvergne. Une culture de *Methanomethylophilus alvus* en fin de phase exponentielle à une densité optique de 0,52 a été utilisée pour cette observation. La suspension bactérienne est déposée sur des grilles de cuivre formvar-carbone puis contrastée pendant une minute avec de l'uranyless avant d'être observée au microscope (Delta Microscopies, France).

### c) Résultats

Au cours des tentatives d'isolement, des enrichissements très élevés en *Ca. Mmp. alvus* ont été obtenus, permettant le test de substrats de méthanogenèse sur cette souche. Le suivi de la croissance *M. alvus* dans le consortium par PCR quantitative sur 120 heures de culture montre que la concentration de l'archée diminue si elle n'est cultivée qu'en présence d'H<sub>2</sub> (Figure II.2.11). L'ajout de composés méthylés (méthanol, MMA ou TMA) permet une croissance de *M. alvus*. En effet, après 48 heures d'incubation le méthanol semble induire une croissance significative avec une augmentation d'un facteur de 10. A 120 heures d'incubation, la croissance faible au départ des cultures en présence de substrats MMA et TMA finit par rattraper la croissance observée en présence de méthanol. De plus, contrairement à la croissance en présence de méthanol (atteint la phase exponentielle à 48h), la croissance en présence de méthylamines semblent encore être en phase exponentielle après 120 heures d'incubation. Notons également que la production de méthane (Figure II.2.11.b) est bien meilleure en présence de TMA avec un taux de 18.8 % de l'atmosphère contre 11 à 13 % produits en présence de méthanol et de MMA., à 120h de culture.

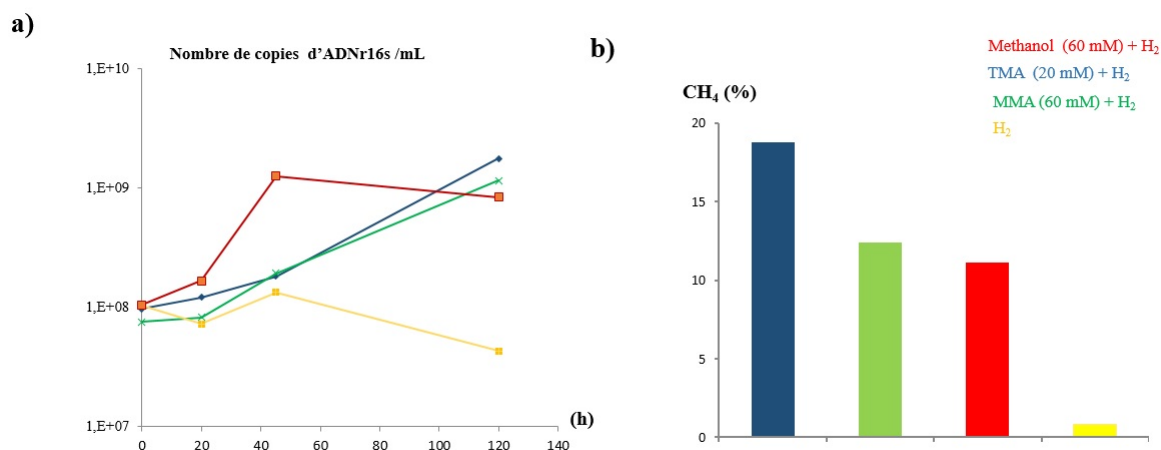


FIGURE II.2.13: Croissance et production de méthane par *Ca. Mmp. alvus* cultivée en consortium en présence de méthanol, MMA et TMA

La croissance de *Ca. Mmp. alvus* a été suivie en parallèle par quantification du marqueur moléculaire ADNr16s (à gauche) et par la production de méthane (à droite), en présence de différents composés méthylés : méthanol (60 mM, en rouge), monométhylamine (MMA, 60 mM, en vert) et triméthylamine (TMA, 20 mM, en bleu). Un témoin est également réalisé en présence d'uniquement H<sub>2</sub>.

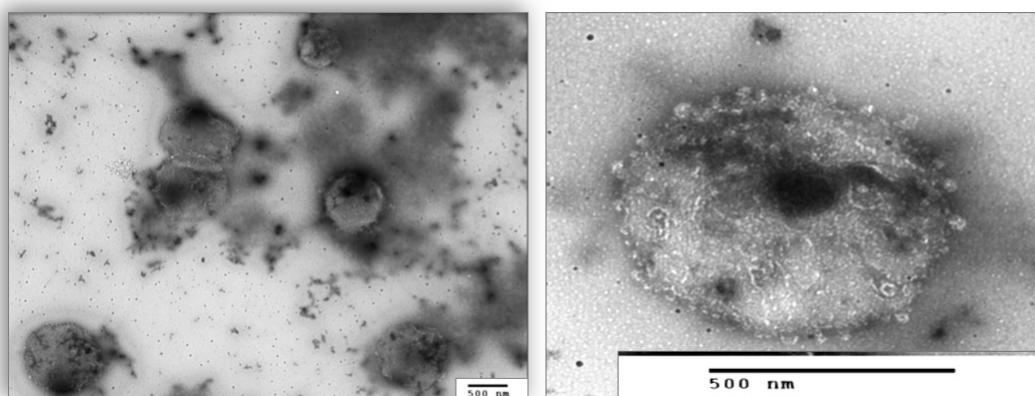


FIGURE II.2.14: *Methanomethylophilus alvus* MA06, gen. nov, sp. nov., observée au microscope électronique en transmission, coloration négative

Une culture de *Methanomethylophilus alvus* en fin de phase exponentielle à une densité optique de 0,52 a été utilisée pour cette observation. La suspension bactérienne est déposée sur des grilles de cuivre formvar-carbone puis contrastée pendant une minute avec de l'uranyless (Delta Microscopies, France). Les cellules sont ensuite observées avec un microscope électronique en transmission Hitachi H-7650 à 80 KV équipé d'une caméra numérique Hamamatsu. Les cellules présentent une forme en coque et semblent avoir des tailles différentes selon la phase de croissance à laquelle elles se trouvent. Elles sont plus petites en début de croissance (500 - 600 nm) et grandissent en fin de phase exponentielle pour atteindre 1,2 µM. Une tache noire, ronde, de nature et de fonctions inconnues est visible sur toutes les cellules de *Mmp. alvus*.

Cliché de Christelle Blavignac, CICS de Clermont-Ferrand, Université d'Auvergne.

Grâce à l'expertise de Bernard Ollivier, directeur du laboratoire MIO-MEB (IRD-CRNS-AMU, Marseille-Luminy), différentes stratégies ont été appliquées pour tenter d'isoler *Ca. Mmp. alvus*, après de nombreuses tentatives. Celles-ci ont finalement abouties, grâce à une meilleure maîtrise technique acquise au laboratoire MIO-MEB. Des filtrats du consortium sont ajoutés à la culture de l'isolat afin de permettre une croissance plus rapide. La pureté de cette souche, nommée *Methanomethylophilus alvus* *gen. nov, sp. nov*, souche MA06 a été vérifiée par observation au microscope optique, par PCR quantitative ciblant les ADNs bactériens et par coloration négative en microscopie électronique à transmission. Cette dernière approche permettait une caractérisation morphologique (Figure II.2.13), l'observation montre que les cellules de *M. alvus* sont de formes cocci. Elles ont une taille de 0.5  $\mu\text{M}$ , alors que des tailles plus importantes (allant jusqu'à 1.2  $\mu\text{M}$ ) sont également observés pour des cellules apparemment en souffrance. Une seule morphologie caractéristique est observée avec des cellules coccoides présentant toutes une tache noire de nature inconnue sur leur surface. Ces résultats ont fait l'objet d'une communication affichée lors du VIIème colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) qui s'est tenu à Anglet en novembre 2015. Ce poster est présenté en annexe à ce manuscrit. Enfin, le séquençage du génome vient d'être réalisé en collaboration avec le laboratoire de Paul W. O'Toole (APC, UCC, Ireland). La quantité et la qualité des séquences obtenues sont malheureusement trop faibles pour assurer un assemblage correct, même en utilisant les données du génome précédent de *Ca. Mmp. alvus* [91]. Ce séquençage devra être ré-entrepris au plus vite. Cependant, quelques données ont pu être obtenues : ainsi, le gène ADNr 16S est 100 % identique à celui de la souche précédemment séquencée.

#### d) Discussion et perspectives

Jusqu'à présent, nos résultats étaient partiels, se contentant d'analyser le génome pour prédire leur fonctions et les substrats particuliers de ce microorganisme. Ces données ont été fondamentales en suggérant l'utilisation de différents substrats pour les enrichissements. Cependant la structure particulière que présente le système Pyl et de ces composants ont largement mis le doute sur sa fonctionnalité et par conséquent de la présence d'une méthylophie à partir de méthylamines. Nos tests sur des consortia enrichi en *Ca. Mmp. alvus* et ne comportant aucun autre méthanogène montrent que les souches croissent en présence de MMA ou de TMA, en addition au méthanol. Un temps d'adaptation semble nécessaire pour le passage d'une culture en méthanol en une culture en MMA ou TMA. Ceci peut être dû à une induction de la synthèse des enzymes et des protéines nécessaires pour le métabolisme de ces nouvelles sources. Après 5 jours d'incubation, le taux de croissance en présence de méthylamines est comparable à celui en présence de méthanol sans pour autant atteindre la phase stationnaire. La production de méthane est par ailleurs plus importante en présence de TMA comparée aux autres substrats, bien que les proportions en groupement méthyles soient équivalentes. *M. alvus* aurait ainsi peut-être plus d'affinité au substrat TMA qu'envers les autres, justifiant également la sélection au cours des générations d'une machinerie génétique fonctionnelle permettant l'encodage de Pyl, et la diffusion de cet acide aminé dans d'autres protéines putatives. La croissance de *Mmp. alvus* dans les conditions actuelles de culture reste

lente par rapport à celle observée en consortium. Ceci semble indiquer qu'un facteur, voir une bactérie, présent(e) dans le consortium, est nécessaire pour assurer une croissance optimale. Des extraits du milieu de culture du consortium permettant une accélération de la croissance, il s'agit plus vraisemblablement d'un ou plusieurs facteurs synthétisés par le consortium, qui accélère cette croissance.

*e) Conclusion et perspectives*

*Methanomethylophilus albus*, *gen. nov.*, *sp. nov.* est une archée de forme cocci de petite taille. C'est le premier représentant isolé du clade digestif des *Methanomassiliicoccales*, pour laquelle la création d'une famille taxonomique est proposée du fait de grandes différences génomiques et de séquences 16S avec les deux autres *Methanomassiliicoccales* du cluster mixte : la famille des *Methanomethylophilaceae*. Isolée de fèces humaine, elle présente des signatures d'adaptation à l'environnement intestinal. A la fois sur des bases génomiques et de culture en consortium, elle est strictement H<sub>2</sub>-dépendante, réalisant une méthanogenèse uniquement méthylotrophe, capable de réduire le méthanol, la MMA et la TMA. L'analyse génomique montre également une capacité à réduire d'autres composés méthylés (DMA et DMS), mais ceci devra être vérifié, tout comme les autres données, avec la souche en culture pure. Une amélioration des conditions de culture pour réduire le temps de génération est nécessaire. Ceci semble passer par la recherche d'un facteur présent dans le consortium, mais absent du milieu DSM 119.

Troisième partie

DISCUSSION





## DISCUSSION

Les origines des changements de la composition du microbiote associés au vieillissement sont encore mal déterminées. En parallèle, la dysbiose en résultant affecte l'homéostasie du corps humain [265]. Cependant, ces différences sont faibles quand sont comparés les microbiotes de sujets adultes et ceux de personnes âgées en pleine santé. Cette distinction est surtout observée avec des personnes âgées présentant d'autres caractéristiques que leur seul âge avancé, comme une malnutrition ou une consommation de médicaments (antibiotiques et anti-inflammatoires), ce qui est le plus souvent commun [270]. On admet toutefois la présence de changements liés à un déclin de l'état général. Nos études sur le microbiote de rat vont également dans ce sens, avec des modifications inhérentes à l'avancée dans l'âge. Ces changements se résument souvent en une réduction de la diversité de la flore, caractérisée par une grande variabilité interindividuelle, avec la diminution des groupes bactériens *Firmicutes*, *Bifidobacteria*, *Clostridium cluster XIV*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Blautia spp.*, *Eubacterium spp.* et l'augmentation de la proportion des entérobactéries et *Bacteroidetes*. Les voies métaboliques de protéolyses y semblent particulièrement favorisées [10]. Ces changements sont couplés à une apparition/augmentation d'archées méthanogènes associée à une plus grande diversité [17, 234]. La part que prennent ces archées dans la physiologie générale de l'individu reste méconnue, faute de caractérisations des propriétés du microbiote méthanogène en premier lieu.

### **Archées méthanogènes intestinales, un groupe marginal ?**

Il était établi jusqu'à peu que 30 à 77 % des adultes occidentaux étaient porteurs de méthanogènes [363, 237, 12]. L'utilisation de méthodes moléculaires plus sensibles que la détection de méthane dans le souffle ("breath-test") a montré que la quasi-totalité des humains, tout âge et sexe confondus sont en fait porteurs des méthanogènes. En effet, la détection de méthane dans le souffle n'est observée qu'à partir d'une quantité d'archées méthanogènes supérieure à  $10^6$  copies du gène ADNr16S par gramme de selles [14]. Ainsi, une quantification de l'ADNr 16S montre 100 % de sujets porteurs de méthanogènes (n=95) quand l'excrétion de méthane n'est détectée que chez seulement 62 % d'entre eux (n=95) [14]. Selon Dridi et al. (2012) et Jalanka-Tuovinen et al. (2011), grâce aux méthodes moléculaires plus sensibles, plus de 89 % de la population sont porteurs de méthanogènes intestinaux [234, 364]. Ceux-ci représentent 0.003 à 12 % du microbiote du colon distal [247] et sont formées de *Methanobacteriales* et de *Methanomassiliicoccales*. Des individus peuvent également avoir plus de 10 % de méthanogènes dans leur microbiote fécal (données personnelles, issues des travaux de Tiakht et al., 2013) [365]. La haute prévalence des méthanogènes chez l'Homme semble concerner surtout les *Methanobacteriales*, et en particulier *Mb. smithii* dont la présence semble indépendante de

l'âge, selon Dridi et al (2012) : Enfants, adultes et personnes âgées semblent presque tous être porteurs de *Mb. smithii* de manière égale et la proportion de *Ms. stadtmanae* [234], présente chez un tiers de la population, semble être stable dans les différentes classes d'âge [233]. Inversement, l'étude de Vanderhaeghen et al. (2015) montre une prévalence qui augmente avec l'âge avec respectivement 65 % (n=26) et 89 % (n=18) de porteurs de *Methanobacteriales* chez les enfants et les adultes [314]. De plus, ces derniers travaux montrent également une augmentation de l'abondance relative des méthanogènes, passant de 0,15% à 0,52 % chez les adultes. Seul le facteur âge semble impliqué : l'Indice de Masse Corporelle (IMC) n'apporte aucune corrélation dans cette étude [314], sachant que les liens entre IMC/obésité et méthanogènes restent discutés (voir par exemple [297, 326, 366]). En l'absence de réponses claires, l'IMC doit donc être considéré lors des études de prévalence. Bien que de découverte plus récente, la prévalence des *Methanomassiliicoccales* semble clairement associée à l'âge de l'individu. Dans des études menées au laboratoire, 20 % (n=63) de la population étaient porteurs de *Methanomassiliicoccales*, dont 17 % d'adultes et 50 % de personnes âgées de plus de 70 ans [17]. L'étude de Vanderhaeghen et al., (2015), ou l'ensemble des *Methanomassiliicoccales* était ciblé, la prévalence semble encore plus élevée, avec 50 % des adultes [314]. Notons également que les *Methanomassiliicoccales* semblent particulièrement prévalentes dans certaines populations, comme la tribu Yanomami du Venezuela [367]. L'abondance relative des *Methanomassiliicoccales* semble par ailleurs plus faible que celle rencontrée avec *Mb. smithii* : 0.1 % contre 0.52 % pour les *Methanobacteriales* chez les adultes [314]. Dans l'étude Dridi et al., (2012b), *Mmc. luminyensis* n'est détecté que chez 4 % de la population avec une légère majorité (6 %) de personnes âgées entre 60 et 100 ans. Cependant, d'après notre propre expérience, cette espèce n'est pas, et de loin, la plus fréquente dans le microbiote fécal humain de personne âgée. De plus, différents résultats laissent présager une diversité de cet ordre bien plus importante que celle des *Methanobacteriales*, en particulier chez les personnes âgées [17]; courbes de fusion observées en qPCR du marqueur 16S spécifique de *Methanomassiliicoccales*; P.W. O'Toole, communication personnelle).

### **Des espèces toutes dépendantes de l'hydrogène gazeux**

D'une manière caractéristique, toutes les espèces rencontrées dans le TGI humain sont dépendantes de l' H<sub>2</sub> pour leur méthanogenèse. Ce caractère est une normalité pour les *Methanobacteriales* d'une manière générale, car elles sont habituellement toutes méthanogènes hydrogénotrophes. D'une manière curieuse, l'une des rares espèces *Methanobacteriales* n'effectuant pas cette méthanogenèse hydrogénotrophe (*Ms. stadtmanae*), réalise une méthanogenèse méthylotrophe qui fait également figure d'exception, en étant H<sub>2</sub> dépendante [89]. Cette supposée exception au sein des méthanogènes méthylotrophes est en fait, jusqu'à maintenant, le caractère commun à l'ensemble des *Methanomassiliicoccales*, tous H<sub>2</sub> dépendant. Ceci nécessite des systèmes différents, probablement énergétiquement plus rentable, que ceux trouvés habituellement chez les *Methanosarcinales*. Les hypothèses émises avec les données génomiques [368] commencent à révéler des mécanismes novateurs [369]. Ainsi, l'hydrogénotrophie serait un facteur primordial de leur sélection au sein du microbiote intestinal, environnement très riche en H<sub>2</sub> du fait des fermentations, et dont la déplétion favorise les rendements d'extraction

d'énergie de l'alimentation, pour le microbiote comme pour l'hôte. En effet, les hydrogénotrophes au sens large, qu'ils soient méthanogènes, sulfato-réducteurs ou acétogènes, viennent se positionner comme le dernier maillon de la chaîne trophique. Ils préviennent ainsi l'accumulation d'hydrogène, qui sinon, empêcherait la régénération des co-facteurs NADH + et FADH<sub>2</sub>, les rendements de formation d'ATP et des AGCCs [314]. L'élimination efficace de H<sub>2</sub> est essentielle pour maintenir l'équilibre de la fermentation intestinale. Ainsi, des syntrophies ou des augmentations parallèles à celles d'autres bactéries associées au métabolisme des glucides complexes ne sont pas étonnantes, telles celles du genre *Ruminococcus* [333], *Blautia* [314], ou plus finement étudiée, entre *Mb. smithii* et la bactérie saccharolytique *B. thetaiotaomicron* [230].

### Niches écologiques dues à des substrats spécifiques ?

Cependant, le seul caractère hydrogénotrophe ne peut certainement pas seul rendre compte de la présence des archées méthanogènes. Celles-ci s'y retrouvent en compétition avec d'autres hydrogénotrophes (méthanogènes, sulfato-réducteurs ou acétogènes par réduction). Ainsi, des adhésines et d'autres protéines de parois facilitent certainement leur implantation et colonisation du TGI humain [232, 370, 231]. De plus, la forte prévalence de *Mb. smithii* par rapport aux autres méthanogènes peut également s'expliquer par sa méthanogenèse effectuée à partir de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>, en présence importante dans le TGI., deux substrats également nécessaires aux acétogènes par réduction. A l'inverse, les *Methanomassiliicoccales* identifiées dans le TGI présentent une gamme de substrats de méthanogenèse bien différente, plus large, et pour l'instant, avec peu de compétiteurs. Dans ce travail de thèse, le séquençage des génomes nous a permis de mettre en évidence des gènes de méthyltransferases spécifiques à des substrats méthylés (MMA, DMA, TMA et DMS). Une telle palette de substrats est également connue chez les archées méthanogènes de l'ordre des *Methanosarcinaceae*, pour l'heure non mises en évidence comme des habitants communs du TGI humain. Nos expériences montrent que *Mmc. luminyensis* utilise les méthylamines, et plus faiblement la choline, lors de la méthanogenèse (Figure III.1) et ne permettent pas de trancher définitivement sur l'utilisation de bétaine et du DMS, en culture. Cette archée est faiblement représentée chez l'Homme, et il sera important de tester l'utilisation de ces mêmes substrats pour d'autres souches de *Methanomassiliicoccales*, et en particulier la souche isolée *Mmp. alous* pour en tirer des conclusions réelles quant à l'utilisation d'amines complexes méthylées, telles que la choline, la bétaine ou encore d'autres molécules. Ainsi, on ne connaît toujours pas le mécanisme réel de l'utilisation des méthylamines. Par exemple, est-ce qu'un passage par une étape de déméthylation et / ou d'hydrolyse, simplifiant les molécules de Choline en TMA, en DMA ou en MMA avant une réelle utilisation pour la méthanogenèse, est nécessaire ? Ces étapes, si elles existent, sont-elles intra- ou extracellulaires ? Ces questions, auxquelles il est difficile de répondre, semblent non-avenue pour la TMA, vu la présence des enzymes spécifiques à une méthanogenèse à partir de cette molécule. Par manque de temps, il ne m'a pas été possible de vérifier le taux de transcrits de chaque méthyltransferase connue, en fonction des conditions de culture en présence d'un substrat donné. Ceci aurait du être réalisé par qPCR à l'aide des amorces élaborées et présentées dans le Tableau qui suit.

TABLE III.o.4: Amorces pour l'amplification des gènes de la méthanogenèse méthylo-trophe de *Mmc. luminyensis*

Nom de l'amorce	Séquences 5'-3'	Taille (pb)	Gène ciblé	T °C
239_mtaB1_mmc-F	GCTCCAGTTGTCCAAGCACG	108	<i>mtaB1</i>	62.0
240_mtaB1_mmc-R	ATCTACGAACCTGCCCTCCT			62.0
241_mtaB2_mmc-F	GGCGCCAACCTCTGAGAAGTTCG	133	<i>mtaB2</i>	53.5
242_mtaB2_mmc-R	CAGCGTCGCCCTCTCTCTGG			68.0
243_mtaB3_mmc-F	GTAACGACCCCAAGAAGTTCGCC	132+	<i>mtaB3</i>	53.7
244_mtaB3_mmc-R	CTTCCTCGGCCAGCCTGGG			66.0
245_mtmB1_mmc-F	AGG GCG ATG ATG GCC GAG C	131	<i>mtmB1</i>	64.0
246_mtmB1_mmc-R	CCG GCT GGG CCA TCG CTA G			66.0
247_mtmB2_mmc-F	TGC CGT TGT CAA CAA GAT CGT CC	215	<i>mtmB2</i>	52.0
248_mtmB2_mmc-R	TCG CAG GCC GAA TCA TAG AC			62.0
249_mtmB3_mmc-F	AGAGGAGATCAAGAGGACCC	227	<i>mtmB3</i>	64.0
250_mtmB3_mmc-R	GAACGCCCTCTATGGTAGCC			64.0
251_mtmB4_mmc-F	TCAGTGATAGCCCGTACGCCATG	196	<i>mtmB4</i>	53.7
252_mtmB4_mmc-R	TGGCCACGTCGCAGATAGC			62.0
253_mtbB_mmc-F	ATGATGTTCCACGAGAGGGC	183	<i>mtbB</i>	62.0
254_mtbB_mmc-R	AGGGGTGTAGTAAAGGCCCA			62.0
255_mttB_mmc-F	TTTGCAGAACCCCGGTATCC	151	<i>mttB</i>	62.0
256_mttB_mmc-R	GGTGTACTTAGAGGGCGCAG			64.0
257_mtbA1_mmc-F	CCA CAA GTT TGT TGA GGC CG	125	<i>mtbA1</i>	62.0
258_mtbA1_mmc-R	TAT CGG GGT GCA TCA TGT CG			62.0
259_mtbA2_mmc-F	CGT ACT GCC TCA GCT ACG AG	233	<i>mtbA2</i>	64.0
260_mtbA2_mmc-R	GCC GGT AAC TCC CAC GAT AG			64.0
261_mtsB1_mmc-F	AAG CTG ATC CTG GTC AAC GG	151	<i>mtsB1</i>	62.0
262_mtsB1_mmc-R	TGT CGA ACG TCT CCA CGA AG			62.0
263_mtsB2_mmc-F	ACC ACC AAA AGT GGG CTC AA	208	<i>mtsB2</i>	60.0
264_mtsB2_mmc-R	GGA GCT TTT CCC GTA CCT CC			64.0

Cette étude aurait également pu apporter des indices sur les axes d'intervention des protéines MtaA, MtbA et des MtxC, dont les rôles / les substrats, spécifiques ou non, sont encore hypothétiques. Cependant, les expériences menées à la fois avec *Mmc. luminyensis* et avec le consortium enrichi en *Mmp. alvus*, semblent accréditer une utilisation directe dans la méthanogenèse de la TMA. Cette capacité ne peut être généralisée à l'ensemble des *Methanomassiliicoccales* : ainsi, une souche de *Methanomassiliicoccales* du cluster "intestinal" identifiée dans le TGI du termite s'avère incapable de métaboliser la TMA (en consortium) et ne présente pas les gènes requis [361] : elle possède néanmoins les gènes d'utilisation de la MMA, gènes fonctionnels puisqu'une méthanogenèse est observée (en consortium) avec ce seul substrat. Ce cas semble également exister dans le TGI humain, ou des génomes, reconstruits à partir de données de métagénomiques s'avèrent très proches de cette souche, et sont également dépourvus des gènes de méthanogenèse de la TMA (G. Borrel, communication personnelle).

### Méthanol, un composé important du TGI ?

D'une manière étonnante, toutes les archées méthanogènes du TGI identifiées à ce jour sont capables d'utiliser le méthanol. C'est bien évidemment le cas de *Ms. stadtmanae* dont c'est le seul substrat connu de méthanogenèse. C'est également le cas de toutes les *Methanomassiliicoccales* étudiées à ce jour. Ici, nous montrons qu'il s'agit également du cas de *Mb. smithii*, même si les preuves définitives manquent encore à ce jour. La faible production de méthane (CPG) ainsi que la faible consommation de méthanol (HPLC) ne permettent pas d'affirmer cette capacité métabolique. L'utilisation de méthanol marqué avec un isotope stable (en cours d'expérimentation) est un moyen d'éclaircir les faits : En effet, la détection de CH<sup>4</sup> marqué permettra de conclure sur l'effectivité de cette voie méthylotrophe. Si celle-ci était avérée, un nouvel élément permettant de justifier la dominance de *Mb. smithii* dans le TD sera recueillie. Nous avons cependant pu montrer que deux souches de *Mb. smithii* étaient potentiellement capables de croître en présence de méthanol et d'H<sub>2</sub>. Cette croissance est inhibée par une forte concentration (80 mM), qui leur serait toxique. Les taux de croissance restent très lents, par rapport à l'utilisation de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>.

Il se pourrait donc que l'utilisation du méthanol soit une adaptation au TGI humain, ou soit un facteur prépondérant de la sélection des souches, celles retenues possédant la capacité de "lutter" contre la présence de méthanol. En effet, de manière surprenante, des espèces très voisines de *Mb. smithii* ne semblent pas avoir cette capacité (les *Methanobacteriales* en général) contrairement aux espèces buccales de l'Homme. Ainsi, *Methanobrevibacter oralis*, commensal du microbiote buccal, possède 4 copies des gènes *mtaABC* et l'espèce *Methanobrevibacter arboriphilus* (retrouvée habituellement dans les rizières) isolée et séquencée depuis des matières fécales humaines en faisant un potentiel méthanogène du tractus digestif. Celle-ci possède une copie des gènes *mtaABC* [371].

De plus, il existe des espèces bactériennes qui ont une capacité élevée d'utilisation du méthanol, comme *Eubacterium limosum*. En définitive, ceci montre l'importance du méthanol synthétisé au niveau intestinal par métabolisme du microbiote colique à partir de pectines.

Enfin, la capacité d'utilisation directe des pectines par *Mb. smithii* est une surprise, n'ayant pu mettre en évidence d'enzymes pectinolytiques connues codées par le génome de ces souches.

### Réévaluation du rôle des archées méthanogènes du TGI de l'Homme

A ce jour, aucune archée pathogène n'a été décrite dans la littérature. Dans le TGI, nos résultats indiquent que les archées méthanogènes semblent plutôt avoir un rôle bénéfique. Il est cependant possible qu'elles présentent des rôles négatifs, qu'il s'agisse d'un rôle de ralentissement du transit imputé directement au CH<sub>4</sub> et d'autres pathologies : Syndrome de l'Intestin Irritable, cancer colorectal, constipation, obésité. Cependant, jusqu'à maintenant, les éléments directs manquent et il est difficile de passer de corrélations, par ailleurs pas toujours avérées [372] à des relations de causes à effets. Les expérimentations en système ECSIM sur le temps de transit donnent des arguments que ce facteur favorise les groupes bactériens qu'on retrouve associés habituellement aux méthanogènes. Ainsi, même si cela n'exclut pas une participation active du méthane et/ou des méthanogènes à un ralentissement du temps de transit, il semblerait que l'abondance des méthanogènes soient plutôt une conséquence qu'une cause de la constipation. Néanmoins, des travaux récents indiquent de nouvelles pistes de pathologies où certains méthanogènes pourraient être impliqués. Ainsi, *Ms. stadtmanae* s'avère entraîner des réactions pro-inflammatoires importantes sur des cellules mononuclées et des cellules dendritiques *in vitro* [279, 15], et des anticorps circulants (IgG) dirigés contre cette espèce sont retrouvés chez les patients atteints de la maladie de Crohn [279]. De plus, la grande prévalence des *Methanomassiliicoccales* chez les personnes âgées interroge. Des travaux menés en collaboration avec le laboratoire de P.W. O'Toole de l'University College of Cork (Irlande) montrent notamment que la diversité des *Methanomassiliicoccales* humaine est variable avec l'état de santé de l'individu (G. Borrel et P.W. O'Toole, communications personnelles).

Dans l'état actuel des connaissances, il semble important de ne pas considérer l'ensemble des archées méthanogènes du TGI comme un seul et unique groupe, sans distinctions entre ces différents membres. Ceux-ci présentent néanmoins des caractéristiques communes en faisant un groupe fonctionnel du microbiote intestinal humain : Leur caractère hydrogénotrophe leur confère une place stratégique dans l'écosystème colique, facilitant les fermentations. De par leur méthylophie, certains de ces membres aident à la détoxification de la lumière intestinale, par élimination de molécules délétères telles que le méthanol ou la TMA. La Figure XX illustre et synthétise notre vue renouvelée de la participation des archées méthanogènes au métabolisme intra-intestinal et de leur rôle au sein du microbiote. Certaines de ces propriétés pourraient s'avérer extrêmement utiles à terme pour la prévention de certaines maladies, telles que la triméthylaminurie et l'athérosclérose, en limitant le flux de TMA vers le foie. La majorité des liens sont établis sur la base d'approches moléculaires et restent putatives. Le passage par des méthodes culturelles classiques est obligatoire pour confirmer les liens encore en suspens (ici représenté avec un point d'interrogation), avec la nécessité de disposer de souches cultivées, et de préférence isolées.





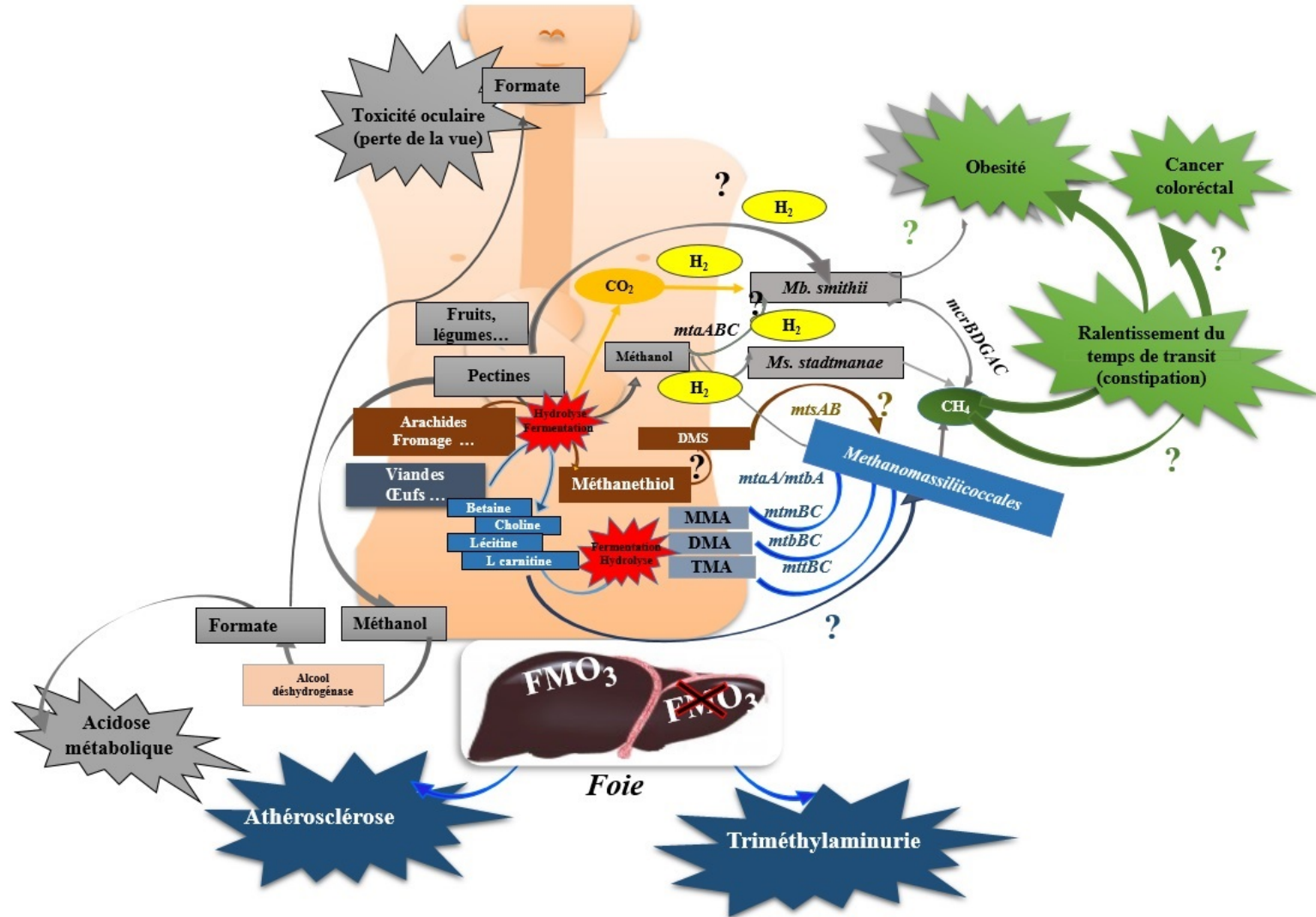


FIGURE III.o.15: Rôle proposé des méthanogènes dans le tractus digestif

En couleurs sont indiquées les sources énergétiques alimentaires, voies métaboliques empruntées par les archées dans le tractus digestif ainsi que leurs impacts sur la santé de l'hôte : vert l'action du méthane sur le corps humain, en gris les voies concernant le méthanol, en marron celles incluant le diméthyl-sulfide et en bleu celles en relation avec les composés méthylés MMA, DMA, TMA



Quatrième partie

CONCLUSION GÉNÉRALE - PERSPECTIVES



## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

A l'issue de ces travaux et de ceux parus durant ces années de thèse, notre vision du microbiote intestinal méthanogène et de son rôle s'en trouve modifiée. On compte aujourd'hui cinq espèces méthanogènes retrouvées couramment dans le TGI de l'Homme, et en particulier la personne âgée, si on exclut d'autres espèces retrouvées de manière plus anecdotiques (par exemple, des *Methanosarcinales*) ou provenant de la cavité buccale (*Methanobrevibacter oralis*). Elles sont issues de deux ordres différents : Les *Methanobacteriales* et les *Methanomassiliicoccales*. Ces dernières présentent une prévalence plus élevée chez les personnes âgées et nous anticipons la mise en évidence prochainement de nouveaux représentants, une diversité non encore révélée semblant exister au niveau du TGI de la personne âgée. Parmi les *Methanobacteriales* intestinales, toutes connues depuis plus de 30 ans, *Mb. smithii* est le méthanogène prédominant. Sa méthanogenèse hydrogénotrophe, possible aussi à partir du formate pourrait également être méthylotrophe à partir du méthanol, tout comme celle que réalise *Ms. stadtmanae*, l'autre *Methanobacteriale* d'importance du TGI humain. Avec cette même capacité mise en évidence chez les *Methanomassiliicoccales* étudiées, le méthanol semble être un métabolite d'importance au niveau du TGI. Les *Methanomassiliicoccales* restent particulièrement méconnues : seuls 6 représentants sont connus aujourd'hui, provenant d'environnements divers : deux souches enrichies du tractus digestif de termites MpT1 et MpM [147, 361], une souche en enrichissement de digesteur anaérobie [80] nommée *Candidatus Methanogranum caenicola*. Enfin, trois souches sont issues du tractus digestif de l'Homme : *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*, *Methanomassiliicoccus luminisensis* et *Methanomethylophilus alvus*. D'une manière globale, les *Methanomassiliicoccales* peuvent se répartir en trois grands clades, l'un comportant des membres quasi-exclusivement retrouvés dans des écosystèmes digestifs, du terme à l'Homme, en passant par les ruminants [83]. Un clade, dont aucun représentant digestif ne semble exister, reste totalement inconnu, au niveau génomique ou fonctionnel. Les données génomiques de 3 souches intestinales humaines très différentes et les travaux en culture microbienne ont permis de déduire des caractéristiques métaboliques importantes, leur méthanogenèse méthylotrophe H<sub>2</sub>-dépendante : celle-ci est possible à partir de méthanol, de méthylamines voir de DMS. Outre que ces espèces semblent ainsi posséder un système d'encodage Pyl fonctionnel, elles amènent à reconsidérer Les accepteurs finaux d'électrons dans l'environnement digestif, en y ajoutant la mono-, la di- et la tri-méthylamine, ainsi que peut-être le diméthylsulfide. L'isolement de *Mmp. alvus* représente un cap dans cette connaissance. Premier représentant de ce clade digestif, ces propriétés de méthanogenèse méthylotrophe à partir de triméthylamine vont permettre de tester notamment le concept de l'utilisation d'archées comme probiotiques, ici dans le but de prévenir la triméthylaminurie et les maladies cardiovasculaires. A cette fin, l'élaboration de systèmes *in vitro* adaptés à l'étude des méthanogènes seront d'un grand secours, de même que la mise en évidence de la présence de ce clade chez le rat âgé.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ruth E Ley, Peter J Turnbaugh, Samuel Klein, and Jeffrey I Gordon. Microbial ecology : human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122) :1022–1023, 2006.
- [2] Paul B Eckburg, Elisabeth M Bik, Charles N Bernstein, Elizabeth Purdom, Les Dethlefsen, Michael Sargent, Steven R Gill, Karen E Nelson, and David A Relman. Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728) :1635–1638, 2005.
- [3] Fredrik Bäckhed, Ruth E Ley, Justin L Sonnenburg, Daniel A Peterson, and Jeffrey I Gordon. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*, 307(5717) :1915–1920, 2005.
- [4] Von Mering Christian, Philip Hugenholtz, Jeroen Raes, SG Tringe, Tobias Doerks, Lars J Jensen, N Ward, and P Bork. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science*, 315(5815) :1126–1130, 2007.
- [5] Chaysavanh Manichanh, Lionel Rigottier-Gois, Elian Bonnaud, Karine Gloux, Eric Pelletier, Lionel Frangeul, Renaud Nalin, Cyrille Jarrin, Patrick Chardon, Phillipe Marteau, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in crohn ?s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2) :205–211, 2006.
- [6] Junjie Qin, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, Nicolas Pons, Florence Levenez, Takuji Yamada, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285) :59–65, 2010.
- [7] Karen P Scott, Silvia W Gratz, Paul O Sheridan, Harry J Flint, and Sylvia H Duncan. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, 69(1) :52–60, 2013.
- [8] Derek R Mueller, Warwick F Vincent, and Martin O Jeffries. Environmental gradients, fragmented habitats, and microbiota of a northern ice shelf cryoecosystem, ellesmere island, canada. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 38(4) :593–607, 2006.
- [9] MJ Hopkins, R Sharp, and George T Macfarlane. Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Disease*, 34 :S12–S18, 2002.
- [10] MJ Hopkins, R Sharp, and George T Macfarlane. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16s rrna abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*, 48(2) :198–205, 2001.

- [11] Sabine Bartosch, Alemu Fite, George T Macfarlane, and Marion ET McMurdo. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time pcr and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 70(6) :3575–3581, 2004.
- [12] Judlyn Fernandes, Thomas MS Wolever, and A Venketeshwer Rao. Increased serum cholesterol in healthy human methane producers is confounded by age. *The Journal of nutrition*, 128(8) :1349–1354, 1998.
- [13] Agnès Mihajlovski, Monique Alric, and Jean-François Brugère. A putative new order of methanogenic archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the mcrA gene. *Research in microbiology*, 159(7) :516–521, 2008.
- [14] Judlyn Fernandes, Angela Wang, Wen Su, Sari Rahat Rozenbloom, Amel Taibi, Elena M Comelli, and Thomas MS Wolever. Age, dietary fiber, breath methane, and fecal short chain fatty acids are interrelated in archaea-positive humans. *The Journal of nutrition*, 143(8) :1269–1275, 2013.
- [15] Corinna Bang, Katrin Weidenbach, Thomas Gutschmann, Holger Heine, and Ruth A Schmitz. The intestinal archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells. 2014.
- [16] Aharon Oren and George M Garrity. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 9) :3131–3134, 2013.
- [17] Agnès Mihajlovski, Joël Doré, Florence Levenez, Monique Alric, and Jean-François Brugère. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2) :272–280, 2010.
- [18] Prem Prashant Chaudhary, Nadia Gaci, Guillaume Borrel, Paul W O'Toole, and Jean-François Brugère. Molecular methods for studying methanogens of the human gastrointestinal tract : current status and future directions. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(14) :5801–5815, 2015.
- [19] Edward F DeLong. Everything in moderation : archaea as "non-extremophiles". *Current opinion in genetics & development*, 8(6) :649–654, 1998.
- [20] Edward F DeLong and Norman R Pace. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic biology*, 50(4) :470–478, 2001.
- [21] Laura Eme and W Ford Doolittle. Microbial diversity : A bonanza of phyla. *Current Biology*, 25(6) :R227–R230, 2015.
- [22] George E Fox, Linda J Magrum, William E Balch, Ralph S Wolfe, and Carl R Woese. Classification of methanogenic bacteria by 16s ribosomal rna characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10) :4537–4541, 1977.

- [23] Carl R Woese and George E Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11) :5088–5090, 1977.
- [24] Carl R Woese. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2) :221, 1987.
- [25] Carl R Woese, Otto Kandler, and Mark L Wheelis. Towards a natural system of organisms : proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12) :4576–4579, 1990.
- [26] Thorsten Allers and Moshe Mevarech. Archaeal genetics the third way. *Nature Reviews Genetics*, 6(1) :58–73, 2005.
- [27] Patrick Forterre and Herve Philippe. Where is the root of the universal tree of life? *Bioessays*, 21(10) :871–879, 1999.
- [28] Kira S Makarova, L Aravind, and Eugene V Koonin. A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Science*, 8(08) : 1714–1719, 1999.
- [29] Oliver T Wolf, Nicole C Schommer, Dirk H Hellhammer, Bruce S McEwen, and Clemens Kirschbaum. The relationship between stress induced cortisol levels and memory differs between men and women. *Psychoneuroendocrinology*, 26(7) :711–720, 2001.
- [30] Jeremy N Timmis, Michael A Ayliffe, Chun Y Huang, and William Martin. Endosymbiotic gene transfer : organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics*, 5(2) :123–135, 2004.
- [31] Michael W Gray. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4 (9) :a011403, 2012.
- [32] Martin Embley and Tom A Williams. Evolution : Steps on the road to eukaryotes. *Nature*, 2015.
- [33] Kelly P Williams and Donovan P Kelly. Proposal for a new class within the phylum proteobacteria, acidithiobacillia classis nov., with the type order acidithiobacillales, and emended description of the class gammaproteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 8) :2901–2906, 2013.
- [34] Kasie Raymann, Céline Brochier-Armanet, and Simonetta Gribaldo. The two-domain tree of life is linked to a new root for the archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201420858, 2015.
- [35] Anja Spang, Jimmy H Saw, Steffen L Jørgensen, Katarzyna Zaremba-Niedzwiedzka, Jorran Martijn, Anders E Lind, Roel van Eijk, Christa Schleper, Lionel Guy, and Thijs JG Ettema. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551) :173–179, 2015.

- [36] David R Boone and Richard W Castenholz. The archaea and the deep branching and phototrophic bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2001.
- [37] Karen L Hershberger, Susan M Barns, Anna-Louise Reysenbach, Scott C Dawson, and Norman R Pace. Wide diversity of crenarchaeota. *Nature*, 384(6608) :420, 1996.
- [38] James G Elkins, Mircea Podar, David E Graham, Kira S Makarova, Yuri Wolf, Lennart Randau, Brian P Hedlund, Céline Brochier-Armanet, Victor Kunin, Iain Anderson, et al. A *korarchaeal* genome reveals insights into the evolution of the archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(23) :8102–8107, 2008.
- [39] Céline Brochier-Armanet, Simonetta Gribaldo, and Patrick Forterre. A dna topoisomerase *ib* in *Thaumarchaeota* testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of archaea and eucarya. *Biol Direct*, 3 :54, 2008.
- [40] Takuro Nunoura, Yoshihiro Takaki, Hiromi Kazama, Miho Hirai, Juichiro Ashi, Hiroyuki Imachi, and Ken Takai. Microbial diversity in deep-sea methane seep sediments presented by *ssu rRNA* gene tag sequencing. *Microbes and environments/J SME*, 27(4) :382–390, 2011.
- [41] Lionel Guy and Thijs JG Ettema. The archaeal ?tack? superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends in microbiology*, 19(12) :580–587, 2011.
- [42] Céline Petitjean, Philippe Deschamps, Purificación López-García, and David Moreira. Rooting the domain archaea by phylogenomic analysis supports the foundation of the new kingdom *Proteoarchaeota*. *Genome biology and evolution*, 7(1) :191–204, 2015.
- [43] Arshan Nasir, Kyung Mo Kim, and Gustavo Caetano-Anollés. Lokiarchaeota : eukaryote-like missing links from microbial dark matter? *Trends in microbiology*, 23(8) :448–450, 2015.
- [44] Christian Rinke, Patrick Schwientek, Alexander Sczyrba, Natalia N Ivanova, Iain J Anderson, Jan-Fang Cheng, Aaron Darling, Stephanie Malfatti, Brandon K Swan, Esther A Gies, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459) :431–437, 2013.
- [45] Jean-Louis Garcia, Bharat KC Patel, and Bernard Ollivier. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe*, 6(4) :205–226, 2000.
- [46] Mario De Rosa, A Gambacorta, and A Gliozzi. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological Reviews*, 50(1) :70, 1986.
- [47] Yosuke Koga and Hiroyuki Morii. Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(11) :2019–2034, 2005.
- [48] Sonja-Verena Albers, JL Van de Vossenbergh, AJ Driessen, and Wil N Konings. Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. *Front Biosci*, 5 :D813–20, 2000.



- [49] Patrick Forterre, Celine Brochier, and Hervé Philippe. Evolution of the archaea. *Theoretical population biology*, 61(4) :409–422, 2002.
- [50] Yosuke Koga and Hiroyuki Morii. Biosynthesis of ether-type polar lipids in archaea and evolutionary considerations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1) :97–120, 2007.
- [51] Sonja-Verena Albers and Benjamin H Meyer. The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6) :414–426, 2011.
- [52] Helmut König, Harald Claus, and Ajit Varma. *Prokaryotic cell wall compounds*. Springer, 2010.
- [53] Simonetta Gribaldo and Celine Brochier-Armanet. The origin and evolution of archaea : a state of the art. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 361(1470) :1007–1022, 2006.
- [54] Marco Londei, Carolina Ciacci, Ida Ricciardelli, Loredana Vacca, Sonia Quaratino, and Luigi Maiuri. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Molecular immunology*, 42(8) :913–918, 2005.
- [55] Carol J Bult, Owen White, Gary J Olsen, Lixin Zhou, Robert D Fleischmann, Granger G Sutton, Judith A Blake, Lisa M FitzGerald, Rebecca A Clayton, Jeannine D Gocayne, et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273(5278) :1058–1073, 1996.
- [56] Gary J Olsen and Carl R Woese. Lessons from an archaeal genome : what are we learning from methanococcus jannaschii ? *Trends in Genetics*, 12(10) :377–379, 1996.
- [57] Hannu Myllykallio, Philippe Lopez, Purificación López-García, Roland Heilig, William Saurin, Yvan Zivanovic, Hervé Philippe, and Patrick Forterre. Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science*, 288(5474) :2212–2215, 2000.
- [58] David R Edgell and W Ford Doolittle. Archaea and the origin (s) of dna replication proteins. *Cell*, 89(7) :995–998, 1997.
- [59] Elizabeth R Barry and Stephen D Bell. Dna replication in the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4) :876–887, 2006.
- [60] Dale B Wigley. Orc proteins : marking the start. *Current opinion in structural biology*, 19(1) :72–78, 2009.
- [61] Nicholas P Robinson and Stephen D Bell. Extrachromosomal element capture and the evolution of multiple replication origins in archaeal chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14) :5806–5811, 2007.
- [62] Zbigniew R Grabowski, Krystyna Rotkiewicz, and Wolfgang Rettig. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer : focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chemical reviews*, 103(10) :3899–4032, 2003.

- [63] Yoshizumi Ishino and Isaac KO Cann. The euryarchaeotes, a subdomain of archaea, survive on a single dna polymerase : fact or farce? *Genes & genetic systems*, 73(6) :323–336, 1998.
- [64] Eva Nogales, Sharon G Wolf, and Kenneth H Downing. Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663) :199–203, 1998.
- [65] Tom Cavalier-Smith. Predation and eukaryote cell origins : a coevolutionary perspective. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(2) :307–322, 2009.
- [66] Natalya Yutin, Maxim Y Wolf, Yuri I Wolf, and Eugene V Koonin. The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct*, 4(9) :21, 2009.
- [67] Kira S Makarova, Natalya Yutin, Stephen D Bell, and Eugene V Koonin. Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10) :731–741, 2010.
- [68] Natalya Yutin, Pere Puigbò, Eugene V Koonin, and Yuri I Wolf. Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins. *PLoS One*, 7(5) :e36972, 2012.
- [69] Elena V Lebedeva, Roland Hatzenpichler, Eric Pelletier, Nathalie Schuster, Sandra Hauzmayer, Aleksandr Bulaev, Nadezhda V Grigor'eva, Alexander Galushko, Markus Schmid, Marton Palatinszky, et al. Enrichment and genome sequence of the group i. 1a ammonia-oxidizing archaeon "*Ca. nitrosotenuis uzonensis*" representing a clade globally distributed in thermal habitats. 2013.
- [70] Thijs JG Ettema and Rolf Bernander. Cell division and the escrt complex : a surprise from the archaea. *Communicative & integrative biology*, 2(2) :86–88, 2009.
- [71] Avram Hershko, Aaron Ciechanover, and Alexander Varshavsky. The ubiquitin system. *Nature medicine*, 6(10) :1073–1081, 2000.
- [72] Eugene V Koonin. Archaeal ancestors of eukaryotes : not so elusive any more. *BMC biology*, 13(1) :84, 2015.
- [73] D Möller-Zinkhan, G Börner, and RK Thauer. Function of methanofuran, tetrahydromethanopterin, and coenzyme f<sub>420</sub> in archaeoglobus fulgidus. *Archives of Microbiology*, 152(4) :362–368, 1989.
- [74] Hans-Peter Klenk, Rebecca A Clayton, Jean-Francois Tomb, Owen White, Karen E Nelson, Karen A Ketchum, Robert J Dodson, Michelle Gwinn, Erin K Hickey, Jeremy D Peterson, et al. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, 390(6658) :364–370, 1997.
- [75] Céline Brochier, Patrick Forterre, and Simonetta Gribaldo. Archaeal phylogeny based on proteins of the transcription and translation machineries : tackling the methanopyrus kandleri paradox. *Genome biology*, 5(3) :R17–R17, 2004.

- [76] Éric Bapteste, E Susko, J Leigh, D MacLeod, RL Charlebois, and WF Doolittle. Do orthologous gene phylogenies really support tree-thinking? *BMC Evolutionary Biology*, 5(1) :33, 2005.
- [77] William E Balch, GE Fox, LJ Magrum, CR Woese, and RS Wolfe. Methanogens : reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43(2) :260, 1979.
- [78] Jean-Louis Garcia, Bernard Ollivier, and William B Whitman. The order *Methanomicrobiales*. In *The prokaryotes*, pages 208–230. Springer, 2006.
- [79] Sarah E Hook, André-Denis G Wright, and Brian W McBride. Methanogens : methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*, 2010, 2010.
- [80] Takao Iino, Hideyuki Tamaki, Satoshi Tamazawa, Yoshiyuki Ueno, Moriya Ohkuma, Ken-ichiro Suzuki, Yasuo Igarashi, and Shin Haruta. *Candidatus* methanogranum caenicola : a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of methanomassiliococcaceae fam. nov. and methanomassiliococcales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class thermoplasmata. *Microbes and Environments*, 28(2) :244–250, 2013.
- [81] Lucy C Skillman, Paul N Evans, Graham E Naylor, Briec Morvan, Graeme N Jarvis, and Keith N Joblin. 16s ribosomal dna-directed pcr primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe*, 10(5) :277–285, 2004.
- [82] Edward W Mayer, Donald R Blake, Stanley C Tyler, Yoshihiro Makide, Derek C Montague, and F Sherwood Rowland. Methane : interhemispheric concentration gradient and atmospheric residence time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(4) :1366–1370, 1982.
- [83] Guillaume Borrel, Paul W O’Toole, Hugh MB Harris, Pierre Peyret, Jean-François Brügère, and Simonetta Gribaldo. Phylogenomic data support a seventh order of methylo-trophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome biology and evolution*, 5(10) :1769–1780, 2013.
- [84] Riikka Kietäväinen and Lotta Purkamo. The origin, source, and cycling of methane in deep crystalline rock biosphere. *Frontiers in microbiology*, 6, 2015.
- [85] James G Ferry. Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biometha-nation of complex biomass. *Current opinion in biotechnology*, 22(3) :351–357, 2011.
- [86] Yuchen Liu and William B Whitman. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1) :171–189, 2008.
- [87] Éric Bapteste, Céline Brochier, and Yan Boucher. Higher-level classification of the ar-chaea : evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea*, 1(5) :353–363, 2005.
- [88] Jean Pelmont. *Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l’environ-nement*. L’Editeur : EDP Sciences, 2005.

- [89] Wolfgang F Fricke, Henning Seedorf, Anke Henne, Markus Krüer, Heiko Liesegang, Reiner Hedderich, Gerhard Gottschalk, and Rudolf K Thauer. The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and h<sub>2</sub> for methane formation and atp synthesis. *Journal of bacteriology*, 188 (2) :642–658, 2006.
- [90] Bédís Dridi, Marie-Laure Fardeau, Bernard Ollivier, Didier Raoult, and Michel Drancourt. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 8) :1902–1907, 2012.
- [91] Guillaume Borrel, Hugh MB Harris, William Tottey, Agnès Mihajlovski, Nicolas Parisot, Eric Peyretailade, Pierre Peyret, Simonetta Gribaldo, Paul W O'Toole, and Jean-François Brugère. Genome sequence of "*Candidatus* methanomethylophilus alvus" mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *Journal of bacteriology*, 194(24) :6944–6945, 2012.
- [92] Morten Poulsen, Clarissa Schwab, Bent Borg Jensen, Ricarda M Engberg, Anja Spang, Nuria Canibe, Ole Højberg, Gabriel Milinovich, Lena Fragner, Christa Schleper, et al. Methylotrophic methanogenic thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nature Communications*, 4 :1428, 2013.
- [93] Friedrich Widdel. Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5) : 1056–1062, 1986.
- [94] K Bleicher, G Zellner, and J Winter. Growth of methanogens on cyclopentanol/co<sub>2</sub> and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS microbiology letters*, 59(3) :307–312, 1989.
- [95] Jill M O'Brien, RH Wolkin, TT Moench, JB Morgan, and JG Zeikus. Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *methanosarcina barkeri* on carbon monoxide. *Journal of bacteriology*, 158(1) :373–375, 1984.
- [96] L Daniels, G Fuchs, RK Thauer, and JG Zeikus. Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 132(1) :118–126, 1977.
- [97] Stephen A Burke, Sam L Lo, and Joseph A Krzycki. Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *Journal of bacteriology*, 180(13) :3432–3440, 1998.
- [98] Ligi Paul, Donald J Ferguson, and Joseph A Krzycki. The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons. *Journal of bacteriology*, 182(9) : 2520–2529, 2000.
- [99] A Böck, K Forchhammer, J Heider, W Leinfelder, G Sawers, B Veprek, and F Zinoni. Selenocysteine : the 21st amino acid. *Molecular microbiology*, 5(3) :515–520, 1991.

- [100] Michael Rother and Joseph A Krzycki. Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea. *Archaea*, 2010, 2010.
- [101] John F Atkins and Ray Gesteland. The 22nd amino acid. *Science*, 296(5572) :1409–1410, 2002.
- [102] Marsha A Gaston, Liwen Zhang, Kari B Green-Church, and Joseph A Krzycki. The complete biosynthesis of the genetically encoded amino acid pyrrolysine from lysine. *Nature*, 471(7340) :647–650, 2011.
- [103] Bing Hao, Weimin Gong, Tsuneo K Ferguson, Carey M James, Joseph A Krzycki, and Michael K Chan. A new uag-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science*, 296(5572) :1462–1466, 2002.
- [104] Jitesh A Soares, Liwen Zhang, Rhonda L Pitsch, Nanette M Kleinholz, R Benjamin Jones, Jeremy J Wolff, Jon Amster, Kari B Green-Church, and Joseph A Krzycki. The residue mass of l-pyrrolysine in three distinct methylamine methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44) :36962–36969, 2005.
- [105] Joseph A Krzycki. The path of lysine to pyrrolysine. *Current opinion in chemical biology*, 17(4) :619–625, 2013.
- [106] Laure Prat, Ilka U Heinemann, Hans R Aerni, Jesse Rinehart, Patrick O'Donoghue, and Dieter Söll. Carbon source-dependent expansion of the genetic code in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51) :21070–21075, 2012.
- [107] Gregory P Fournier, Cheryl P Andam, and Johann P Gogarten. Ancient horizontal gene transfer and the last common ancestors. *BMC evolutionary biology*, 15(1) :70, 2015.
- [108] Christian Hertweck. Biosynthesis and charging of pyrrolysine, the 22nd genetically encoded amino acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(41) :9540–9541, 2011.
- [109] Stephen W Ragsdale. Biochemistry : How two amino acids become one. *Nature*, 471 (7340) :583–584, 2011.
- [110] Marsha A Gaston, Ruisheng Jiang, and Joseph A Krzycki. Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine. *Current opinion in microbiology*, 14(3) :342–349, 2011.
- [111] Joseph A Krzycki. Function of genetically encoded pyrrolysine in corrinoid-dependent methylamine methyltransferases. *Current opinion in chemical biology*, 8(5) :484–491, 2004.
- [112] David G Longstaff, Ross C Larue, Joseph E Faust, Anirban Mahapatra, Liwen Zhang, Kari B Green-Church, and Joseph A Krzycki. A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3) :1021–1026, 2007.
- [113] Wenshe R Liu, Yane-Shih Wang, and Wei Wan. Synthesis of proteins with defined post-translational modifications using the genetic noncanonical amino acid incorporation approach. *Molecular BioSystems*, 7(1) :38–47, 2011.

- [114] Lukasz Dziewit, Adam Pyzik, Krzysztof Romaniuk, Adam Sobczak, Pawel Szczesny, Leszek Lipinski, Dariusz Bartosik, and Lukasz Drewniak. Novel molecular markers for the detection of methanogens and phylogenetic analyses of methanogenic communities. *Frontiers in microbiology*, 6, 2015.
- [115] Iain Anderson, Luke E Ulrich, Boguslaw Lupa, Dwi Susanti, Iris Porat, Sean D Hooper, Athanasios Lykidis, Magdalena Sieprawaska-Lupa, Lakshmi Dharmarajan, Eugene Goltsman, et al. Genomic characterization of methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PloS one*, 4(6) :e5797–e5797, 2009.
- [116] Zhe Lyu and Yahai Lu. Comparative genomics of three methanocellales strains reveal novel taxonomic and metabolic features. *Environmental microbiology reports*, 7(3) :526–537, 2015.
- [117] Regine Großkopf, Peter H Janssen, and Werner Liesack. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16s rrna gene sequence retrieval. *Applied and environmental microbiology*, 64(3) :960–969, 1998.
- [118] Kevin J Purdy, Mark A Munson, David B Nedwell, and T Martin Embley. Comparison of the molecular diversity of the methanogenic community at the brackish and marine ends of a uk estuary. *FEMS microbiology ecology*, 39(1) :17–21, 2002.
- [119] Iva Buriánková, Lenka Brablcová, Václav Mach, Aneta Hýblová, Pavlína Badurová, Jana Cupalová, Martin Rulík, et al. Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 181(2) :87–102, 2012.
- [120] Lijing Jiang, Yanping Zheng, Jinquan Chen, Xiang Xiao, and Fengping Wang. Stratification of archaeal communities in shallow sediments of the pearl river estuary, southern china. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(4) :739–751, 2011.
- [121] Prem Prashant Chaudhary, Lenka Brablcová, Iva Buriánková, and Martin Rulík. Molecular diversity and tools for deciphering the methanogen community structure and diversity in freshwater sediments. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(17) :7553–7562, 2013.
- [122] Sanae Sakai, Ralf Conrad, Werner Liesack, and Hiroyuki Imachi. *Methanocella arvoryzae* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from rice field soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(12) :2918–2923, 2010.
- [123] Zhe Lü and Yahai Lu. *Methanocella conradii* sp. nov., a thermophilic, obligate hydrogenotrophic methanogen, isolated from chinese rice field soil. *PloS one*, 7(4) :e35279–e35279, 2012.
- [124] R Huber, M Kurr, HW Jannasch, and KO Stetter. A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110 c. *Nature*, 342(6251) :833–834, 1989.

- [125] David R Boone, William B Whitman, and Yosuke Koga. Methanomicrobiales. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2001.
- [126] Jean-Pierre Jouany and Pierre Thivend. La production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique. 2008.
- [127] Sarah E Hook, Michael A Steele, Korinne S Northwood, André-Denis G Wright, and Brian W McBride. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal ph on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microbial ecology*, 62(1) :94–105, 2011.
- [128] Erin E King, Rachel P Smith, Benoit St-Pierre, and André-Denis G Wright. Differences in the rumen methanogen populations of lactating jersey and holstein dairy cows under the same diet regimen. *Applied and environmental microbiology*, 77(16) :5682–5687, 2011.
- [129] Prem Prashant Chaudhary and Sunil Kumar Sirohi. Dominance of *Methanomicrobium* phylotype in methanogen population present in murrh buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Letters in applied microbiology*, 49(2) :274–277, 2009.
- [130] Krishna M Singh, Viral B Ahir, Ajai K Tripathi, Umed V Ramani, Manisha Sajani, Prakash G Koringa, Subhash Jakhesara, Paresh R Pandya, Dharamsi N Rank, Duggirala S Murty, et al. Metagenomic analysis of surti buffalo (*bubalus bubalis*) rumen : a preliminary study. *Molecular biology reports*, 39(4) :4841–4848, 2012.
- [131] Raul Franzolin, Benoit St-Pierre, Korinne Northwood, and André-Denis G Wright. Analysis of rumen methanogen diversity in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) under three different diets. *Microbial ecology*, 64(1) :131–139, 2012.
- [132] André-Denis G Wright, Clare H Auckland, and Denis H Lynn. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from ontario and prince edward island, canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13) :4206–4210, 2007.
- [133] Diego P Morgavi, Estelle Rathahao-Paris, Milka Popova, Julien Boccard, Kristian F Nielsen, and Hamid Boudra. Rumen microbial communities influence metabolic phenotypes in lambs. *Frontiers in microbiology*, 6, 2015.
- [134] Monica A Sundset, Joan E Edwards, Yan Fen Cheng, Roberto S Senosiain, Maria N Fraile, Korinne S Northwood, Kirsti E Præsteng, Trine Glad, Svein D Mathiesen, and André-Denis G Wright. Molecular diversity of the rumen microbiome of norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial ecology*, 57(2) :335–348, 2009.
- [135] Monica A Sundset, Joan E Edwards, Yan Fen Cheng, Roberto S Senosiain, Maria N Fraile, Korinne S Northwood, Kirsti E Præsteng, Trine Glad, Svein D Mathiesen, and André-Denis G Wright. Rumen microbial diversity in svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. *FEMS microbiology ecology*, 70(3) :553–562, 2009.
- [136] Yu-heng Luo, Huan-wei Peng, André-Denis G Wright, Shi-ping Bai, Xue-mei Ding, Qiu-feng Zeng, Hua Li, Ping Zheng, Zhuo-wei Su, Ren-yong Cui, et al. Broilers fed dietary

- vitamins harbor higher diversity of cecal bacteria and higher ratio of clostridium, faecalibacterium, and lactobacillus than broilers with no dietary vitamins revealed by 16s rrna gene clone libraries. *Poultry science*, 92(9) :2358–2366, 2013.
- [137] Kathryn L Turnbull, Rachel P Smith, Benoit St-Pierre, and André-Denis G Wright. Molecular diversity of methanogens in fecal samples from bactrian camels (*camelusbactrianus*) at two zoos. *Research in veterinary science*, 93(1) :246–249, 2012.
- [138] Benoit St-Pierre and André-Denis G Wright. Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca (*vicugna pacos*). *BMC microbiology*, 12(1) :1, 2012.
- [139] Bent Borg Jensen. Methanogenesis in monogastric animals. *Environmental monitoring and assessment*, 42(1-2) :99–112, 1996.
- [140] Khin-Ohnmar Lwin and Hiroki Matsui. Comparative analysis of the methanogen diversity in horse and pony by using mcra gene and archaeal 16s rrna gene clone libraries. *Archaea*, 2014, 2014.
- [141] Paul N Evans, Lyn A Hinds, Lindsay I Sly, Christopher S McSweeney, Mark Morrison, and André-Denis G Wright. Community composition and density of methanogens in the foregut of the tammar wallaby (*macropus eugenii*). *Applied and environmental microbiology*, 75(8) :2598–2602, 2009.
- [142] Hannah V Facey, Korinne S Northwood, and ANDRÉ-DENIS G WRIGHT. Molecular diversity of methanogens in fecal samples from captive sumatran orangutans (*Pongo abelii*). *American journal of primatology*, 74(5) :408–413, 2012.
- [143] Suwat Saengkerdsub, Robin C Anderson, Heather H Wilkinson, Woo-Kyun Kim, David J Nisbet, and Steven C Ricke. Identification and quantification of methanogenic archaea in adult chicken ceca. *Applied and environmental microbiology*, 73(1) :353–356, 2007.
- [144] Johannes HP Hackstein and Theo A van Alen. Fecal methanogens and vertebrate evolution. *Evolution*, pages 559–572, 1996.
- [145] Pei-Ying Hong, Emily Wheeler, Isaac KO Cann, and Roderick I Mackie. Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the galápagos islands using 16s rrna-based pyrosequencing. *The ISME journal*, 5(9) :1461–1470, 2011.
- [146] Vladimír Šustr, Alica Chroňáková, Stanislava Semanová, Karel Tajovský, and Miloslav Šimek. Methane production and methanogenic archaea in the digestive tracts of millipedes (diplopoda). 2014.
- [147] Kristina Paul, James O Nonoh, Lena Mikulski, and Andreas Brune. "methanoplasmales," thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and environmental microbiology*, 78(23) :8245–8253, 2012.



- [148] Wander W Sprenger, Martine C van Belzen, Jorg Rosenberg, JH Hackstein, and JT Keltjens. Methanomicrococcus blatticola gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach periplaneta americana. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(6) :1989–1999, 2000.
- [149] Everly Conway de Macario and Alberto JL Macario. Methanogenic archaea in health and disease : a novel paradigm of microbial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(2) :99–108, 2009.
- [150] Elizabeth K Costello, Christian L Lauber, Micah Hamady, Noah Fierer, Jeffrey I Gordon, and Rob Knight. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326(5960) :1694–1697, 2009.
- [151] Elizabeth A Grice, Heidi H Kong, Gabriel Renaud, Alice C Young, Gerard G Bouffard, Robert W Blakesley, Tyra G Wolfsberg, Maria L Turner, and Julia A Segre. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome research*, 18(7) :1043–1050, 2008.
- [152] Noah Fierer, Christian L Lauber, Nick Zhou, Daniel McDonald, Elizabeth K Costello, and Rob Knight. Forensic identification using skin bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14) :6477–6481, 2010.
- [153] Alexander J Probst, Anna K Auerbach, and Christine Moissl-Eichinger. Archaea on human skin. *PloS one*, 8(6) :e65388, 2013.
- [154] Marc Mußmann, Ivana Brito, Angela Pitcher, Jaap S Sinninghe Damsté, Roland Hatzenpichler, Andreas Richter, Jeppe L Nielsen, Per Halkjær Nielsen, Anneliese Müller, Holger Daims, et al. Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40) :16771–16776, 2011.
- [155] Laura A Sauder, Francien Peterse, Stefan Schouten, and Josh D Neufeld. Low-ammonia niche of ammonia-oxidizing archaea in rotating biological contactors of a municipal wastewater treatment plant. *Environmental microbiology*, 14(9) :2589–2600, 2012.
- [156] Negash Belay, Biswarup Mukhopadhyay, Everly Conway De Macario, R Galask, and Lacy Daniels. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *Journal of clinical microbiology*, 28(7) :1666–1668, 1990.
- [157] Andreas Sundquist, Saharnaz Bigdeli, Roxana Jalili, Maurice L Druzin, Sarah Waller, Kristin M Pullen, Yasser Y El-Sayed, M Mark Taslimi, Serafim Batzoglou, and Mostafa Ronaghi. Bacterial flora-typing with targeted, chip-based pyrosequencing. *BMC microbiology*, 7(1) :108, 2007.
- [158] Gregory J Caporaso, Christian L Lauber, Elizabeth K Costello, Donna Berg-Lyons, Antonio Gonzalez, Jesse Stombaugh, Dan Knights, Pawel Gajer, Jacques Ravel, Noah Fierer, et al. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol*, 12(5) :R50, 2011.

- [159] Jiri Hulcr, Nina R Rountree, Sarah E Diamond, Lukasz L Stelinski, N Fierer, and Robert R Dunn. Mycangia of ambrosia beetles host communities of bacteria. *Microbial ecology*, 64(3) :784–793, 2012.
- [160] Amélie Bringuier, Saber Khelaifia, Hervé Richet, Gérard Aboudharam, and Michel Drancourt. Real-time pcr quantification of *Methanobrevibacter oralis* in periodontitis. *Journal of clinical microbiology*, 51(3) :993–994, 2013.
- [161] Tung Nguyen-Hieu, Saber Khelaifia, Gerard Aboudharam, and Michel Drancourt. Methanogenic archaea in subgingival sites : a review. *Apmis*, 121(6) :467–477, 2013.
- [162] Hans-Peter Horz, Ilse Seyfarth, and Georg Conrads. Mcra and 16s rrna gene analysis suggests a novel lineage of archaea phylogenetically affiliated with *Thermoplasmatales* in human subgingival plaque. *Anaerobe*, 18(3) :373–377, 2012.
- [163] Stig Bengmark. Ecological control of the gastrointestinal tract. the role of probiotic flora. *Gut*, 42(1) :2–7, 1998.
- [164] William B Whitman, David C Coleman, and William J Wiebe. Prokaryotes : the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12) :6578–6583, 1998.
- [165] Daniel N Frank, Allison L St Amand, Robert A Feldman, Edgar C Boedeker, Noam Harpaz, and Norman R Pace. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34) :13780–13785, 2007.
- [166] Ann M O’Hara and Fergus Shanahan. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7) :688–693, 2006.
- [167] Alexander Swidsinski, Jutta Weber, Vera Loening-Baucke, Laura P Hale, and Herbert Lochs. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of clinical microbiology*, 43(7) :3380–3389, 2005.
- [168] Josef Neu and Jona Rushing. Cesarean versus vaginal delivery : long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clinics in perinatology*, 38(2) :321–331, 2011.
- [169] Christine F Favier, Elaine E Vaughan, Willem M De Vos, and Antoon DL Akkermans. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1) :219–226, 2002.
- [170] John Penders, Carel Thijs, Cornelis Vink, Foekje F Stelma, Bianca Snijders, Ischa Kummeling, Piet A van den Brandt, and Ellen E Stobberingh. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2) :511–521, 2006.
- [171] Pamela L Stark and A Lee. The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2) :189–203, 1982.

- [172] Yoshimi Benno, Ken Sawada, and Tomotari Mitsuoka. The intestinal microflora of infants. *Microbiology and immunology*, 28(9) :975–986, 1984.
- [173] Federica Guaraldi and Guglielmo Salvatori. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 2012.
- [174] Chana Palmer, Elisabeth M Bik, Daniel B DiGiulio, David A Relman, and Patrick O Brown. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(7) :e177, 2007.
- [175] Roderick I Mackie, Abdelghani Sghir, and H Rex Gaskins. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5) :1035S–1045S, 1999.
- [176] R Mändar and M Mikelsaar. Transmission of mother’s microflora to the newborn at birth. *Neonatology*, 69(1) :30–35, 1996.
- [177] Zhenjiang Xu and Rob Knight. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *British Journal of Nutrition*, 113(S1) :S1–S5, 2015.
- [178] Cecilia Jernberg, Sonja Löfmark, Charlotta Edlund, and Janet K Jansson. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal*, 1(1) :56–66, 2007.
- [179] Les Dethlefsen, Sue Huse, Mitchell L Sogin, and David A Relman. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep *16S rRNA* sequencing. *PLoS Biol*, 6(11) :e280, 2008.
- [180] Andrew L Goodman, Nathan P McNulty, Yue Zhao, Douglas Leip, Robi D Mitra, Catherine A Lozupone, Rob Knight, and Jeffrey I Gordon. Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat. *Cell host & microbe*, 6(3) :279–289, 2009.
- [181] Peter J Turnbaugh, Fredrik Bäckhed, Lucinda Fulton, and Jeffrey I Gordon. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe*, 3(4) :213–223, 2008.
- [182] Siegfried Ussar, Nicholas W Griffin, Olivier Bezy, Shiho Fujisaka, Sara Vienberg, Samir Softic, Luxue Deng, Lynn Bry, Jeffrey I Gordon, and C Ronald Kahn. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell metabolism*, 22(3) :516–530, 2015.
- [183] Inna Sekirov, Shannon L Russell, L Caetano M Antunes, and B Brett Finlay. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3) :859–904, 2010.
- [184] Seth Rakoff-Nahoum and R Medzhitov. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal immunology*, 1 :S10–S14, 2008.

- [185] Sarkis K Mazmanian, Cui Hua Liu, Arthur O Tzianabos, and Dennis L Kasper. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1) :107–118, 2005.
- [186] Ivaylo I Ivanov, Rosa de Llanos Frutos, Nicolas Manel, Keiji Yoshinaga, Daniel B Rifkin, R Balfour Sartor, B Brett Finlay, and Dan R Littman. Specific microbiota direct the differentiation of il-17-producing t-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe*, 4(4) :337–349, 2008.
- [187] Malin EV Johansson, Mia Phillipson, Joel Petersson, Anna Velcich, Lena Holm, and Gunnar C Hansson. The inner of the two muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(39) :15064–15069, 2008.
- [188] Jennifer M Bates, Janie Akerlund, Erika Mittge, and Karen Guillemin. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell host & microbe*, 2(6) :371–382, 2007.
- [189] Bruce Beutler, K Hoebe, X Du, and RJ Ulevitch. How we detect microbes and respond to them : the toll-like receptors and their transducers. *Journal of leukocyte biology*, 74(4) :479–485, 2003.
- [190] Andrew J Macpherson and Nicola L Harris. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6) :478–485, 2004.
- [191] Masayuki Tsuji, Keiichiro Suzuki, Hiroshi Kitamura, Mikako Maruya, Kazuo Kinoshita, Ivaylo I Ivanov, Kikuji Itoh, Dan R Littman, and Sidonia Fagarasan. Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and t cell-independent immunoglobulin a generation in the gut. *Immunity*, 29(2) :261–271, 2008.
- [192] Annick Bernalier-Donadille. Fermentative metabolism by the human gut microbiota. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 34 :S16–S22, 2010.
- [193] Mirjana Rajilić-Stojanović, Hans GHJ Heilig, Sebastian Tims, Erwin G Zoetendal, and Willem M Vos. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environmental microbiology*, 15(4) :1146–1159, 2013.
- [194] Nobuhiko Kamada, Sang-Uk Seo, Grace Y Chen, and Gabriel Núñez. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(5) :321–335, 2013.
- [195] Nita H Salzman, Mark A Underwood, and Charles L Bevins. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota : a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. In *Seminars in immunology*, volume 19, pages 70–83. Elsevier, 2007.
- [196] Lora V Hooper. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews Microbiology*, 7(5) :367–374, 2009.

- [197] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting and World Health Organization. *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, volume 74. Food & Agriculture Org., 2001.
- [198] Sinéad C Corr, Yin Li, Christian U Riedel, Paul W O'Toole, Colin Hill, and Cormac GM Gahan. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18) :7617–7621, 2007.
- [199] Maira J Medellin-Pena and Mansel W Griffiths. Effect of molecules secreted by lactobacillus acidophilus strain la-5 on escherichia coli o157 : H7 colonization. *Applied and environmental microbiology*, 75(4) :1165–1172, 2009.
- [200] H-L Alakomi, E Skyttä, M Saarela, T Mattila-Sandholm, K Latva-Kala, and IM Helander. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5) :2001–2005, 2000.
- [201] George T Macfarlane and Sandra Macfarlane. Human colonic microbiota : ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian Journal of Gastroenterology-Supplements*, 32(222) :3–9, 1997.
- [202] Carlett Ramirez-Farias, Kathleen Slezak, Zoë Fuller, Alan Duncan, Grietje Holtrop, and Petra Louis. Effect of inulin on the human gut microbiota : stimulation of bifidobacterium adolescentis and faecalibacterium prausnitzii. *British Journal of Nutrition*, 101(04) :541–550, 2009.
- [203] Takatoshi Sakamoto, Tomohisa Hasunuma, Yoshimi Hori, Ryosuke Yamada, and Akihiko Kondo. Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing saccharomyces cerevisiae cells. *Journal of biotechnology*, 158(4) :203–210, 2012.
- [204] Sandra Macfarlane and George T Macfarlane. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(01) :67–72, 2003.
- [205] Karen Windey, Vicky De Preter, and Kristin Verbeke. Relevance of protein fermentation to gut health. *Molecular nutrition & food research*, 56(1) :184–196, 2012.
- [206] M Rye Clausen and PB Mortensen. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut*, 37(5) :684–689, 1995.
- [207] Shomik Sengupta, Jane G Muir, and Peter R Gibson. Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(1) :209–218, 2006.
- [208] AUBE Anne-Catherine, Christine CHERBUT, and Jean Paul GALMICHE. Acides gras à chaîne courte : rôle en pathogénie intestinale et potentiel thérapeutique en gastroentérologie. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive*, 2(5) :447–55, 1995.

- [209] Shomik Sengupta, Joe J Tjandra, and Peter R Gibson. Dietary fiber and colorectal neoplasia. *Diseases of the colon & rectum*, 44(7) :1016–1033, 2001.
- [210] HN Englyst, S Hay, and George T Macfarlane. Polysaccharide breakdown by mixed populations of human faecal bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 45(3) :163–171, 1987.
- [211] SI Cook and JH Sellin. Review article : short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 12(6) :499–507, 1998.
- [212] C Rémésy, C Demigne, and C Morand. Metabolism and utilisation of short chain fatty acids produced by colonic fermentation. In *Dietary Fibre A component of food*, pages 137–150. Springer, 1992.
- [213] Elham Hosseini, Charlotte Grootaert, Willy Verstraete, and Tom Van de Wiele. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutrition Reviews*, 69(5) :245–258, 2011.
- [214] Christopher S Reigstad and Purna C Kashyap. Beyond phylotyping : understanding the impact of gut microbiota on host biology. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(5) :358–372, 2013.
- [215] Elizabeth Anne Smith and George T Macfarlane. Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3(5) :327–337, 1997.
- [216] Fredrik Bäckhed, Hao Ding, Ting Wang, Lora V Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F Semenkovich, and Jeffrey I Gordon. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44) :15718–15723, 2004.
- [217] Michael A Mahowald, Federico E Rey, Henning Seedorf, Peter J Turnbaugh, Robert S Fulton, Aye Wollam, Neha Shah, Chunyan Wang, Vincent Magrini, Richard K Wilson, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14) :5859–5864, 2009.
- [218] MJ Hill. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 6(2) :S43–S45, 1997.
- [219] Hamid M Said and Zainab M Mohammed. Intestinal absorption of water-soluble vitamins : an update. *Current opinion in gastroenterology*, 22(2) :140–146, 2006.
- [220] Joline WJ Beulens, Sarah L Booth, Ellen GHM van den Heuvel, Elisabeth Stoecklin, Athanasia Baka, and Cees Vermeer. The role of menaquinones (vitamin k 2) in human health. *British Journal of Nutrition*, 110(08) :1357–1368, 2013.
- [221] Hiroko NODA, Noriko AKASAKA, and Masahiro OHSUGI. Biotin production by bifidobacteria. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 40(2) :181–188, 1994.

- [222] Anna Pompei, Lisa Cordisco, Alberto Amaretti, Simona Zanoni, Diego Matteuzzi, and Maddalena Rossi. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and environmental microbiology*, 73(1) :179–185, 2007.
- [223] H König. Archaeobacterial cell envelopes. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(4) :395–406, 1988.
- [224] Corinna Bang, Claudia Ehlers, Alvaro Orell, Daniela Prasse, Marlene Spinner, Stanislav N Gorb, Sonja-Verena Albers, and Ruth A Schmitz. Biofilm formation of mucosa-associated methanoarchaeal strains. *Frontiers in microbiology*, 5, 2014.
- [225] Hans-Peter Horz and Georg Conrads. Methanogenic archaea and oral infections ? ways to unravel the black box. *Journal of oral microbiology*, 3, 2011.
- [226] T Lurfai Miller, MJ Wolin, E Conway de Macario, and AJ Macario. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(1) : 227–232, 1982.
- [227] Terry L Miller and Meyer J Wolin. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov. : a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of microbiology*, 141(2) :116–122, 1985.
- [228] Bedis Dridi, Mireille Henry, Amel El Khechine, Didier Raoult, Michel Drancourt, et al. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved dna detection protocol. *PloS one*, 4(9) :e7063–e7063, 2009.
- [229] Noriko Nakamura, Henry C Lin, Christopher S McSweeney, Roderick I Mackie, and H Rex Gaskins. Mechanisms of microbial hydrogen disposal in the human colon and implications for health and disease. *Food Science and Technology*, 1, 2010.
- [230] Buck S Samuel and Jeffrey I Gordon. A humanized gnotobiotic mouse model of host–archaeal–bacterial mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26) : 10011–10016, 2006.
- [231] Buck S Samuel, Elizabeth E Hansen, Jill K Manchester, Pedro M Coutinho, Bernard Henrissat, Robert Fulton, Philippe Latreille, Kung Kim, Richard K Wilson, and Jeffrey I Gordon. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25) :10643–10648, 2007.
- [232] Mor N Lurie-Weinberger, Michael Peeri, and Uri Gophna. Contribution of lateral gene transfer to the gene repertoire of a gut-adapted methanogen. *Genomics*, 99(1) :52–58, 2012.
- [233] Pauline D Scanlan, Fergus Shanahan, and Julian R Marchesi. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcra gene analysis. *BMC microbiology*, 8(1) :79, 2008.

- [234] Bédís Dridi, Mireille Henry, Hervé Richet, Didier Raoult, and Michel Drancourt. Age-related prevalence of *Methanomassiliicoccus luminyensis* in the human gut microbiome. *Apmis*, 120(10) :773–777, 2012.
- [235] Pauline Pitt, KM De Bruijn, MF Beeching, E Goldberg, and LM Blendis. Studies on breath methane : the effect of ethnic origins and lactulose. *Gut*, 21(11) :951–954, 1980.
- [236] I Segal, AR Walker, S Lord, and JH Cummings. Breath methane and large bowel cancer risk in contrasting african populations. *Gut*, 29(5) :608–613, 1988.
- [237] Michael D Levitt, Julie K Furne, Michael Kuskowski, and John Ruddy. Stability of human methanogenic flora over 35 years and a review of insights obtained from breath methane measurements. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(2) :123–129, 2006.
- [238] G Hoff, A Foerster, MH Vatn, J Sauar, and S Larsen. Epidemiology of polyps in the rectum and colon : recovery and evaluation of unresected polyps 2 years after detection. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 21(7) :853–862, 1986.
- [239] Josep M Piqué, Miquel Pallarés, Eulalia Cusó, Josep Vilar-Bonet, and Miquel A Gassull. Methane production and colon cancer. *Gastroenterology*, 87(3) :601–605, 1984.
- [240] MJ Hudson, AM Tomkins, HS Wiggins, and BS Drasar. Breath methane excretion and intestinal methanogenesis in children and adults in rural nigeria. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 28(11) :993–998, 1993.
- [241] S Fanaro, R Chierici, P Guerrini, and V Vigi. Intestinal microflora in early infancy : composition and development. *Acta paediatrica*, 92(s441) :48–55, 2003.
- [242] Tianan Jiang, Fabrízis L Suarez, Michael D Levitt, Steven E Nelson, and Ekhard E Ziegler. Gas production by feces of infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 32(5) :534–541, 2001.
- [243] Herbert Haines. Black radicalization and the funding of civil rights. *Social Problems*, 32(1) :31–43, 1984.
- [244] Jay A Perman and Siv Modler. Glycoproteins as substrates for production of hydrogen and methane by colonic bacterial flora. *Gastroenterology*, 83(2) :388–393, 1982.
- [245] Caroline L Willis, John H Cummings, Graham Neale, and Glenn R Gibson. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Current microbiology*, 35(5) :294–298, 1997.
- [246] Gerardo M Nava, Franck Carbonero, Jennifer A Croix, Eugene Greenberg, and H Rex Gaskins. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *The ISME journal*, 6(1) :57–70, 2012.
- [247] Philippe Pochart, Florence Lémann, Bernard Flourié, Pierre Pellier, Isabelle Goderel, and Jean-Claude Rambaud. Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology*, 105(5) :1281–1285, 1993.



- [248] TH Florin and HJ Woods. Inhibition of methanogenesis by human bile. *Gut*, 37(3) : 418–421, 1995.
- [249] Antonella Pellicoro and Klaas Nico Faber. Review article : The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(s2) :149–160, 2007.
- [250] D Cloarec, F Bornet, S Gouilloud, J Ll Barry, B Salim, and JP Galmiche. Breath hydrogen response to lactulose in healthy subjects : relationship to methane producing status. *Gut*, 31(3) :300–304, 1990.
- [251] Alison M Stephen, HS Wiggins, HN Englyst, TJ Cole, BJ Wayman, and JH Cummings. The effect of age, sex and level of intake of dietary fibre from wheat on large-bowel function in thirty healthy subjects. *British Journal of Nutrition*, 56(02) :349–361, 1986.
- [252] Mark Pimentel, Henry C Lin, Pedram Enayati, Brian van den Burg, Hyo-Rang Lee, Jin H Chen, Sandy Park, Yuthana Kong, and Jeffrey Conklin. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(6) :G1089–G1095, 2006.
- [253] Stephen Lewis and Séan Cochrane. Alteration of sulfate and hydrogen metabolism in the human colon by changing intestinal transit rate. *The American journal of gastroenterology*, 102(3) :624–633, 2007.
- [254] Konstantinos Triantafyllou, Christopher Chang, and Mark Pimentel. Methanogens, methane and gastrointestinal motility. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 20(1) :31, 2014.
- [255] A Rutili, E Canzi, T Brusa, and A Ferrari. Intestinal methanogenic bacteria in children of different ages. *The new microbiologica*, 19(3) :227–243, 1996.
- [256] Carlos López-Otín, Maria A Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6) :1194–1217, 2013.
- [257] RJ Shern, PC Fox, and SH Li. Influence of age on the secretory rates of the human minor salivary glands and whole saliva. *Archives of oral biology*, 38(9) :755–761, 1993.
- [258] Elena Biagi, Marco Candela, Claudio Franceschi, and Patrizia Brigidi. The aging gut microbiota : new perspectives. *Ageing research reviews*, 10(4) :428–429, 2011.
- [259] Olle Ekberg and Michael J Feinberg. Altered swallowing function in elderly patients without dysphagia : radiologic findings in 56 cases. *AJR. American journal of roentgenology*, 156(6) :1181–1184, 1991.
- [260] K Bitar, Greenwood-Van Meerveld, R Saad, JW Wiley, et al. Aging and gastrointestinal neuromuscular function : insights from within and outside the gut. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(6) :490–501, 2011.

- [261] LB Lovat. Age related changes in gut physiology and nutritional status. *Gut*, 38(3) : 306–309, 1996.
- [262] Christopher K Rayner and Michael Horowitz. Physiology of the ageing gut. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 16(1) :33–38, 2013.
- [263] Satish SC Rao and Jorge T Go. Update on the management of constipation in the elderly : new treatment options. *Clinical interventions in aging*, 5 :163, 2010.
- [264] Michael Camilleri, Joon Seong Lee, Blanca Viramontes, Adil E Bharucha, and Eric G Tangalos. Insights into the pathophysiology and mechanisms of constipation, irritable bowel syndrome, and diverticulosis in older people. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(9) :1142–1150, 2000.
- [265] Elena Biagi, Lotta Nylund, Marco Candela, Rita Ostan, Laura Bucci, Elisa Pini, Janne Nikkila, Daniela Monti, Reetta Satokari, Claudio Franceschi, et al. Through ageing, and beyond : gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS one*, 5(5) :e10667, 2010.
- [266] Marcus J Claesson, Ian B Jeffery, Susana Conde, Susan E Power, Eibhlís M O’Connor, Siobhán Cusack, Hugh MB Harris, Mairead Coakley, Bhuvaneswari Lakshminarayanan, Orla O’Sullivan, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410) :178–184, 2012.
- [267] Emma J Woodmansey, Marion ET McMurdo, George T Macfarlane, and Sandra Macfarlane. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Applied and environmental microbiology*, 70(10) :6113–6122, 2004.
- [268] Harri Mäkituokko, Kirsti Tiihonen, Soile Tynkkynen, Lars Paulin, and Nina Rautonen. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *British journal of nutrition*, 103(2) :227, 2010.
- [269] Mirjana Rajilić-Stojanović, Hans GHJ Heilig, Douwe Molenaar, Kajsa Kajander, Anu Surakka, Hauke Smidt, and Willem M De Vos. 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. *Environmental microbiology*, 11(7) :1736–1751, 2009.
- [270] Ian B Jeffery, Denise B Lynch, and Paul W O’Toole. Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME journal*, 2015.
- [271] Marcus J Claesson, Siobhán Cusack, Orla O’Sullivan, Rachel Greene-Diniz, Heleen de Weerd, Edel Flannery, Julian R Marchesi, Daniel Falush, Timothy Dinan, Gerald Fitzgerald, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1) :4586–4591, 2011.

- [272] Corinna Bang, Anke Schilhabel, Katrin Weidenbach, Annika Kopp, Torsten Goldmann, Thomas Gutschmann, and Ruth A Schmitz. Effects of antimicrobial peptides on methanogenic archaea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(8) :4123–4130, 2012.
- [273] Pascale Blais Lecours, Caroline Duchaine, Michel Taillefer, Claudine Tremblay, Marc Veillette, Yvon Cormier, and David Marsolais. Immunogenic properties of archaeal species found in bioaerosols. *PLoS one*, 6(8) :e23326, 2011.
- [274] Corinna Bang and Ruth A Schmitz. Archaea associated with human surfaces : not to be underestimated. *FEMS microbiology reviews*, page fuv010, 2015.
- [275] Hideo Kataoka, Motoaki Yasuda, Mitsuhiro Iyori, Kazuto Kiura, Mitsuo Narita, Takashi Nakata, and Ken-ichiro Shibata. Roles of n-linked glycans in the recognition of microbial lipopeptides and lipoproteins by tlr2. *Cellular microbiology*, 8(7) :1199–1209, 2006.
- [276] Jayalakshmi Krishnan, Kumar Selvarajoo, Masa Tsuchiya, Gwang Lee, and Sangdun Choi. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and molecular medicine*, 39(4) : 421–438, 2007.
- [277] Girishchandra B Patel, Hongyan Zhou, Amalia Ponce, and Wangxue Chen. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine*, 25(51) :8622–8636, 2007.
- [278] Lakshmi Krishnan and G Dennis Sprott. Archaeosome adjuvants : immunological capabilities and mechanism (s) of action. *Vaccine*, 26(17) :2043–2055, 2008.
- [279] Pascale Blais Lecours, David Marsolais, Yvon Cormier, Marie Berberi, Chantal Haché, Raymond Bourdages, and Caroline Duchaine. Increased prevalence of *Methanospiraeta stadtmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS one*, 9(2), 2014.
- [280] Chaoyuan Chen, Andrea Gault, Lijing Shen, and Nasrin Nabavi. Molecular cloning and expression of early t cell costimulatory molecule-1 and its characterization as b7-2 molecule. *The Journal of Immunology*, 152(10) :4929–4936, 1994.
- [281] Shigehiro Yanagihara, Emiko Komura, Jun Nagafune, Hiroshi Watarai, and Yasunori Yamaguchi. Ebi1/ccr7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *The Journal of Immunology*, 161(6) :3096–3102, 1998.
- [282] ACR Tanner, C Haffer, GT Bratthall, RA Visconti, and SS Socransky. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of clinical periodontology*, 6(5) :278–307, 1979.
- [283] George Hajishengallis, Shuang Liang, Mark A Payne, Ahmed Hashim, Ravi Jotwani, Mehmet A Eskan, Megan L McIntosh, Asil Alsam, Keith L Kirkwood, John D Lambris, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell host & microbe*, 10(5) :497–506, 2011.

- [284] George Hajishengallis and Richard J Lamont. Beyond the red complex and into more complexity : the polymicrobial synergy and dysbiosis (psd) model of periodontal disease etiology. *Molecular oral microbiology*, 27(6) :409–419, 2012.
- [285] Kokoro Yamabe, Hiroshi Maeda, Susumu Kokeguchi, Ichiro Tanimoto, Norihiro Sonoi, Susumu Asakawa, and Shogo Takashiba. Distribution of archaea in japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. *FEMS microbiology letters*, 287(1) :69–75, 2008.
- [286] ME Vianna, S Holtgraewe, I Seyfarth, G Conrads, and HP Horz. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *Journal of bacteriology*, 190(10) :3779–3785, 2008.
- [287] Flavia Matarazzo, Adriana Costa Ribeiro, Magda Feres, Marcelo Favari, and Marcia Pinto Alves Mayer. Diversity and quantitative analysis of archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *Journal of clinical periodontology*, 38(7) : 621–627, 2011.
- [288] JM Mansfield, JH Campbell, AR Bhandari, AM Jesionowski, and MM Vickerman. Molecular analysis of 16s rRNA genes identifies potentially periodontal pathogenic bacteria and archaea in the plaque of partially erupted third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 70(7) :1507–1514, 2012.
- [289] Negash Belay, R Johnson, BS Rajagopal, E Conway De Macario, and L Daniels. Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Applied and environmental microbiology*, 54(2) :600–603, 1988.
- [290] Eva M Kulik, Heinrich Sandmeier, Karin Hinni, and Jürg Meyer. Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. *FEMS microbiology letters*, 196(2) :129–133, 2001.
- [291] Michele Robichaux, Monroe Howell, and Ramaraj Boopathy. Methanogenic activity in human periodontal pocket. *Current microbiology*, 46(1) :0053–0058, 2003.
- [292] Chao Lun Li, Yun Tao Jiang, JieLei Qian, Jing Ping Liang, Rong Shu, et al. Prevalence and quantification of the uncommon archaea phylotype *Thermoplasmata* in chronic periodontitis. *Archives of oral biology*, 59(8) :822–828, 2014.
- [293] P Mark Bartold and Thomas E Van Dyke. Periodontitis : a host-mediated disruption of microbial homeostasis. unlearning learned concepts. *Periodontology 2000*, 62(1) :203–217, 2013.
- [294] Paul W Lepp, Mary M Brinig, Cleber C Ouverney, Katherine Palm, Gary C Armitage, and David A Relman. Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16) :6176–6181, 2004.

- [295] E Barrie Kenney and Major M Ash Jr. Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. *Journal of periodontology*, 40(11) :630, 1969.
- [296] Bernhard Schink. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2) :262–280, 1997.
- [297] Husen Zhang, John K DiBaise, Andrea Zuccolo, Dave Kudrna, Michele Braidotti, Yeisoo Yu, Prathap Parameswaran, Michael D Crowell, Rod Wing, Bruce E Rittmann, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7) :2365–2370, 2009.
- [298] Lora V Hooper, Tore Midtvedt, and Jeffrey I Gordon. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, 22(1) :283–307, 2002.
- [299] Fabrice Armougom, Mireille Henry, Bernard Vialettes, Denis Raccach, Didier Raoult, et al. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PloS one*, 4(9) :e7125, 2009.
- [300] Mark Pimentel, Andrew G Mayer, Sandy Park, Evelyn J Chow, Aliya Hasan, and Yuthana Kong. Methane production during lactulose breath test is associated with gastrointestinal disease presentation. *Digestive diseases and sciences*, 48(1) :86–92, 2003.
- [301] M Million, E Angelakis, M Maraninchi, M Henry, R Giorgi, R Valero, B Vialettes, and Didier Raoult. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *International journal of obesity*, 37(11) :1460–1466, 2013.
- [302] Andreas Schwartz, David Taras, Klaus Schäfer, Silvia Beijer, Nicolaas A Bos, Christiane Donus, and Philip D Hardt. Microbiota and scfa in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1) :190–195, 2010.
- [303] Andrew Haines, Jang Dilawari, Geoffrey Metz, Laurence Blendis, and Hugh Wiggins. Breath-methane in patients with cancer of the large bowel. *The Lancet*, 310(8036) :481–483, 1977.
- [304] David A Karlin, RD Jones, John R Stroehlein, Anthony J Mastromarino, and Gregory D Potter. Breath methane excretion in patients with unresected colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 69(3) :573–576, 1982.
- [305] H Kashtan, M Rabau, Y Peled, A Milstein, and T Wiznitzer. Methane production in patients with colorectal carcinoma. *Israel journal of medical sciences*, 25(11) :614–616, 1989.
- [306] Ara B Sahakian, Sam-Ryong Jee, and Mark Pimentel. Methane and the gastrointestinal tract. *Digestive diseases and sciences*, 55(8) :2135–2143, 2010.

- [307] Arbab Sikander, Satya Vati Rana, Saroj Kant Sinha, Kaushal Kishor Prasad, Sunil K Arora, Sanjeev Kumar Sharma, and Kartar Singh. Serotonin transporter promoter variant : Analysis in indian ibs patients and control population. *Journal of clinical gastroenterology*, 43(10) :957–961, 2009.
- [308] Edith Bülbring and A Crema. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 13(4) :444–457, 1958.
- [309] A Ragnar Hede, Lennart Andersson, and Claes Post. Effect of a homologous series of halogenated methanes on pulmonary uptake of 5–hydroxytryptamine in isolated perfused rat lung. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 57(4) :291–296, 1985.
- [310] Purna C Kashyap, Angela Marcobal, Luke K Ursell, Samuel A Smits, Erica D Sonnenburg, Elizabeth K Costello, Steven K Higginbottom, Steven E Domino, Susan P Holmes, David A Relman, et al. Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42) :17059–17064, 2013.
- [311] Aurore Gorlas, Catherine Robert, Gregory Gimenez, Michel Drancourt, and Didier Raoult. Complete genome sequence of *Methanomassiliicoccus luminyensis*, the largest genome of a human-associated archaea species. *Journal of bacteriology*, 194(17) :4745–4745, 2012.
- [312] Julia K Goodrich, Jillian L Waters, Angela C Poole, Jessica L Sutter, Omry Koren, Ran Blekhman, Michelle Beaumont, William Van Treuren, Rob Knight, Jordana T Bell, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4) :789–799, 2014.
- [313] Junhee Seok, H Shaw Warren, Alex G Cuenca, Michael N Mindrinos, Henry V Baker, Weihong Xu, Daniel R Richards, Grace P McDonald-Smith, Hong Gao, Laura Hennessy, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9) :3507–3512, 2013.
- [314] Sonja Vanderhaeghen, Christophe Lacroix, and Clarissa Schwab. Methanogen communities in stool of humans of different age and health status and co-occurrence with bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, page fnv092, 2015.
- [315] Nicholas A Bokulich, Sathish Subramanian, Jeremiah J Faith, Dirk Gevers, Jeffrey I Gordon, Rob Knight, David A Mills, and J Gregory Caporaso. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1) : 57–59, 2013.
- [316] James J Kozich, Sarah L Westcott, Nielson T Baxter, Sarah K Highlander, and Patrick D Schloss. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17) :5112–5120, 2013.

- [317] James R Cole, Qiong Wang, E Cardenas, J Fish, Benli Chai, Ryan J Farris, AS Kulam-Syed-Mohideen, Donna M McGarrell, T Marsh, George M Garrity, et al. The ribosomal database project : improved alignments and new tools for rna analysis. *Nucleic acids research*, 37(suppl 1) :D141–D145, 2009.
- [318] Daniel McDonald, Morgan N Price, Julia Goodrich, Eric P Nawrocki, Todd Z DeSantis, Alexander Probst, Gary L Andersen, Rob Knight, and Philip Hugenholtz. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, 6(3) :610–618, 2012.
- [319] Morgan GI Langille, Jesse Zaneveld, J Gregory Caporaso, Daniel McDonald, Dan Knights, Joshua A Reyes, Jose C Clemente, Deron E Burkepile, Rebecca L Vega Thurber, Rob Knight, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16s rna marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9) :814–821, 2013.
- [320] Ross Ihaka and Robert Gentleman. R : a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, 5(3) :299–314, 1996.
- [321] Catherine A Lozupone, Micah Hamady, Scott T Kelley, and Rob Knight. Quantitative and qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 73(5) :1576–1585, 2007.
- [322] Yoav Benjamini and Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, pages 289–300, 1995.
- [323] David Feria-Gervasio, William Tottey, Nadia Gaci, Monique Alric, Jean-Michel Cardot, Pierre Peyret, Jean-François Martin, Estelle Pujos, Jean-Louis Sébédio, and Jean-François Brugère. Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobia to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *Journal of microbiological methods*, 96 :111–118, 2014.
- [324] Ruchi Mathur, Gene Kim, Walter Morales, Jaekyu Sung, Emily Rooks, Venkata Pokkunuri, Stacy Weitsman, Gillian M Barlow, Christopher Chang, and Mark Pimentel. Intestinal *Methanobrevibacter smithii* but not total bacteria is related to diet-induced weight gain in rats. *Obesity*, 21(4) :748–754, 2013.
- [325] Amanda N Payne, Annina Zihler, Christophe Chassard, and Christophe Lacroix. Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in biotechnology*, 30(1) :17–25, 2012.
- [326] Amanda N Payne, Christophe Chassard, Yannick Banz, and Christophe Lacroix. The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an *in vitro* model of colonic fermentation. *FEMS microbiology ecology*, 80(3) :608–623, 2012.

- [327] Aurélie Guerra, Lucie Etienne-Mesmin, Valérie Livrelli, Sylvain Denis, Stéphanie Blanquet-Diot, and Monique Alric. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11) :591–600, 2012.
- [328] Koen Venema and Pieter Van den Abbeele. Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1) :115–126, 2013.
- [329] George T Macfarlane, S Macfarlane, and GR Gibson. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35(2) :180–187, 1998.
- [330] AJ McBain and George T Macfarlane. Investigations of bifidobacterial ecology and oligosaccharide metabolism in a three-stage compound continuous culture system. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, 222 :32–40, 1996.
- [331] Jan L Madsen and Jesper Graff. Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age and ageing*, 33(2) :154–159, 2004.
- [332] Ashok Attaluri, Michelle Jackson, Jessica Valestin, and Satish SC Rao. Methanogenic flora is associated with altered colonic transit but not stool characteristics in constipation without ibs. *The American journal of gastroenterology*, 105(6) :1407–1411, 2010.
- [333] Manimozhiyan Arumugam, Jeroen Raes, Eric Pelletier, Denis Le Paslier, Takuji Yamada, Daniel R Mende, Gabriel R Fernandes, Julien Tap, Thomas Bruls, Jean-Michel Batto, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 473(7346) :174–180, 2011.
- [334] Anastasia V Shindyapina, Igor V Petrunia, Tatiana V Komarova, Ekaterina V Sheshukova, Vyacheslav S Kosorukov, Gleb I Kiryanov, and Yuri L Dorokhov. Dietary methanol regulates human gene activity. 2014.
- [335] PJ Daas, KA Gerrits, JT Keltjens, C Van der Drift, and GD Vogels. Involvement of an activation protein in the methanol : 2-mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase reaction in *Methanosarcina barkeri*. *Journal of bacteriology*, 175(5) :1278–1283, 1993.
- [336] Roy J Siragusa, James J Cerda, MM Baig, CW Burgin, and FL Robbins. Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 47(5) :848–851, 1988.
- [337] Alex Guenther, C Nicholas Hewitt, David Erickson, Ray Fall, Chris Geron, Tom Graedel, Peter Harley, Lee Klinger, Manuel Lerdau, WA McKay, et al. A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research : Atmospheres (1984–2012)*, 100(D5) :8873–8892, 1995.
- [338] Mark A Kostic and Richard C Dart. Rethinking the toxic methanol level. *Journal of Toxicology : Clinical Toxicology*, 41(6) :793–800, 2003.
- [339] Oluf Røe and Paul Enoksson. Species differences in methanol poisoning. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 10(4) :275–286, 1982.



- [340] Kenneth E McMartin, John J Ambre, and Thomas R Tephly. Methanol poisoning in human subjects : role for formic acid accumulation in the metabolic acidosis. *The American journal of medicine*, 68(3) :414–418, 1980.
- [341] Woodrow C Monte. Aspartame : methanol and the public health. 1984.
- [342] JBS Braverman and A Lifshitz. Pectin hydrolysis in certain fruits during alcoholic fermentation. *Food Technology*, 11(7) :356–358, 1957.
- [343] James G Ferry. Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1) :13–38, 1999.
- [344] BR Sharak Genthner and MP Bryant. Additional characteristics of one-carbon-compound utilization by *Eubacterium limosum* and *Acetobacterium woodii*. *Applied and environmental microbiology*, 53(3) :471–476, 1987.
- [345] O Lawaetz, AM Blackburn, SR Bloom, Y Aritas, and DNL Ralphs. Effect of pectin on gastric emptying and gut hormone release in the dumping syndrome. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 18(3) :327–336, 1983.
- [346] Lisa Brown, Bernard Rosner, Walter W Willett, and Frank M Sacks. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber : a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 69(1) : 30–42, 1999.
- [347] Golam H Rabbani, Telahun Teka, Badiuz Zaman, N Majid, Makhduma Khatun, and George J Fuchs. Clinical studies in persistent diarrhea : dietary management with green banana or pectin in bangladeshi children. *Gastroenterology*, 121(3) :554–560, 2001.
- [348] David JA Jenkins, Anthony R Leeds, Miguel A Gassull, Bernard Cochet, and K GEORGE MM ALBERTI. Decrease in postprandial insulin and glucose concentrations by guar and pectin. *Annals of internal Medicine*, 86(1) :20–23, 1977.
- [349] SC Werch and AC Ivy. A study of the metabolism of ingested pectin. *American Journal of Diseases of Children*, 62(3) :499–511, 1941.
- [350] W Lindinger, J Taucher, A Jordan, A Hansel, and W Vogel. Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcoholism : Clinical and Experimental Research*, 21(5) :939–943, 1997.
- [351] Jean-Jacques Godon, Emmanuelle Zumstein, Patrick Dabert, Frederic Habouzit, and Rene Moletta. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7) : 2802–2813, 1997.
- [352] Kiyoshi Tajima, Takafumi Nagamine, Hiroki Matsui, Mutsumi Nakamura, and Rustam I Aminov. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, 200(1) :67–72, 2001.

- [353] Peter H Janssen and Marek Kirs. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12) :3619–3625, 2008.
- [354] Arthur L Delcher, Kirsten A Bratke, Edwin C Powers, and Steven L Salzberg. Identifying bacterial genes and endosymbiont dna with glimmer. *Bioinformatics*, 23(6) :673–679, 2007.
- [355] Ramy K Aziz, Daniela Bartels, Aaron A Best, Matthew DeJongh, Terrence Disz, Robert A Edwards, Kevin Formsma, Svetlana Gerdes, Elizabeth M Glass, Michael Kubal, et al. The rast server : rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1) : 75, 2008.
- [356] Karin Sauer, Ulrike Harms, and Rudolf K Thauer. Methanol : coenzyme m methyl-transferase from *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*, 243(3) :670–677, 1997.
- [357] SC Mitchell and RL Smith. Trimethylaminuria : the fish malodor syndrome. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(4) :517–521, 2001.
- [358] Richard J Mackay, Christopher J McEntyre, Caroline Henderson, Michael Lever, and Peter M George. Trimethylaminuria : causes and diagnosis of a socially distressing condition. *The Clinical Biochemist Reviews*, 32(1) :33, 2011.
- [359] WH Wilson Tang, Zeneng Wang, Bruce S Levison, Robert A Koeth, Earl B Britt, Xiaoming Fu, Yuping Wu, and Stanley L Hazen. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, 368(17) :1575–1584, 2013.
- [360] Robert A Koeth, Zeneng Wang, Bruce S Levison, Jennifer A Buffa, Brendan T Sheehy, Earl B Britt, Xiaoming Fu, Yuping Wu, Lin Li, Jonathan D Smith, et al. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature medicine*, 19(5) :576–585, 2013.
- [361] Kristina Lang, Jörg Schuldes, Andreas Klingl, Anja Poehlein, Rolf Daniel, and Andreas Brune. New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of "*Candidatus methanoplasma termitum*". *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4) :1338–1352, 2015.
- [362] Rudolf K Thauer, Anne-Kristin Kaster, Henning Seedorf, Wolfgang Buckel, and Reiner Hedderich. Methanogenic archaea : ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8) :579–591, 2008.
- [363] LF McKay, WG Brydon, MA Eastwood, and JH Smith. The influence of pentose on breath methane. *The American journal of clinical nutrition*, 34(12) :2728–2733, 1981.
- [364] Jonna Jalanka-Tuovinen, Anne Salonen, Janne Nikkilä, Outi Immonen, Riina Kekkonen, Leo Lahti, Airi Palva, and Willem M de Vos. Intestinal microbiota in healthy adults : temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PloS one*, 6(7) :e23035, 2011.

- [365] Alexander V Tyakht, Elena S Kostryukova, Anna S Popenko, Maxim S Belenikin, Alexander V Pavlenko, Andrey K Larin, Irina Y Karpova, Oksana V Selezneva, Tatyana A Semashko, Elena A Ospanova, et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature communications*, 4, 2013.
- [366] Catherine A Mbakwa, John Penders, Paul H Savelkoul, Carel Thijs, Pieter C Dagnelie, Monique Mommers, and Ilja CW Arts. Gut colonization with *Methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development. *Obesity*, 23(12) :2508–2516, 2015.
- [367] Jose C Clemente, Erica C Pehrsson, Martin J Blaser, Kuldip Sandhu, Zhan Gao, Bin Wang, Magda Magris, Glida Hidalgo, Monica Contreras, Óscar Noya-Alarcón, et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science Advances*, 1(3) :e1500183, 2015.
- [368] Guillaume Borrel, Nicolas Parisot, Hugh MB Harris, Eric Peyretilade, Nadia Gaci, William Tottey, Olivier Bardot, Kasie Raymann, Simonetta Gribaldo, Pierre Peyret, et al. Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC genomics*, 15(1) :679, 2014.
- [369] Lena Kröninger, Stefanie Berger, Cornelia Welte, and Uwe Deppenmeier. Evidence for the involvement of two different heterodisulfide reductases in the energy conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *FEBS Journal*, 2015.
- [370] Mor Nadia Lurie-Weinberger, Michael Peeri, Tamir Tuller, and Uri Gophna. Extensive inter-domain lateral gene transfer in the evolution of the human commensal methanospaera stadtmannae. *Frontiers in genetics*, 3, 2012.
- [371] Saber Khelaifia, Marc Garibal, Catherine Robert, Didier Raoult, and Michel Drancourt. Draft genome sequence of a human-associated isolate of *Methanobrevibacter arboriphilicus*, the lowest-g+ c-content archaeon. *Genome announcements*, 2(1) :e01181–13, 2014.
- [372] Nadia Gaci, Guillaume Borrel, William Tottey, Paul William O'Toole, and Jean-François Brugère. Archaea and the human gut : New beginning of an old story. *World journal of gastroenterology : WJG*, 20(43) :16062, 2014.



## ANNEXES



## ANNEXE 1

## Travaux publiés

- Chaudhary pp, **Gaci N**, Borrel G, O'Toole PW, Brugère JF (2015). *Molecular methods for studying methanogens of the human gastrointestinal tract: current status and future directions.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(14):5801-5815
- Tottey W, **Gaci N**, Borrel G, Alric M, O'Toole PW, Brugère JF (2015) *In-vitro model for studying methanogens in human gut microbiota.* *Anaerobe* 34:50–52
- **Gaci N**, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère J-F (2014) *Archaea and the human gut: new beginning of an old story.* *World J Gastroenterol* 20(43):16062–16078
- Borrel G, **Gaci N**, Peyret P, O'Toole PW, Gribaldo S, Brugère J-F (2014) *Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7th order of methanogens: implications for the evolution of a genetic code expansion cassette.* *Archaea* 27:374146
- Borrel G, Parisot N, Harris HM, Peyretaillade E, **Gaci N**, Tottey W, Bardot O, Raymann K, Gribaldo S, Peyret P (2014) *Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine.* *BMC Genomics* 15(1):679
- Brugère J-F, Borrel G, **Gaci N**, Tottey W, O'Toole PW, Malpuech-Brugère C (2014) *Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease.* *Gut Microbes* 5(1):5–10
- Feria-Gervasio D, Tottey W, **Gaci N**, Alric M, Cardot J-M, Peyret P, Martin J-F, Pujos E, Sébédio J-L, Brugère J-F (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
- Borrel G, Harris HM, Parisot N, **Gaci N**, Tottey W, Mihajlovski A, Deane J, Gribaldo S, Bardot O, Peyretaillade E (2013) *Genome sequence of "Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis" Isoire-Mx1, a third Thermoplasmatales-related methanogenic archaeon from human feces.* *Genome Announce* 1(4):e00453–00413




## Communications affichées

- **Isolement de *Methanomethylophilus alvus* gen. nov., sp. nov., archée méthanogène appartenant au cluster digestif de l'ordre des *Methanomassiliococcales* apparentée aux *Thermoplasmatales* et proposition de *Methanomethylophilaceae*, fam. nov.**  
Association francophone d'écologie microbienne (AFEM). 4-6 novembre 2015. Anglet, France.
- **Human gut microbiota preservation for functional studies: *in-vitro* comparison of common cryoprotective agents (CPA).**  
Intestinal Congress of Translational Reserearch in Human Nutrition (ICTRHN). 26-27 juin 2015. Clermont Ferrand, France.
- **Methanol as a substrate for methanogenesis of the principal human gut archaeal commensal *Methanobrevibacter smithii*.**  
Federation of European Microbiologists congress (FEMS). 7-11 juin 2015. Maastricht, Pays-Bas  
Groupement de Recherche (GdR) Archaea. 12-13 mars. Toulouse, France.
- **Lifespan evolution of the fecal microbiota of rats under controlled environmental and diet conditions.**  
Journées de l'Ecole Doctorale (JED), Clermont Ferrand, 17 juin 2014  
The Rowett Research Institute, Aberdeeen, Ecosse. 21-25 juin 2014



## ANNEXE 2

# Molecular methods for studying methanogens of the human gastrointestinal tract: current status and future directions

Prem Prashant Chaudhary<sup>1</sup> · Nadia Gaci<sup>1</sup> · Guillaume Borrel<sup>2</sup> · Paul W. O'Toole<sup>2</sup> · Jean-François Brugère<sup>1</sup> 

Received: 25 March 2015 / Revised: 23 May 2015 / Accepted: 29 May 2015 / Published online: 19 June 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Until recently, human gut microbiota was believed to be colonized by few methanogenic archaeal species. Much higher microbial diversity within the human gut was revealed by the use of molecular approaches as compared to routine microbiological techniques, but still, a lot remains unknown. Molecular techniques has the advantage of being rapid, reproducible, and can be highly discriminative as compared to conventional culturing methods. Some of them provide both qualitative and quantitative information. However, the choice of method should be taken with care to avoid biases. The advent of next-generation sequencing gives much deeper information from which functional and ecological hypotheses can be drawn. In this review, molecular techniques that are currently used together with their possible future developments to study gut methanogenic communities are indicated along with their limitations and difficulties that are encountered during their implementation. Moreover, the high amount of metagenomics data from the human gut microbiome indicate that this environment could be a paradigm for new directions in methanogen diversity studies and help to develop new approaches for other environments as well. Concerning humans, this should help us to better understand the possible association of methanogens with some of the diseased conditions and their peculiar distribution among age groups in human.

**Keywords** Methanogens · Diversity · Molecular tools · Human gastrointestinal tract · Molecular marker

## Introduction

Human gut is the habitat for trillions of microbes (Eckburg et al. 2005; Qin et al. 2010; Lozupone et al. 2012) including methanogens (Miller and Wolin 1986; Liu and Whitman 2008; Sahakian et al. 2010; Gaci et al. 2014). These methanogenic archaea live in a syntrophic relationship with other microorganisms in the human gastrointestinal tract (GIT) in more than 50 % of humans (adults). Methanogens are likely absent or present at very low levels in newborns while being at a higher level in elderly people (Mihajlovski et al. 2010; Polag et al. 2014). It now becomes evident that methanogenesis is hydrogen dependent in humans and seems mainly to involve the reduction of CO<sub>2</sub> in most common cases of methanogenesis (Table 1). Therefore, methanogenesis might improve the energetic yield retrieval of fermentative bacteria by lowering the H<sub>2</sub> partial pressure in the gut together with sulfate reducing bacteria and acetogens (see for example Carbonero et al. 2012, for the consequences and bioenergetics of this hydrogenotrophy). Out of the *Methanobacteriales*, *Methanobrevibacter smithii* (*Mbs*) and *Methanosphaera stadtmanae* (*Mss*) are historically the older known human gut methanogens. Miller and co-workers reported them in the 1980s and isolated first *Mbs* (Miller et al. 1982) followed by *Mss* (Miller and Wolin 1985) from a human fecal sample. In human GIT, *Mbs* is believed to be the main archaeon in terms of prevalence and quantity; therefore, the most important reaction for hydrogen use by gut methanogens is consequently allowing to utilize 4 mol of H<sub>2</sub> for each mole of CO<sub>2</sub> converted into 1 mol of CH<sub>4</sub>. *Mbs* can also use formate directly to generate methane. *Mss* produces methane not from CO<sub>2</sub> but using a different pathway, the

✉ Jean-François Brugère  
j.f.brugere@udamail.fr

<sup>1</sup> EA 4678 CIDAM, Clermont Université; Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Cork, Ireland

**Table 1** Most frequently encountered methanogens in the human gut as known by now and their potent role in human gut physiology

Order <sup>a</sup>	Species	Genome	Substrate for methanogenesis	References and comments
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i> <sup>b</sup>	+	H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> or formate Possibly CH <sub>3</sub> OH	Miller et al. 1982 Samuel et al. 2007; Gaci et al. 2014
	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> <sup>b</sup>	+	H <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> OH	Miller and Wolin 1985 Fricke et al. 2006 <i>mrtA</i> paralog instead of <i>mcrA</i> gene
<i>Methanomassiliococcales</i>	<i>Methanomassiliococcus luminyensis</i> <sup>b</sup>	+	H <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> OH/MMA/DMA/TMA <sup>c</sup> DMS <sup>d</sup>	Dridi et al. 2012 Brugère et al. 2014
	<i>Ca.</i> <i>Methanomethylophilus alvus</i>	+	H <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> OH <sup>c</sup> MMA/DMA/TMA/DMS <sup>d</sup>	Borrel et al. 2012
	<i>Ca.</i> <i>Methanomassiliococcus intestinalis</i>	+	H <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub> OH <sup>c</sup> MMA/DMA/TMA <sup>d</sup>	Borrel et al. 2013a
	Other phylotypes (Mx-2, Mx-3, Mx-4)	–	ND	Mihajlovski et al. 2010 Several phylotypes ( <i>mcrA</i> marker) corresponding to different species

<sup>a</sup> Only major species or those retrieved from several different studies are shown

<sup>b</sup> Human isolate available

<sup>c</sup> Experimentally proven for isolates or supposed from enrichment cultures data

<sup>d</sup> Inferred from genomic data

*MMA* monomethylamine, *DMA* dimethylamine, *TMA* trimethylamine, *DMS* dimethylsulfide, *mcrA* gene coding the methyl-coenzyme M reductase, subunit alpha, *mtaB* gene coding the methanol:cobalamin methyltransferase, *ND* not determined

reduction of methanol in the presence of H<sub>2</sub> (Table 1, Miller and Wolin 1985; Fricke et al. 2006) and is dependent on acetate as a carbon source (Walker et al. 2006). Methanol originates from the gut bacterial degradation of pectin, mainly from fruits.

Recent advances in molecular approaches renew our vision of the methanogen diversity as well as their role in the gut: To illustrate this, genes involved in methanogenesis from methanol have been found in human gut isolates of *Mbs* (Hansen et al. 2011; Gaci et al. 2014), and therefore, methanol may also be used as a substrate for methanogenesis in the human gut for this species. Also, besides these two *Methanobacteriales*, molecular techniques coupled to phylogenetic analyses indicated that a *Thermoplasmata* lineage first identified in the rumen (Tajima et al. 2001) was also present in the human gut. It was there identified as a probable methanogenic lineage forming a new order of methanogens (Mihajlovski et al. 2008), consisting of various phylotypes, likely various species and genera or even families in the gut microbiota of elderly people (Mihajlovski et al. 2010). Members of this order were sometimes formerly grouped under rumen cluster C (RCC) (Janssen and Kirs 2008) and called *Methanoplasmatales* (Paul et al. 2012) or *Thermoplasmatales*-related methanogens. They are now officially constituting a distinguished order of methanogens called as *Methanomassiliococcales* (Iino et al. 2013; Oren and Garrity 2013) which also possess the ability to deplete H<sub>2</sub> by using methanol. They seem to have a broader range of substrates for methanogenesis, for example, utilization of methylamines, as illustrated in ruminants (Poulsen et al. 2013), in termites

(Lang et al. 2015), and in humans (Brugère et al. 2014). This is very likely to be of medical importance in humans. The gut-produced trimethylamine (TMA) which originates from various nutrients (L-carnitine, phosphatidylcholine, choline,...) is considered to be the intestinal precursor of the plasmatic oxidized form TMAO. The latter is an independent risk factor of cardiovascular disease and an atherosclerosis factor (Wang et al. 2011; Koeth et al. 2013). Therefore, some strains of the *Methanomassiliococcales* likely have a natural protective role when present in the gut and could also be supplied as probiotics (“Archaeobiotics”) in the future, to prevent atherosclerosis and also trimethylaminuria (Brugère et al. 2014).

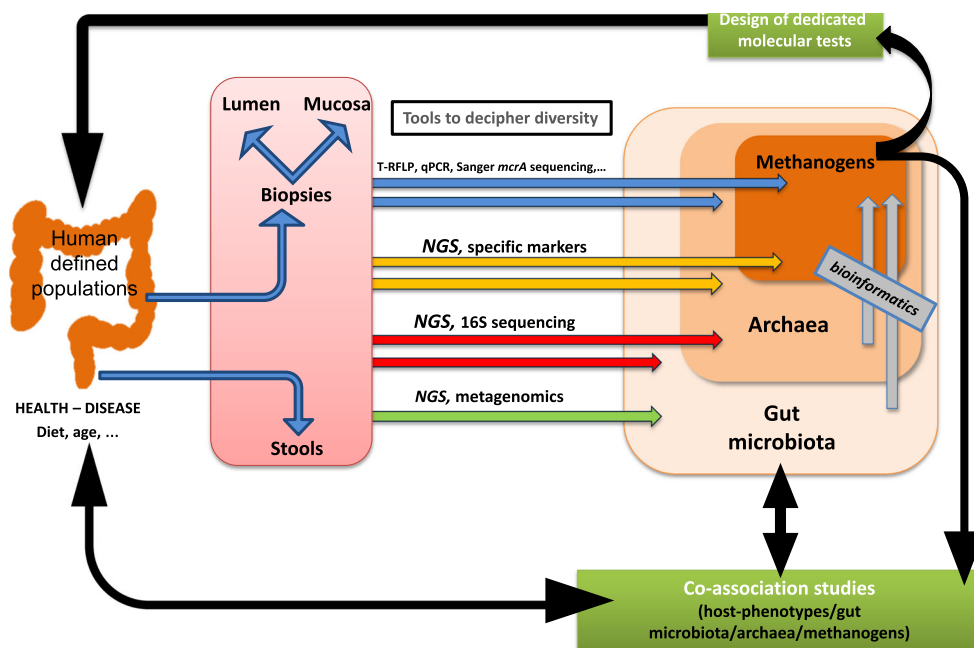
The question is however to determine if methanogens possess other roles that are beneficial or deleterious, and answers remain still open and controversial (Gaci et al. 2014). One main reason of our present lack of knowledge is likely the absence of precise tools to study the role of methanogens in health and diseases. The different human gut methanogen species or subspecies could have different kinds of interaction within the gut microbiota and thus different relationships with health and disease (Pimentel et al. 2012; Samuel and Gordon 2006; Samuel et al. 2007; Armougom et al. 2009; Blais Lecours et al. 2014; Bang et al. 2014). Due to the stringent growth conditions of methanogens, there has been a shift toward culture-independent techniques for diversity studies. Molecular techniques are more accurate and less time-consuming which makes them now the method of choice for the investigators (Nocker et al. 2007; Brugère et al.

2009; Claesson and O’Toole 2010). It should however be kept in mind the importance of the pre-analytical steps, particularly the choice of the nucleic acid isolation method. This step can introduce a bias which is involved in every kind of molecular methods but is likely of higher importance in case of methanogens as the method can lead to variable extraction yields, not only between bacteria and methanogens, but also among methanogens themselves. The reasons are that archaea do not present usual bacterial membranes and cell wall components (Klingl 2014) and that differences among the cellular structure of gut methanogens has been observed: For example, the *Methanomassiliicoccales* are remarkably constituted of a double cell membrane as determined with electronic microscopy (Dridi et al. 2012; Lang et al. 2015). Therefore, some protocols are likely more adapted to methanogens (Dridi et al. 2009; Chaudhary et al. 2011). Once DNA is obtained, various types of molecular techniques can be applied. Figure 1 summarizes the different types of methods which are described in this review and how they can be articulated together with well-defined human populations/samples for adequate analyses. This can lead to a more accurate determination of the distribution of each of these methanogens within different populations, in order to better understand their specific role and interactions with other microbial components.

**Use of classical molecular markers to decipher the diversity of methanogens**

*Cloning and fingerprinting techniques*

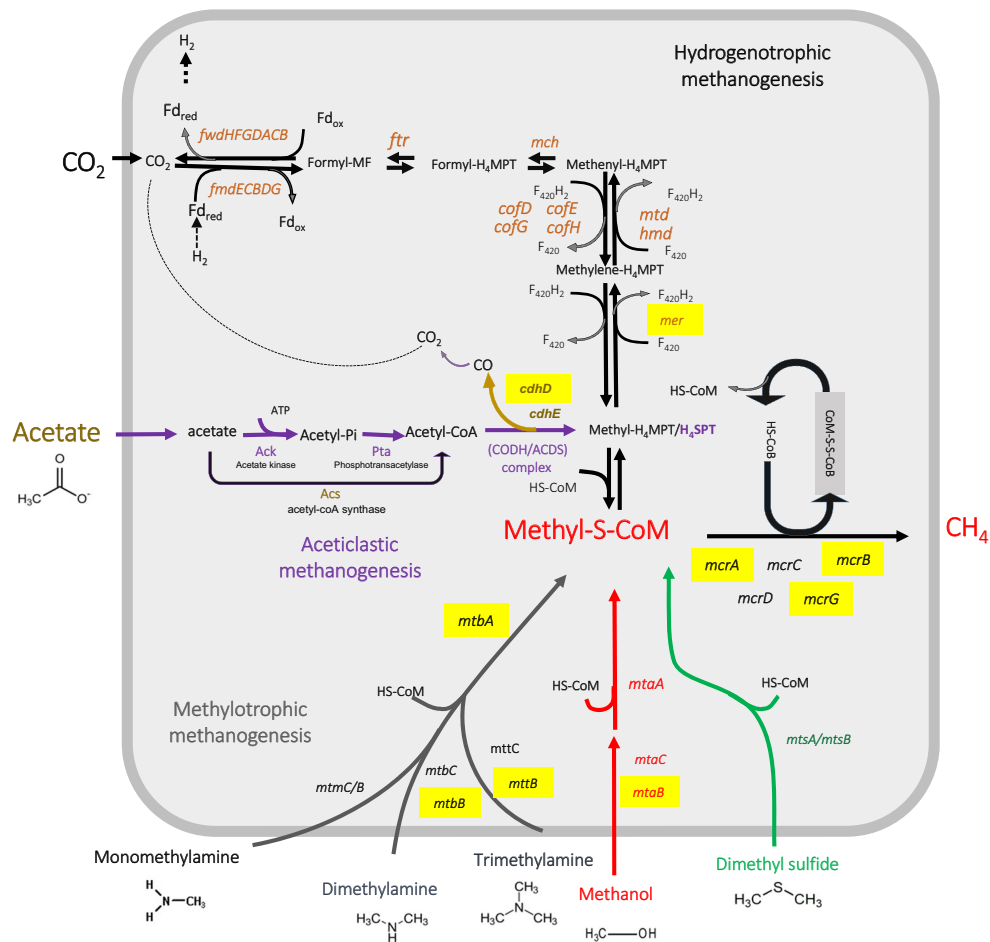
Methanogen diversity in human gut has been predominantly studied by the combination of simple molecular techniques such as PCR followed by cloning and sequencing of clones as it was done earlier for other environments (Hales et al. 1996; Skillman et al. 2004). The sequences obtained are then subjected to bioinformatic analysis which results in the preparation of a phylogenetic tree that gives an estimate of the richness of methanogens in a particular sample. The most commonly used markers to study the diversity of methanogens in human gut are the 16S ribosomal RNA (rRNA) and *mcrA* genes (Scanlan et al. 2008; Mihajlovski et al. 2008; Mihajlovski et al. 2010). The *mcrA* gene encodes the  $\alpha$  subunit of the methyl-coM reductase of the MCR-I which catalyzes the last step of methanogenesis (methane release from coM) (Fig. 2, see Thauer 1998; Deppenmeier et al. 1999; Thauer et al. 2008 for description of the methanogenesis biochemical pathways and related energy conservation). However, the human gut inhabitant *Mss* does not possess a MCR-I complex, but only the type II (MCR-II), which is composed of subunits encoded by the *mrt* genes (Fricke et al. 2006). Therefore, caution should be taken to detect this



**Fig. 1** Different scales to address the gut methanogen diversity. Two types of samples are generally collected for the diversity and association studies from humans, i.e., biopsies which can further be subdivided based on the region of collection (for example, lumen, mucosa, and stool samples, as shown in the pink box). Diagrammatic representation of the traditional and future molecular tools used in order

to study archaeal or methanogenic diversity with their degree of penetration is shown in this figure. Data obtained from these studies can be used next for co-association studies between methanogens and defined population and to elaborate specific diagnostic molecular tools, like PCR/qPCR tests to address specific questions

**Fig. 2** Molecular markers to study gut methanogens. All the three possible methanogenic pathways are represented in this figure (adapted from Thauer 1998; Deppenmeier et al. 1999). Although, there is no evidence of acetoclastic methanogenesis in human gut. Genes which have been shown to be possible molecular markers for the hydrogenotrophic and methylotrophic methanogens in order to study their diversity are highlighted by yellow color. Several subunits of *mcr* operon encoding the methyl-coM reductase of type I (present in quite all the methanogens, but absent in *M. stadtmanae*) can be used to address the methanogen diversity, with *mcrA* which has been used as a universal molecular marker of methanogenesis



archaeon based on this marker. These methods are much time-consuming, laborious, and costly as large numbers of clones need to be screened in order to cover the maximum diversity, together with the sequencing technology (typically the Sanger method). This can be reduced if combined with an oriented cloning and/or a fingerprinting technique (Mihajlovski et al. 2008), which leads to an easiest selection of clones (based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) for example).

To our knowledge, there are few reports of the application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)/temporal temperature gel electrophoresis (TTGE) (Muyzer 1999) in studying human gut archaea or methanogens specifically (Abell et al. 2006; Nam et al. 2008), despite having already been extensively used for other environments (see for example Nakamura et al. 2009; Chaudhary et al. 2014). One major limitation of this technique relies on its inability to differentiate minor base pair differences in two sequences and thus may result in single band for different microbial strains. Another possible technique for studying gut methanogens is denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC) which allows a greater number of samples to be processed in a more convenient way. It is typically used to detect mutations by

their property to form heteroduplex between wild-type and mutated DNA strands. Heteroduplex molecules are separated from homoduplex molecules by ion-pair, reverse-phase liquid chromatography on a special column matrix with partial heat denaturation of the DNA strands (O'Donovan et al. 1998; Oefner and Underhill 1998). This approach can also be used in microbial ecology (Barlaan et al. 2005) encompassing the gut environment (Goldenberg et al. 2007). Here, PCR amplification (usually targeting 16S genes) is performed similarly to DGGE, that is with a GC clamp to promote separation among different amplicons (Illmer et al. 2014). Till now, there has been no report of the use of this technique in studying gut methanogen diversity. This might be due to the high cost of the equipment and columns or high degree of optimization required for each reaction to achieve the highest sensitivity of the results.

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) technique involves the amplification of usually the 16S rRNA gene or any target gene, *mcrA* gene in case of methanogens. Out of the primer pair used, one primer is fluorescently labeled with some dye. These amplified products are then subjected to restriction digestion with one or several restriction enzymes. An automated sequencer generates an



electrophoregram based on the sizes of the T-RFs in a given sample. Vianna and co-workers used T-RFLP to study the prevalence and distribution of methanogens and possible associations with bacteria in oral biofilms, and they found the dominance of *Methanobrevibacter oralis* along with one unique phylotype (Vianna et al. 2009). However still, this technique has been underestimated in studying the methanogen diversity in human gut. One of the limitations is the impossibility to distinguish two sequences when they share a common terminal restriction site, as it will result in the same peak during the capillary electrophoresis and thus leads to ambiguous elucidation of microbial diversity. The use of several restriction enzymes in parallel reduces this risk. Another problem is the lack of well-defined databases to compare and assign the obtained T-RFs to a species. In spite of this, T-RFLP is still considered a reliable and high-throughput technique to monitor the diversity of microbial populations in different environmental samples (Scavino et al. 2013; Conrad et al. 2014; Mach et al. 2015).

Suppressive subtractive hybridization (SSH) allows the identification of one bacterial genome from another closely related one on the basis of the identification of the DNA fragments that are uniquely present in only one genome (Peng et al. 2011). A comparison is made in the genomic content of the closely related species by using a strain-specific genomic DNA, next cross-hybridized and then compared with known gene or protein sequence data. Finally, it allows establishing a functional relationship between these DNA fragments and the compared genomes/DNA content. This technique can also be used as a novel method to identify the unknown methanogen diversity within the human gut, at least for determining the gene repertoire that differs among strains (see below).

### Detection and quantification of methanogens by molecular techniques

Quantitative real-time PCR (qPCR) is one of the most sensitive, reliable, and reproducible techniques in order to determine any particular microorganism in an environment. The principle of this technique is based on the real-time detection of fluorescence of the reporter molecule during the course of the specific amplification by PCR. The threshold value of the fluorescence depends upon the amount of gene copy number in the sample, i.e., the higher the gene copy number in the starting sample, less will be the threshold value and vice versa. This technique has been widely used to study the diversity of methanogens and other microorganisms in ruminants and other environmental samples (see for example Ouwkerk et al. 2002; Chaudhary et al. 2012; Zeleke et al. 2013), but there are only few reports that deal with the quantification of archaeal or methanogenic population in human gut (for example, see Abell et al. 2006; Dridi et al. 2009; Million et al. 2012; Kim et al. 2012). Zhang

and coworkers used qPCR technique to study and compare the shifts in the gut microbiota in obese and after gastric bypass patients as compared to the control ones (Zhang et al. 2009). It was also used to determine the abundance and richness of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in healthy human colon (Nava et al. 2012a), which showed that all the three hydrogenotrophic groups of microbes including methanogens, i.e., *Methanobrevibacter* spp., *Mbs*, and members of the order *Methanomicrobiales* were present in human colonic mucosa (Nava et al. 2012b). Both relative and absolute quantifications are possible by the use of this technique. For an absolute quantification, standards need to be prepared from the known concentration of plasmid samples. Its high cost and difficulty to determine two or more targets within one assay is however limiting. Determining a higher number of targets in one assay can be achieved using microbial ecological microarrays, but the quantification remains relative. Several DNA chips have been developed specifically toward the human gut microbiota based on 16S targets: This encompasses phylogenetic DNA chips, like the human intestinal tract chip (HITChip, Rajilić-Stojanović et al. 2009) which is likely the most used, but does not encompass the detection of archaeal species of the gut. This is also the case of the human gut chip (HuGChip, Tottey et al. 2013), despite being designed with explorative probes (can detect unknown DNA sequences and affiliate them at the family level). Inversely, DNA chips specifically designed toward methanogens could help for this purpose, like the ANAE ROCHIP (Franke-Whittle et al. 2009). The fact that it is designed toward already known methanogens can be however an important limitation, and this kind of microarray had never been used for investigation of the human gut methanogenic community. At last, another DNA microarray solution resides in functional profiling of human gut microbiota with DNA array like the human microbiome chip (HuMiChip, Tu et al. 2014) as it possesses probes toward methane metabolism.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a quantitative technique that can be used in microbial ecology for the specific detection/visualization of microorganisms. It is based on fluorescent nucleic acid probes which bind to the complementary regions on the microbial chromosome, finally analyzed by fluorescence microscopy. Numbers of probes are available for the quantification of methanogens in ruminants and environmental samples, but this technique is still not much used in the quantification of methanogens in human gut. We came across only very few studies in humans where FISH has been used for the quantification of methanogenic archaea. One of this kind of study was conducted by Lepp and his coworkers where they used FISH for the detection of archaeal cells at subgingival sites in periodontitis patients (Lepp et al. 2004). However, for the implementation of this technique in studying gut methanogens, a detailed knowledge about the gut methanogenic community should be there so that more specific probes could be designed for appropriate studies in this kind of



environment. There are also some limitations when FISH is implemented on archaea, like the low copy numbers of 16S rRNA genes found per genome and their different cell wall and membrane constitution compared to bacteria. So, more sensitive methods like catalyzed reporter deposition (CARD)-FISH should be used in order to detect gut methanogens more precisely. In 2008, Kubota et al. tested several permeabilization protocols using different enzymes and comes out with the conclusion that PeiW treatment is the most effective one for CARD-FISH application to methanogens (Kubota et al. 2008). Independently, methanogens were believed till recently to possess one cofactor supposed to be necessary for all methanogens,  $F_{420}$ . Despite that its presence in few other microbes has already been reported, but at lower levels, an excitation at 420 nm and emitted fluorescence permit the detection and counting of methanogens (Doddema and Vogels 1978). However, this  $F_{420}$  factor is very likely absent in members of *Methanomassiliicoccales* order (Borrel et al. 2014a).

### In-depth sequencing of molecular markers

Massive parallel sequencing, further described as next-generation sequencing (NGS) methods, provides a mean to rapidly and deeply sequence DNA from a sample. Various NGS methods have been used (454 pyrosequencing, Illumina technology), and some new ones are also available now (i.e., PacBio and IonTorrent), each with their own specifications and limitations (Roh et al. 2010; Weinstock 2012). Due to the high amount of data generated in a single run of sequencing, these technical approaches are useful to access information about diversity at various scales, from genomic data of methanogens to metagenomics data (see next chapter). It can also be performed on specific/dedicated molecular markers of methanogens/methanogenesis (Fig. 1, yellow, red, and green arrows). However, several factors should be kept in mind when designing a microbiome study (Goodrich et al. 2014a).

The use of 16S rRNA gene as a biodiversity marker for methanogen studies in samples relies mainly if not exclusively on universal primers that have been designed through comparative 16S sequences of bacteria and can therefore introduce a bias toward methanogen detection, by being less or not efficient at all (as also mentioned above for probes used with phylogenetic microarrays). Recently, a prokaryotic universal primer pair was proposed for a simultaneous analysis of bacteria and archaea (Takahashi et al. 2014). It was designed by targeting V3–V4 16S region on the Illumina MiSeq sequencer and allows the detection of more than 94 % of archaeal and 98 % of the bacterial rRNA genes theoretically, according to the Ribosomal Database Project (RDP) database. It was used in studying pig gut microbiota, and bacterial and archaeal components were detected in one sequence reaction: For these last ones, *Methanobacteriales*, but also *Thermoplasmata*

(very likely *Methanomassiliicoccales*, see below) were determined. Alternatively, a strategy based on several couples of primers, allowing a better coverage of each of the three domains of life (*Eukarya*, *Bacteria*, and *Archaea*) could allow to limit bias in the detection of every component of a microbiota (encompassing methanogenic archaea). This has been recently developed and used for the determination of rumen microbial communities with 16S amplicons generated by several primers next sequenced together (Kittelman et al. 2013). Such an approach would be very likely interesting concerning studies on the human gut microbiome as the cooccurrence of every microbes of the ecosystem can be addressed in a simple and rapid way.

When addressing the question of the methanogen diversity itself, it would be of great interest to limit generated data to only methanogens. Unfortunately, methanogenesis seems to have been lost several times in the evolution of the *Euryarchaeota* (Baptiste et al. 2005; Borrel et al. 2013a; Raymann et al. 2015) leading to sparse methanogenic lineages separated by non-methanogenic orders. Among these lasts, some of these archaea may be found in the gut microbiota, especially *Halobacteria* (Nam et al. 2008; Oxley et al. 2010). Consequently, non-methanogenic 16S sequences could be detected, a problem that can be overcome by fine annotation/phylogenetic studies. Inversely, the use of 16S primers with a narrow coverage could limit the real methanogenic diversity, for example, of *Methanomassiliicoccales* located within the class *Thermoplasmata*. In the seminal work of Eckburg and his team based on cloning and sequencing by the Sanger method, two types of primers were used: one for the bacterial component and another for the archaeal part (Eckburg et al. 2005). This approach was performed on different types of samples from the GIT, encompassing mucosal tissue collected from three individuals. Only one operational taxonomic unit (OTU) was detected for archaeal members among the 1524 obtained sequences, corresponding to *Mbs*. This strongly, but wrongly conveys an idea of low methanogenic diversity within the human gut. Increase in the availability of sequencing data for the third domain, i.e., archaea, leads now to specific primers which are able to detect a broader part of archaeal population. This approach has been successfully used recently for human gut archaea (Hoffmann et al. 2013). In this study (dedicated to fungi and archaea of the human gut), various and not yet recovered gut archaea were detected, larger than only methanogens/*Euryarchaeota*. This encompasses *Thaumarchaeota* of the *Nitrososphaera* genus. Also, this study revealed euryarchaeotes affiliated to two different genera of the *Thermoplasmata*: the *Thermoplasmatales* *Thermoplasma* spp. and the *Thermogymnomonas* spp., thermoacidophilic and aerobic archaea. Surprisingly, no *Methanomassiliicoccales* were retrieved from this study. As mentioned above, the *Methanomassiliicoccales* belongs to the class *Thermoplasmata* with other non-methanogenic order

(for example, *Thermoplasmatales*) and are therefore phylogenetically related with each other. Together with the fact that no other studies indicated the presence of unambiguously determined *Thermoplasmatales* in the human gut, it is likely that a bias in the affiliation had been made. In fact, in this rapidly moving area of methanogens, the databases used for the analysis should be regularly updated and encompass sequences of non-cultured/isolated archaea and for which a fine and strong phylogenetic affiliation has been obtained. As an example, in March 2015, the RDP Classifier (RDP release 11, update 3) (Wang et al. 2007) did not identify the *Methanomassiliococcales*, even if several genomes had already been published and were deposited in GenBank (Gorlas et al. 2012; Borrel et al. 2012; Borrel et al. 2013b; Lang et al. 2015). At the time we submitted this article, it still affiliates *Methanomethylophilus* spp. and *Methanomassiliococcus* spp. to *Thermoplasma/Thermogymnomonas* spp., but this should be improved in the coming releases of the RDP Classifier. Alternatively, the use of fine-annotated and dedicated 16S database should provide a way to circumvent this kind of problems. This has recently been undertaken for methanogens of the GIT of ruminants (Ruminal and Intestinal DB (RIM-DB), Seedorf et al. 2014). This DB considers also other intestinal environments such as the human and termite intestinal tract, in which methanogens are particularly of interest in the global warming context (Schmitt-Wagner and Schmitt-Wagner and Brune 1999; Brune 2014). RIM-DB contains more than 2300 chimaera-checked 16S sequences and allows a species-level taxonomic assignment. *Methanomassiliococcales* are represented by 195 sequences distributed in 17 groups, possibly different genera, which highlights the diversity of *Methanomassiliococcales*. This tool can be implemented in QIIME (Caporaso et al. 2010) as a reference database when affiliating sequences from amplicon-based NGS of 16S rRNA gene.

Considering all of this, the sequences supposed to come from *Thermoplasmatales* in the study of Hoffmann and co-workers (Hoffmann et al. 2013) and also in various other studies from other digestive environments are probably methanogens. Another way to limit this possible artifact would be the use of *mcrA* gene marker, specific to methanogens (i.e., absent in *Thermoplasmatales*) and for which phylogenetic affiliation is possible (Luton et al. 2002). Other alternative molecular markers are also possible, as well for methanogens than for (Eury)archaea.

### Marker-based alternatives to study methanogen diversity

Some molecular markers have already been used for the detection of specific methanogens in human gut, for example, the 16S rRNA and *rpoB* genes (Dridi et al. 2009). However, there still feels the need of alternative molecular markers in

order to target specific functions of the methanogens or to discriminate different subspecies.

The genomic sequence neighboring the 16S and 23S gene sequences (internal transcribed spacer (ITS)) is less subjected to high selective pressure compared to these two genes, which confers to it a high polymorphism in sequence and length. It can therefore be very useful for determining the diversity of methanogens using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) (Fisher and Triplett 1999; Ciesielski et al. 2013). However, there is no unique transcription unit for 16S and 23S rRNAs in *Methanomassiliococcales*: These two genes do not form an operon as usually observed in bacteria and other methanogens and are scattered in the genome (Borrel et al. 2014b). Consequently, there is no ITS/a lack of a small DNA region amplifiable by 16S/23S primers. Therefore, the use of ARISA would lead to a strong bias toward the detection of one of the major methanogenic populations in human gut.

In addition to *mcrA* and 16S rRNA genes, chaperonin type II markers (also called as thermosome) were also used as a target to study the phylogenetic diversity of archaea. Type II chaperonin sequences are considered to be more diverse than the previously used markers and thus might serve as a better marker for the diversity studies (Chaban and Hill 2012). Phylogenetic trees constructed by using chaperonin type II markers are in well agreement with 16S rRNA-based trees, but rather, they provide a more detailed resolution of the closely related groups, or it could help to discriminate different subspecies. When tested along with *mcrA* and 16S rRNA genes to study the archaeal diversity in a cattle rumen, *Mbs*, *M. ruminantium* and *Mss* were successfully detected as the dominant members of the methanogen community with all the three markers. This marker-based diversity analysis still needs to be used for methanogenic communities inhabiting the human gut. Several other molecular markers have been studied and validated recently for the diversity analysis of methanogens (Romaniuk et al. 2014). These markers and the place of enzymes they are coding for in the methanogenesis pathways are indicated in Fig. 2. This includes *mcrB* and *mcrG* which are theoretically necessary to all the methanogens as they encode subunits of  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the methyl-coenzyme M reductase MCR-I. However, as mentioned above, MCR-I is absent in one human gut methanogen, *Mss*, where it is replaced by the sole presence of a type II methyl-coenzyme M reductase (Fricke et al. 2006).

Other tested molecular markers are restricted to a kind of the three methanogenic pathways, i.e., the methylotrophic, acetitlastic, and hydrogenotrophic ones (Fig. 2). For the methylotrophic methanogenesis, some markers were used successfully (Borrel et al. 2013a; Romaniuk et al. 2014; Blais Lecours et al. 2014) like *mtaB/mtaB1* (methanol-5-hydroxybenzimidazolylcobamide Co-methyltransferase) for methanogenesis from methanol and *mtbA* (methylated

[methylamine-specific corrinoid protein]: coenzyme M methyltransferase) or *mtbB1* (dimethylamine-corrinoid protein Co-ethyltransferase) for methanogenesis from dimethylamine (DMA). For the acetoclastic pathway (mentioning that no methanogen exhibiting acetoclastic mode of methanogenesis has been detected to date in the human gut), *cdhD1* coding the  $\delta$  subunit of acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex is a possible molecular marker (Romaniuk et al. 2014). At last, for the hydrogenotrophic methanogenesis, various markers are possible, and among them, some have been successfully used like the *mer* genetic marker encoding the F<sub>420</sub>-dependent methylene-H<sub>4</sub> MPT reductase (Romaniuk et al. 2014).

However, caution should be applied when using these kinds of molecular markers: They can have a broader distribution than methanogens only or inversely, be absent in some gut methanogens genomes, due to the diversity of methanogenesis encountered in the human gut: For example, it has been shown that the *Methanomassiliicoccales* are not able to complete methanogenesis from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> and lack all the specific genes encoding necessary enzymes of this complete metabolic pathway (i.e., *fwdHFGDACB*, *fmdECBDG*, *fr*, *mch*, *cofDEGH*, *mtd*, *hmd*, *mtrADCBAEFGH*, and *mer*) (Borrel et al. 2013a). Therefore, the use of *mer* is likely insufficient for gut methanogens. It has however to be noticed that the use of the *mtaB* gene (methanogenesis from methanol) has been successfully employed for a description of the whole *Methanomassiliicoccales* order (Borrel et al. 2013b). This gene is present in *Mss* (Fricke et al. 2006) and seems to be also present in *Mbs* strains from the human gut (Gaci et al. 2014) even if they have not been described as methanol-using methanogens: Therefore, *mtaB* gene may be very useful as a marker gene to decipher gut methanogen diversity but is inversely a possible way to introduce a bias in studies if used alone. In conclusion, these genes are strong molecular markers to study the diversity of methanogens in the human gut, but one should be used in conjunction with another to cover the broad range of methanogenesis pathways.

### Future directions to shift from description of diversity onto function of methanogens

#### *Coupling molecular tools with culturing techniques*

All the techniques described above allow diversity studies of the methanogens and their distribution/changing during lifetime. However, it remains very hard to decipher functions other than methanogenesis itself. Interventional studies on the natural habitat (the human gut) are ethically and technically problematic. Altogether, this argues for the use of ex vivo/in vitro studies, i.e., culture-based approaches on isolated microbes or complex communities in in vitro systems simulating the gut environment, which can be further associated with molecular tools.

Recently, there has been a renewed interest in culturing methods for the detection of species (Goodman et al. 2011; Ma et al. 2014; Rettedal et al. 2014). Lagier et al. introduced the concept of culturomics by combining the mass spectrometry approach with existing sequencing (Lagier et al. 2012). They applied this technique on the stool samples of two lean Africans and one obese European in order to study/compare the gut microbial populations simultaneously along with traditional metagenomic analysis. Culturomics identified 340 bacterial species, and the routine metagenome analysis of the same samples yielded 698 phylotypes: This included 282 known species, 51 of which overlapped with the microbiome obtained from culturomics (Lagier et al. 2012). Thus, culturomics can provide complementary details on the gut microbiota. This is a much open approach that detects viable bacteria and that is theoretically not restricted to bacteria only. However, no archaeal species were retrieved from this study while five fungi were detected. This approach stills needs to be applied in order to study the diversity of methanogens specifically in the human gut. Advantages includes the identification of species which are present in low number in the ecosystem, i.e., minority populations, which is of great interest for gut methanogens, but is so far strongly limited by difficulties in culturing methanogens.

Several progresses have been made in simulating the gut microbiota environment in order to follow the metabolic/cellular interactions within the gut microbes. To date, various in vitro systems have been developed (Venema and van den Abbeele 2013), the first ones more than 25 years ago (Macfarlane et al. 1989; Macfarlane et al. 1998). Interestingly, methane production was observed in the three-stage in vitro systems developed by MacFarlane and Gibson after an inoculation with *Mbs*-positive stools, indicating that methanogens could survive and be metabolically active in this in vitro model (Gibson et al. 1988). However, to our knowledge, all the systems developed so far uses an imposed anaerobic atmosphere to microbes (commonly, a continuous flush of CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> or N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> used as oxygen scrubber), a possible bias toward microbe interactions and metabolisms: In fact, other microbial populations may be sensitive to gas level produced by the ecosystem like H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>. This is of importance considering the probable competition between hydrogenotroph populations, particularly SRBs and methanogens. To overcome this problem, an in vitro continuous fermentation concept named Environmental Control System for Intestinal Microbiota (ECSIM) has been developed which allows culturing microbiota under the atmosphere developed by the microbiota itself (Brugère et al. 2011). This has been first declined as three parallel fermentation systems, allowing concomitant comparative studies (Feria-Gervasio et al. 2011). Recently, a derived model of the one developed by MacFarlane et al. (1998) was obtained, forming a three-stage continuous system simulating three gut regions from one common inoculum (3S-

ECSIM) (Feria-Gervasio et al. 2014). An exhaustive comparison of the microbial components of the initial stool inoculum revealed a high correlation at the taxonomic level of bacterial families using the HuGChip validating this approach (Feria-Gervasio et al. 2014). Importantly, the cultivation of a methanogenic stool inoculum has been recently achieved in the ECSIM system, encompassing methane production and *Mbs* yields similar to what was observed in the original sample (Tottey et al. 2015). This has also been coupled to specific inhibition of methanogens and to the in vitro conversion of a non-methanogenic stool sample into a *Mbs*-positive one (Tottey et al. 2015), permitting to achieve what failed in animal models (Hansen et al. 2011; Goodrich et al. 2014b).

Therefore, the next step will be to extend this model for studying gut methanogens to various gut microbiota and various methanogens. From this, microbial interactions involving gut methanogens could be deciphered. This could be helped, for example, with stable isotope probing (SIP), for which in vitro systems fit technically well. The SIP method is now widely used in microbial ecological studies for tracing fluxes of nutrients in biogeochemical cycling by microorganisms. This technique can further be used to check the predominant members of the mixed community which are metabolically active in utilizing a particular substrate for their growth (Radajewski et al. 2000; Dumont and Murrell 2005). The labeled nucleic acids are separated from the unlabeled ones by density gradient centrifugation methods. This labeled nucleic acid pool can further be analyzed using NGS, allowing population studies based on the 16S marker.

#### Sequence enrichment by solution hybrid selection capture method

Hybridization capture technologies, and among them those performed in solution phase, allow a targeted exploration of metagenomes. The solution hybrid selection (SHS) capture method has been proposed (Gnirke et al. 2009; Tewhey et al. 2009) to enrich and select known parts of the human genome for resequencing. Adaptation of the gene capture for microbial ecology allowed a better taxonomic and functional description of the studied microbial communities including the rare biosphere and unknown sequences (Denonfoux et al. 2013). It involves the enrichment of the target gene fragments out of a complex environmental genomic mixture, without PCR biases and direct metagenome sequencing limitations. The success of a gene capture experiment in environmental microbiology strongly depends on the high-quality probe set encompassing variant specific and explorative probes to reveal novelties (Parisot et al. 2014) coupled to adapted databases (Jaziri et al. 2014). Additionally, this innovative strategy for microbial ecology allows recovering of large DNA fragments, therefore extending beyond the initial targeted biomarker gene sequence and thus facilitating the discovery of new genes or

genomic organizations. Denonfoux and coworkers developed this approach to detect methanogens in deep water layer of a meromictic lake (Denonfoux et al. 2013), by targeting *mcrA* sequences with explorative probes (Dugat-Bony et al. 2012). The enrichment performance (around 50 %) demonstrated the relevance of such method compared to a random shotgun metagenomic approach (0.003 %). Qualitatively, this strategy outperforms the barcoding approach allowing the detection of 17 OTUs not recovered by the amplicon strategy, and among them one *Methanomassiliicoccale*, while 24 OTUs were shared. Gene capture by hybridization gave better results when compared with amplicon sequencing and direct metagenome analysis methods, resulting in the detection of much broader gene diversity. Full-length targeted markers and adjacent regions could be rapidly reconstructed giving new insights on methanogens present in environmental samples and associated metabolic functions. More recently, this gene capture strategy has allowed the uncovering of complete cDNAs to access directly to activities (Bragalini et al. 2014). Therefore, these targeted sequencing methods could be useful in the future to study the gut methanogens in humans, enabling in-depth analysis for each sample, and high throughput, when associated with NGS.

#### NGS for genomics of isolated strains of methanogens

Complete genome data is of course the gold standard for comparison of strains/species of methanogens and allows to reconstruct metabolic pathways and to hypothesize features/properties/functions. Recently in 2011, pan-genome analysis of dominant gut methanogen *Mbs* has been performed in monozygotic and dizygotic twins, and the authors found out that 987 genes were conserved in all strains and 1860 genes were variably represented (Hansen et al. 2011). Pan-genome of *Mbs* also consisted of 101 adhesin-like proteins (ALPs) which showed strain-specific differences in expression and responsiveness to formate. So, it can be postulated that *Mbs* strains use their different repertoires of ALPs to create diversity in their metabolic niches, by allowing them to establish syntrophic relationships with bacterial partners with differing metabolic capabilities (Hansen et al. 2011). This study highlights the need of highly discriminating tools as even a same species (here *Mbs*) can show a high genetic variation among strains retrieved from the same environment (the human gut), so may have variable influence on the host physiology/health. As it relies on a time-consuming first step for strain isolation and that some gut strains of the *Methanomassiliicoccales* order still resist to isolation (our and other works), this direct genome sequencing and genome comparison is however still limited. Single-cell genomics of gut microbes, and more specifically of archaea, will be very likely the best method in the future (Blainey and Quake 2014), but before this time has



came, other approaches are used concomitantly with the exploration of other directions able to generate genomic data.

### NGS for genomics of enrichment cultures

When not directly accessible (means isolated), enrichment cultures may be first performed to increase the relative amount of the methanogens by specific conditions (antibiotics, methanogenesis substrates, gas,...). Using methanogen-positive stools and several rounds of culture with H<sub>2</sub> and methanol, metagenomics by shotgun sequencing was performed directly on these consortia and led to the genome characterization of two methanogens present in the human gut, the *Methanomassiliicoccales* “*Candidatus* Methanomethylophilus alvus” Mx1201 and “*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis” Isoire-Mx1 (Borrel et al. 2012; Borrel et al. 2013a). Moreover, the mean coverage (respectively of 36.9× and 42.7× for “*Candidatus* Methanomethylophilus alvus” Mx1201 and “*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis” Isoire-Mx1 from a quarter plate of a 454 GS FLX Titanium run) was sufficient to obtain the complete draft genome sequence of these two organisms. This strategy was also recently used for a fourth *Methanomassiliicoccales* genome, from a methanogen of the termite gut (*Candidatus* Methanoplasma termitum, Lang et al. 2015). Data generated by this approach allowed the first whole-genome comparisons among three human strains of the *Methanomassiliicoccales* (Borrel et al. 2014b) from which some important genomic, phylogenetic, and biochemical features of this so far unknown methanogenic lineage were deciphered. Of note, these works provided important clues about the use of methylamines in the human gut by these strains, due to (i) a particular genetic machinery for the translational addition of the 22nd amino acid pyrrolysine (Pyl) (Borrel et al. 2014a) and (ii) the presence of genes encoding Pyl-containing methyltransferases, which participate in the methylotrophic methanogenesis from methylamines (see Krzycki 2004; Ambrogelly et al. 2007 and Gaston et al. 2011 for a description of this expansion of the genetic code particularly in some methanogens).

### Genome reconstruction of methanogens from metagenomics studies

NGS technology allows an in-depth sequencing of a sample. Therefore, it may be possible to extend the method described above with enrichment cultures on DNA retrieved from fecal matter or gut biopsies. Theoretically, obtained metagenomics data from one sample contain enough sequence data to allow the alignment in contigs/genomes even at low proportion of some microorganisms. Due to the various level of each microbe/genome within an environment, there is no uniform coverage of all sequence data, and this property

may be used to filter sequences based on sequence frequencies to facilitate the assembly of sequences. This assumption should be modulated as there is no uniform coverage in sequencing depth across a genome in practice. Other difficulties rely on similar repeat regions present in various genomes of one environment and also to sequencing errors that becomes more difficult to handle with when associated to a low coverage of each genome.

This approach was recently shown successful for a new candidate phylum basal to *Cyanobacteria*, whose members have been found 10 years ago in the human gut (Ley et al. 2005). Using gut metagenomics data from three samples composed each of around 115,000,000 reads, the authors were able to obtain four complete genomes and three partial genomes, one of which being near to complete (Di Rienzi et al. 2013). In absence of cultured representatives, it was so far impossible to speculate about the role and properties of these organisms that are prevalent in herbivorous mammals and humans with a vegetarian diet, showing therefore a similar technical problem than the one encountered with *Methanomassiliicoccales*. Using this powerful approach and data inferred from the reconstructed genomes, it was deduced, for example, that this clade (candidate phylum “*Ca. Melainabacteria*”) produces H<sub>2</sub> through a fermentative metabolism, has the capacity to fix nitrogen, and synthesizes several (B and K) vitamins. It however needs to be mentioned that *Melainabacteria* were estimated to form a large part of the community, estimated to about 2 to 4 % which has likely greatly facilitated this approach. Considering this, and due to the lower relative abundance of human gut methanogens, this approach would necessitate a greater number of reads per sample. Alternatively, if the coverage is too low, it is conceivable to pool the metagenomics data from several samples, assuming that the considered methanogen may be shared by several individuals; this may lead to potent mosaic genomes, referred as metagenomic species (MGS) or metagenomic operational taxonomic units (mOTUs) (Sunagawa et al. 2013; Nielsen et al. 2014). Among the 7381 MGS derived from 396 human stool samples of the MetaHit project, one is attributed to a methanogen species: MGS1088 was retrieved from the distal human gut microbiota of the sample MH0012 by an abundance covariance strategy. Sequencing data are composed of 67 contigs varying from 703 to 151,917 bp (median size=14,427 bp) and further organized in 32 scaffolds (genbank NZ\_CBKQ01000000). It represents a total of 1,631,477 bp, from which 1625 coding DNA sequences (CDS) were deduced. It was annotated as a *Methanoculleus* sp., from the *Methanomicrobiales* order, but when checked in detail, these sequences correspond to a species of the *Methanomassiliicoccales* order, more precisely a sister species/a different strain of “*Ca. Methanomethylophilus alvus* Mx1201” (Borrel et al. 2012) with 99 % similarity on the

whole genome (unpublished result). These results highlight the power of such an approach.

The assembly of sequences from metagenomic studies may also be helped by existing genomic data of several related subspecies/species that can be used as a backbone to recover contigs from metagenomes that are consequently related to the reference genome(s). This bottom-up genomic reconstruction may also be conducted with specific markers of the methanogens (*mcrA*, *mtaB*, etc., see above) to recover contigs that are specific to methanogens. As an example, we are currently retrieving genomic data from contigs of human gut metagenomes that harbor some genes of methanogens, and among them, those more specifically belonging to the *Methanomassiliicoccales*. This leads to new partial and total genomic data and allows detection of new variants/subspecies/species of this very poorly known lineage (unpublished data).

### Concluding remarks

Detailed knowledge of gut methanogens involves the more in-depth study of the methanogenic diversity, their symbiotic relationships with other microbial groups, and various other factors that could affect the microbial communities (host genetics, diet, age,...). Molecular approaches based on DNA and RNA examinations are among the most reliable, sensitive, and less time-consuming techniques to determine their diversity. In order to study uncultured methanogens in human gut, future knowledge will likely come from bioinformatic studies of metagenomics data, whose interpretation will need to be confirmed by dedicated, strain/species-specific molecular tools on relevant population samples (Fig. 1). Altogether, these techniques will provide a gateway for gut microbiologists for designing effective and novel strategies which will help them in understanding the role of these methanogens in human health. In our opinion, traditional culture-based techniques are mandatory to be used in conjugation with these advance molecular/bioinformatic techniques to address some peculiar and important points like their interactions with the immune system or the host physiology.

**Acknowledgments** This work was supported by a PhD. Scholarship support from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” to N.G. J.-F.B and P.P.C. thanks the “Université d’Auvergne” for the funding of a post-doctoral fellowship (attributed to P.P.C). P.W.O.T. was supported by Science Foundation Ireland through a Principal Investigator award, by a CSET award to the Alimentary Pharmabiotic Centre, and by an FHRI award to the ELDERMET project by the Dept. Agriculture, Fisheries and Marine of the Government of Ireland. Authors are thankful to Prof. P. Peyret and Dr. E. Peyretailade for their valuable suggestions during the preparation of the manuscript.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

### References

- Abell GC, Conlon MA, McOrist AL (2006) Methanogenic archaea in adult human faecal samples are inversely related to butyrate concentration. *Microb Ecol Health Dis* 18(3–4):154–160
- Ambrogelly A, Palioura S, Söll D (2007) Natural expansion of the genetic code. *Nat Chem Biol* 3(1):29–35
- Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 4(9), e7125
- Bang C, Weidenbach K, Gutschmann T, Heine H, Schmitz RA (2014) The intestinal archaea *Methanospaera stadmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells. *PLoS One* 9(6), e99411
- Baptiste É, Brochier C, Boucher Y (2005) Higher-level classification of the *Archaea*: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1(5):353–363
- Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K (2005) Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* 61(3): 399–412
- Blainey PC, Quake SR (2014) Dissecting genomic diversity, one cell at a time. *Nat Methods* 11(1):19–21
- Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R, Duchaine C (2014) Increased prevalence of *Methanospaera stadmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS One* 9(2), e87734
- Borrel G, Harris HM, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, Peyret P, Gribaldo S, O’Toole PW, Brugère J-F (2012) Genome sequence of “*Candidatus* Methanomethylophilus alvus” Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *J Bacteriol* 194(24):6944–6945
- Borrel G, Harris HM, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, Deane J, Gribaldo S, Bardot O, Peyretailade E (2013a) Genome sequence of “*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis” Issoire-Mx1, a third *Thermoplasmatales*-related methanogenic archaeon from human feces. *Genome Announc* 1(4):e00453–00413
- Borrel G, O’Toole PW, Harris HM, Peyret P, Brugère J-F, Gribaldo S (2013b) Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol* 5(10):1769–1780
- Borrel G, Gaci N, Peyret P, O’Toole PW, Gribaldo S, Brugère J-F (2014a) Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7th order of methanogens: implications for the evolution of a genetic code expansion cassette. *Archaea* 27:374146
- Borrel G, Parisot N, Harris HM, Peyretailade E, Gaci N, Tottey W, Bardot O, Raymann K, Gribaldo S, Peyret P (2014b) Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliicoccales*, a *Thermoplasmatales*-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 15(1):679
- Bragalini C, Ribière C, Parisot N, Vallon L, Prudent E, Peyretailade E, Girlanda M, Peyret P, Marmeisse R, Luis P (2014) Solution hybrid selection capture for the recovery of functional full-length eukaryotic cdnas from complex environmental samples. *DNA Res* 21(6): 685–694
- Brugère J-F, Mihajlovski A, Missaoui M, Peyret P (2009) Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 9(4):353–365
- Brugère J-F, Féria-Gervasio D, Alric M, Tottey W, Popse Z (2011) The ECSIM concept (Environmental Control System for Intestinal Microbiota) and its derivative versions to help better understand human gut biology. In: Gargiulo GD, McEwan A (eds) *Applied Biomedical Engineering*, vol 4, Chap., pp 63–82

- Brugère J-F, Borrel G, Gaci N, Tottey W, O'Toole PW, Malpuech-Brugère C (2014) Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes* 5(1):5–10
- Brune A (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Microbiol* 12(3):168–180
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Tumbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7(5):335–336
- Carbonero F, Benefiel AC, Gaskins HR (2012) Contributions of the microbial hydrogen economy to colonic homeostasis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(9):504–518
- Chaban B, Hill JE (2012) A 'universal' type II chaperonin PCR detection system for the investigation of archaea in complex microbial communities. *ISME J* 6(2):430–439
- Chaudhary PP, Sirohi SK, Kumar S (2011) Improved extraction of quality DNA from methanogenic archaea present in rumen liquor for PCR application. *Asian J Anim Sci* 5(3):166–174
- Chaudhary PP, Dagar SS, Sirohi SK (2012) Comparative quantification of major rumen microbial population in Indian Cattle and Buffalo fed on wheat straws based diet. *Prime J of Microbiol Res* 2(2):105–108
- Chaudhary PP, Wright A-DG, Brablcová L, Buriánková I, Bednářik A, Rulík M (2014) Dominance of *Methanosarcinales* phylotypes and depth-wise distribution of methanogenic community in fresh water sediments of sitka stream from czech republic. *Curr Microbiol* 69(6):809–816
- Ciesielski S, Bulkowska K, Dabrowska D, Kaczmarczyk D, Kowal P, Mozejko J (2013) Ribosomal intergenic spacer analysis as a tool for monitoring methanogenic archaea changes in an anaerobic digester. *Curr Microbiol* 67(2):240–248
- Claesson MJ, O'Toole PW (2010) Evaluating the latest high-throughput molecular techniques for the exploration of microbial gut communities. *Gut Microbes* 1(4):277–278
- Conrad R, Ji Y, Noll M, Klose M, Claus P, Enrich-Prast A (2014) Response of the methanogenic microbial communities in amazonian oxbow lake sediments to desiccation stress. *Environ Microbiol* 16(6):1682–1694
- Denonfoux J, Parisot N, Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, Boucher D, Morgavi DP, Le Paslier D, Peyretailade E, Peyret P (2013) Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA Res* 20(2):185–196
- Deppenmeier U, Lienard T, Gottschalk G (1999) Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett* 457(3):291–297
- Di Rienzi SC, Sharon I, Wrighton KC, Koren O, Hug LA, Thomas BC, Goodrich JK, Bell JT, Spector TD, Banfield JF (2013) The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to *Cyanobacteria*. *Elife* 2, e01102
- Doddema HJ, Vogels GD (1978) Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* 36(5):752–754
- Dridi B, Henry M, El Khéchine A, Raoult D, Drancourt M (2009) High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One* 4(9), e7063
- Dridi B, Fardeau M-L, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M (2012) *Methanomassiliococcus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1902–1907
- Dugat-Bony E, Peyretailade E, Parisot N, Biderre-Petit C, Jaziri F, Hill D, Rimour S, Peyret P (2012) Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environ Microbiol* 14(2):356–371
- Dumont MG, Murrell JC (2005) Stable isotope probing—linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol* 3(6):499–504
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5728):1635–1638
- Feria-Gervasio D, Denis S, Alric M, Brugère J-F (2011) *In vitro* maintenance of a human proximal colon microbiota using the continuous fermentation system P-ECSIM. *Appl Microbiol Biotechnol* 91(5):1425–1433
- Feria-Gervasio D, Tottey W, Gaci N, Alric M, Cardot J-M, Peyret P, Martin J-F, Pujos E, Sébédio J-L, Brugère J-F (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
- Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 65(10):4630–4636
- Franke-Whittle IH, Goberna M, Pfister V, Insam H (2009) Design and development of the ANAEROCHIP microarray for investigation of methanogenic communities. *J Microbiol Methods* 79(3):279–288
- Fricke WF, Seedorf H, Henne A, Krüer M, Liesegang H, Hedderich R, Gottschalk G, Thauer RK (2006) The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol* 188(2):642–658
- Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère J-F (2014) Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World J Gastroenterol* 20(43):16062–16078
- Gaston MA, Jiang R, Krzycki JA (2011) Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine. *Curr Opin Microbiol* 14(3):342–349
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1988) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl Environ Microbiol* 54(11):2750–2755
- Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C (2009) Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 27(2):182–189
- Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, Noyer-Weidner M, Hong G, Bereswill S, Göbel UB (2007) Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* 68(1):94–105
- Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, Gordon JI (2011) Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(15):6252–6257
- Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, Caporaso JG, Knight R, Ley RE (2014a) Conducting a microbiome study. *Cell* 158(2):250–262
- Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT (2014b) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159(4):789–799
- Gorlas A, Robert C, Gimenez G, Drancourt M, Raoult D (2012) Complete genome sequence of *Methanomassiliococcus luminyensis*, the largest genome of a human-associated *Archaea* species. *J Bacteriol* 194(17):4745–4745
- Hales BA, Edwards C, Ritchie DA, Hall G, Pickup RW, Saunders JR (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 62(2):668–675



- Hansen EE, Lozupone CA, Rey FE, Wu M, Guruge JL, Narra A, Goodfellow J, Zaneveld JR, McDonald DT, Goodrich JA (2011) Pan-genome of the dominant human gut-associated archaeon, *Methanobrevibacter smithii*, studied in twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(Supplement 1):4599–4606
- Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD (2013) Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One* 8(6), e66019
- Iino T, Tamaki H, Tamazawa S, Ueno Y, Ohkuma M, Suzuki K, Igarashi Y, Haruta S (2013) *Candidatus* Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliicoccaceae* fam. nov. and *Methanomassiliicoccales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ* 28:244–250
- Illmer P, Reitschuler C, Wagner AO, Schwarzenauer T, Lins P (2014) Microbial succession during thermophilic digestion: the potential of *Methanosarcina* sp. *PLoS One* 9(2), e86967
- Janssen PH, Kirs M (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol* 74(12):3619–3625
- Jaziri F, Parisot N, Abid A, Denonfoux J, Ribière C, Gasc C, Boucher D, Brugère J-F, Mahul A, Hill DR (2014) PhyloPDb: a 16S rRNA oligonucleotide probe database for prokaryotic identification. Database 2014:bau036
- Kim G, Deepinder F, Morales W, Hwang L, Weitsman S, Chang C, Gunsalus R, Pimentel M (2012) *Methanobrevibacter smithii* is the predominant methanogen in patients with constipation-predominant IBS and methane on breath. *Dig Dis Sci* 57(12):3213–3218
- Kittelmann S, Seedorf H, Walters WA, Clemente JC, Knight R, Gordon JI, Janssen PH (2013) Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One* 8(2), e47879
- Klingl A (2014) S-layer and cytoplasmic membrane—exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. *Front Microbiol* 5:624
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19(5):576–585
- Krzycki JA (2004) Function of genetically encoded pyrrolysine in corrinoid-dependent methylamine methyltransferases. *Curr Opin Chem Biol* 8(5):484–491
- Kubota K, Imachi H, Kawakami S, Nakamura K, Harada H, Ohashi A (2008) Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J Microbiol Methods* 72(1):54–59
- Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M (2012) Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 18(12):1185–1193
- Lang K, Schuldes J, Klingl A, Poehlein A, Daniel R, Brune A (2015) Comparative genome analysis of "*Candidatus* Methanoplasma termitum" indicates a new mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 81(4):1338–1352
- Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA (2004) Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16):6176–6181
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31):11070–11075
- Liu Y, Whitman WB (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 1125: 171–89
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230
- Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148(Pt 11):3521–3530
- Ma L, Kim J, Hatzenpichler R, Karymov MA, Hubert N, Hanan IM, Chang EB, Ismagilov RF (2014) Gene-targeted microfluidic cultivation validated by isolation of a gut bacterium listed in human microbiome project's most wanted taxa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(27):9768–9773
- Macfarlane GT, Cummings JH, Macfarlane S, Gibson GR (1989) Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. *J Appl Bacteriol* 67(5):520–527
- Macfarlane GT, Macfarlane S, Gibson GR (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb Ecol* 35(2):180–187
- Mach V, Blaser MB, Claus P, Chaudhary PP, Rulik M (2015) Methane production potentials, pathways, and communities of methanogens in vertical sediment profiles of river Sitka. *Front Microbiol* 6:506
- Mihajlovski A, Alric M, Brugere JF (2008) A putative new order of methanogenic archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res Microbiol* 159(7-8): 516–521
- Mihajlovski A, Dore J, Levenez F, Alric M, Brugere JF (2010) Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ Microbiol Rep* 2(2):272–280
- Miller TL, Wolin MJ (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* 141(2):116–122
- Miller TL, Wolin MJ (1986) Methanogens in human and animal intestinal tracts. *Syst Appl Microbiol* 7(2):223–229
- Miller TL, Wolin MJ, Conway de Macario E, Macario AJ (1982) Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Appl Environ Microbiol* 43(1):227–232
- Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Richet H, Carrieri P, Valero R, Raccach D, Vialettes B, Raoult D (2012) Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes* 36(6):817–825
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2(3):317–322
- Nakamura N, Leigh SR, Mackie RI, Gaskins HR (2009) Microbial community analysis of rectal methanogens and sulfate reducing bacteria in two non-human primate species. *J Med Primatol* 38(5):360–370
- Nam YD, Chang HW, Kim KH, Roh SW, Kim MS, Jung MJ, Lee SW, Kim JY, Yoon JH, Bae JW (2008) Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. *J Microbiol* 46(5):491–501
- Nava GM, Carbonero F, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR (2012a) Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *ISME J* 6(1):57–70
- Nava GM, Carbonero F, Ou J, Benefiel AC, O'Keefe SJ, Gaskins HR (2012b) Hydrogenotrophic microbiota distinguish native africans from african and european americans. *Environ Microbiol Rep* 4(3):307–315
- Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, Plichta DR, Gautier L, Pedersen AG, Le Chatelier E, Pelletier E, Bonde I, Nielsen T, Manichanh C, Arumugam M, Batto JM, Quintanilha Dos Santos MB, Blom N, Borruel N, Burgdorf KS, Boumezebur F, Casellas F, Dore J, Dworzynski P, Guarner F, Hansen T, Hildebrand F, Kaas RS, Kennedy S, Kristiansen K, Kultima JR, Leonard P, Levenez F, Lund O, Moumen B, Le



- Paslir D, Pons N, Pedersen O, Prifti E, Qin J, Raes J, Sorensen S, Tap J, Tims S, Ussery DW, Yamada T, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Bork P, Wang J, Brunak S, Ehrlich SD (2014) Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* 32(8):822–828
- Nocker A, Burr M, Camper AK (2007) Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb Ecol* 54(2):276–289
- O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P (1998) Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52(1):44–49
- Oefner PJ, Underhill PA (1998) DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). In *Current Protocols in Human Genetics*. Wiley, New York, p. **7.10.11–17.10.12**
- Oren A, Garrity GM (2013) List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:3931–3934
- Ouwerkerk D, Klieve AV, Forster RJ (2002) Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. *J Appl Microbiol* 92(4):753–758
- Oxley AP, Lanfrancini MP, Wurdemann D, Ott S, Schreiber S, McGenity TJ, Timmis KN, Nogaes B (2010) Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. *Environ Microbiol* 12(9):2398–2410
- Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E, Peyretailade E, Peyret P (2014) Software tools for the selection of oligonucleotide probes for microarrays. In: He Z (ed) *Microarrays: current technology, innovations and applications*, p 250
- Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A (2012) "*Methanoplasmatales*," *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 78(23):8245–53
- Peng M, Smith AH, Rehberger TG (2011) Quantification of *Propionibacterium acidipropionici* P169 bacteria in environmental samples by use of strain-specific primers derived by suppressive subtractive hybridization. *Appl Environ Microbiol* 77(11):3898–3902
- Pimentel M, Gunsalus RP, Rao Satish SC, Zhang H (2012) Methanogens in human health and disease. *Am J Gastroenterol Suppl* 1:28–33
- Polag D, Leiss O, Keppler F (2014) Age dependent breath methane in the German population. *Sci Total Environ* 481:582–587
- Poulsen M, Schwab C, Jensen BB, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fragner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A, Ulrich T (2013) Methylophilic methanogenic *Thermoplasmata* implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun* 4:1428
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT C, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285):59–65
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403(6770):646–649
- Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, de Vos WM (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(7):1736–1751
- Raymann K, Brochier-Armanet C, Gribaldo S (2015) The two-domain tree of life is linked to a new root for the *Archaea*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. doi:10.1073/pnas.1420858112
- Rettedal EA, Gumpert H, Sommer MO (2014) Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria. *Nat Commun* 5:4714
- Roh SW, Abell GC, Kim KH, Nam YD, Bae JW (2010) Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends Biotechnol* 28(6):291–299
- Romaniuk K, Ziewit LD, Rewniak LD (2014) Molecular markers for detection and phylogenetic analysis of methanogenic consortia. *Goldschmidt Abstracts* 2110
- Sahakian AB, Jee SR, Pimentel M (2010) Methane and the gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 55(8):2135–2143
- Samuel BS, Gordon JI (2006) A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26):10011–10016
- Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JI (2007) Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25):10643–10648
- Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR (2008) Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol* 8:79
- Scavino AF, Ji Y, Pump J, Klose M, Claus P, Conrad R (2013) Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. *Environ Microbiol* 15(9):2588–2602
- Schmitt-Wagner D, Brune A (1999) Hydrogen profiles and localization of methanogenic activities in the highly compartmentalized hindgut of soil-feeding higher termites (*Cubitermes* spp.). *Appl Environ Microbiol* 65:4497–4505
- Seedorf H, Kittelmann S, Henderson G, Janssen PH (2014) RIM-DB: a taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. *PeerJ* 5(2), e494
- Skillman LC, Evans PN, Naylor GE, Morvan B, Jarvis GN, Joblin KN (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10(5):277–285
- Sunagawa S, Mende DR, Zeller G, Izquierdo-Carrasco F, Berger SA, Kultima JR, Coelho LP, Arumugam M, Tap J, Nielsen HB, Rasmussen S, Brunak S, Pedersen O, Guarner F, de Vos WM, Wang J, Li J, Dore J, Ehrlich SD, Stamatakis A, Bork P (2013) Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nat Methods* 10(12):1196–1199
- Tajima K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI (2001) Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiol Lett* 200(1):67–72
- Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS One* 9(8), e105592
- Tewhey R, Nakano M, Wang X, Pabon-Pena C, Novak B, Giuffrè A, Lin E, Happe S, Roberts DN, LeProust EM, Topol EJ, Harismendy O, Frazer KA (2009) Enrichment of sequencing targets from the human genome by solution hybridization. *Genome Biol* 10(10):R116
- Thauer RK (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144:2377–2406
- Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 6(8):579–91
- Totter W, Denonfoux J, Jaziri F, Parisot N, Missaoui M, Hill D, Borrel G, Peyretailade E, Alric M, Harris HM, Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, Peyret P, Brugere JF (2013) The human gut chip

- "HuGChip", an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *PLoS One* 8(5), e62544
- Tottey W, Gaci N, Borrel G, Alric M, O'Toole PW, Brugère JF (2015) *In vitro* model for studying methanogens in human gut microbiota. *Anaerobe* 34:50–52
- Tu Q, He Z, Li Y, Chen Y, Deng Y, Lin L, Hemme CL, Yuan T, Van Nostrand JD, Wu L, Zhou X, Shi W, Li L, Xu J, Zhou J (2014) Development of HuMiChip for functional profiling of human microbiomes. *PLoS One* 9(3), e90546
- Venema K, van den Abbeele P (2013) Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(1):115–126
- Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP (2009) T-RFLP-based *mcrA* gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel *Methanobrevibacter* phylo-type. *Oral Microbiol Immunol* 24(5):417–422
- Walker A, Cerdeno-Tarraga A, Bentley S (2006) Faecal matters. *Nat Rev Microbiol* 4(8):572–573
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16):5261–5267
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lysis AJ, Hazen SL (2011) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472(7341):57–63
- Weinstock GM (2012) Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature* 489(7415):250–256
- Zelege J, Lu SL, Wang JG, Huang JX, Li B, Ogram AV, Quan ZX (2013) Methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) gene-based investigation of methanogens in the mudflat sediments of Yangtze River estuary, China. *Microb Ecol* 66(2):257–267
- Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7):2365–2370

## ANNEXE 3

# Genome Sequence of “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Isoire-Mx1, a Third *Thermoplasmatales*-Related Methanogenic Archaeon from Human Feces

Guillaume Borrel,<sup>a,b</sup> Hugh M. B. Harris,<sup>b</sup> Nicolas Parisot,<sup>a</sup> Nadia Gaci,<sup>a</sup> William Tottey,<sup>a</sup> Agnès Mihajlovski,<sup>a</sup> Jennifer Deane,<sup>b</sup> Simonetta Gribaldo,<sup>c</sup> Olivier Bardot,<sup>d</sup> Eric Peyretailade,<sup>a</sup> Pierre Peyret,<sup>a</sup> Paul W. O’Toole,<sup>b</sup> Jean-François Brugère<sup>a</sup>

EA-4678 CIDAM, Conception Ingénierie et Développement de l’Aliment et du Médicament, Clermont Université, Université d’Auvergne, Clermont-Ferrand, France<sup>a</sup>; Department of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Cork, Ireland<sup>b</sup>; Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles, Institut Pasteur, Paris, France<sup>c</sup>; GReD, CNRS UMR 6923, INSERM UMR 1103, Clermont Université, Université d’Auvergne, Clermont-Ferrand, France<sup>d</sup>

“*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Isoire-Mx1 is a methanogenic archaeon found in the human gut and is a representative of the novel order of methanogens related to *Thermoplasmatales*. Its complete genome sequence is presented here.

Received 24 May 2013 Accepted 7 June 2013 Published 11 July 2013

**Citation** Borrel G, Harris HMB, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, Deane J, Gribaldo S, Bardot O, Peyretailade E, Peyret P, O’Toole PW, Brugère J-F. 2013. Genome sequence of “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Isoire-Mx1, a third *Thermoplasmatales*-related methanogenic archaeon from human feces. *Genome Announc* 1(4):e00453-13. doi:10.1128/genomeA.00453-13.

**Copyright** © 2013 Borrel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Jean-François Brugère, [jf.brugere@udamail.fr](mailto:jf.brugere@udamail.fr).

In recent years, growing evidence from culture-independent studies has suggested that methanogens associated with the human gut are far more diverse than was thought (1–4) and partly belong to a *Thermoplasmatales*-related lineage (2). The methanogenic nature of this lineage was confirmed by the description of *Methanomassiliicoccus luminyensis* strain B10, isolated from human feces (5). Another methanogen of this *Thermoplasmatales*-related lineage, “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*” Mx1201, was also cultured from human feces and was found to be distantly related to *M. luminyensis*. The genomes of both were recently sequenced (6, 7).

A highly enriched culture of “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Isoire-Mx1 was obtained by the same procedure followed for “*Ca. Methanomethylophilus alvus*” (6). This archaeon is distantly related to “*Ca. Methanomethylophilus alvus*” and is closely related to *M. luminyensis*, with 87% and 98% of 16S rRNA gene sequence identity, respectively. The affiliation of *M. luminyensis* and “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” to a large cluster of sequences retrieved from paddy soils and freshwater and marine sediments suggests their recent adaptation to gut environments.

A 3-kb mate-paired library was constructed and sequenced from a quarter plate of a 454 GS FLX Titanium run (Macrogen, Republic of Korea). A total of 283,279 reads corresponding to 125.5 Mb were obtained. The reads were assembled with Newbler (v2.3), first in 28 contigs (average depth coverage of 42.7-fold) and then in a unique scaffold. The gaps between the contigs were closed by sequencing. The open reading frames were predicted with Glimmer 3 (8), were annotated using RAST (9), and were manually curated.

“*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” has a circular genome of 1,931,561 bp, with a G+C content of 41.3%. Despite its close phylogenetic relationship with *M. luminyensis*, the genome of “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” is 27% smaller and its

G+C content is 20% lower than that of *M. luminyensis*. This suggests a fast genomic reshuffle in one of the two genomes, which may be due to differential adaptation to the gut environment. The “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” genome contains 46 tRNA genes, a single copy of the 16S and 23S rRNA genes, and 2 noncontiguous copies of 5S rRNA genes that were distant from the 23S and 16S rRNA genes. A total of 1,820 protein-coding sequences were predicted. A clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) region containing 110 spacers was identified using CRISPRfinder (10), in close association with *cas* genes. The genome of “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” contains one *mcr* operon (*mcrBDGA*) and a *mcrC* gene distantly located from it. Genes involved in methylotrophic methanogenesis from methanol (*mtaABC*) and methylamine compounds (*mtmBC*, *mtbBC*, and *mttBC*) are also present. The latter are on an 18.7-kb region also containing the genes involved in pyrrolysine biosynthesis. The sequence of “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” offers a great opportunity to determine the metabolic properties and phenotypic features of this poorly characterized order of methanogens related to *Thermoplasmatales*, and it will further help to identify the genomic adaptations of methanogens to gut environments.

**Nucleotide sequence accession number.** The draft genome sequence of “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Isoire-Mx1 has been deposited in GenBank under the accession no. CP005934.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Mansoor, P. Denozi, and their team of the Centre Hospitalier Paul Ardier in Isoire, France, for their valuable help in collecting feces samples.

This work was supported by two PhD scholarship supports, one from the French Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche to N.G., and the other from the European Union (EU) and the Auvergne

Council to W.T. (FEDER). P.W.O. was supported by Science Foundation Ireland through a Principal Investigator award, and through a Department of Agriculture Food and Marine and Health Research Board FHRI award to the ELDERMET project.

We have no conflicts of interest to declare.

## REFERENCES

1. Scanlan P, Shanahan F, Marchesi J. 2008. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol.* 8:79. doi:10.1186/1471-2180-8-79.
2. Mihajlovski A, Alric M, Brugere JF. 2008. A putative new order of methanogenic archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* 159:516–521.
3. Mihajlovski A, Dore J, Levenez F, Alric M, Brugere JF. 2010. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ. Microbiol. Rep.* 2:272–280.
4. Nava GM, Carbonero F, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR. 2011. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *ISME J.* 6:57–70.
5. Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. 2012. *Methanomassiliococcus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1902–1907.
6. Borrel G, Harris HMB, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, Peyret P, O'Toole PW, Brugere JF. 2012. Genome sequence of “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*” Mx1201, a methanogenic archaea from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *J. Bacteriol.* 194:6944–6945.
7. Gorlas A, Robert C, Gimenez G, Drancourt M, Raoult D. 2012. Complete genome sequence of *Methanomassiliococcus luminyensis*, the largest genome of a human-associated archaea species. *J. Bacteriol.* 194:4745.
8. Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* 23:673–679.
9. Aziz R, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards R, Formsma K, Gerdes S, Glass E, Kubal M. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. doi:10.1186/1471-2164-9-75.
10. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. 2007. CRISPRfinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 35:W52–W57. doi:10.1093/nar/gkm360.



## ANNEXE 4

## Research Article

# Unique Characteristics of the Pyrrolysine System in the 7th Order of Methanogens: Implications for the Evolution of a Genetic Code Expansion Cassette

Guillaume Borrel,<sup>1,2</sup> Nadia Gaci,<sup>1</sup> Pierre Peyret,<sup>1</sup> Paul W. O'Toole,<sup>2</sup> Simonetta Gribaldo,<sup>3</sup> and Jean-François Brugère<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IEA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, Place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Western Road, Cork, Ireland

<sup>3</sup>Institut Pasteur, Department of Microbiology, Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France

Correspondence should be addressed to Jean-François Brugère; [jf.brugere@udamail.fr](mailto:jf.brugere@udamail.fr)

Received 30 August 2013; Accepted 19 October 2013; Published 27 January 2014

Academic Editor: Kyung Mo Kim

Copyright © 2014 Guillaume Borrel et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pyrrolysine (Pyl), the 22nd proteogenic amino acid, was restricted until recently to few organisms. Its translational use necessitates the presence of enzymes for synthesizing it from lysine, a dedicated amber stop codon suppressor tRNA, and a specific aminoacyl tRNA synthetase. The three genomes of the recently proposed Thermoplasmata-related 7th order of methanogens contain the complete genetic set for Pyl synthesis and its translational use. Here, we have analyzed the genomic features of the Pyl-coding system in these three genomes with those previously known from *Bacteria* and *Archaea* and analyzed the phylogeny of each component. This shows unique peculiarities, notably an *amber* tRNA<sup>Pyl</sup> with an imperfect anticodon stem and a shortened tRNA<sup>Pyl</sup> synthetase. Phylogenetic analysis indicates that a Pyl-coding system was present in the ancestor of the seventh order of methanogens and appears more closely related to *Bacteria* than to *Methanosarcinaceae*, suggesting the involvement of lateral gene transfer in the spreading of pyrrolysine between the two prokaryotic domains. We propose that the Pyl-coding system likely emerged once in *Archaea*, in a hydrogenotrophic and methanol-H<sub>2</sub>-dependent methylotrophic methanogen. The close relationship between methanogenesis and the Pyl system provides a possible example of expansion of a still evolving genetic code, shaped by metabolic requirements.

## 1. Introduction

Protein synthesis relies on 20 canonical amino acids encoded accordingly to a genetic code, each codon being recognized by an aminoacyl-tRNA. The molecular basis of the genotype to phenotype correspondence relies on the conjunction of tRNAs and of aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS). Post-translational modifications of amino acids extend the chemical nature of proteins with functional implications in cellular processes [1, 2]. Another naturally occurring mechanism expands the genetic code to 22 amino acids by adding Selenocysteine (Sec, 2-selenoalanine) [3, 4] and Pyrrolysine (Pyl, 4-methyl-pyrroline-5-carboxylate linked to the <sup>ε</sup>N of

lysine through an amide linkage) [5, 6]. Sec is present in many organisms from the three domains of life [7] with potentially almost a quarter of sequenced bacteria synthesizing it [8]. It is at least present in two orders of Euryarchaeota, the methanogens *Methanococcales* and *Methanopyrales* [9, 10]. Its synthesis and incorporation differ from other amino acids, as it is synthesized after a serine has been branched into tRNA<sup>Sec</sup><sub>UCA</sub> (recognizing the *opal* codon UGA) that is next modified into a Sec-tRNA<sup>Sec</sup><sub>UCA</sub>.

In contrast, Pyl is restricted to a very small number of organisms and proteins. It necessitates a complex system with specialized enzymes for biosynthesis of Pyl, a dedicated tRNA and an associated unique aaRS [11, 12]: Pyl is first synthesized



as a free amino acid in the cell by the products of the *pylBCD* genes [13, 14] from two lysines, one being methylated into 3-methylornithine (catalyzed by PylB, a lysine mutase-proline-2 methylase) and condensed to the second lysine to form 3-methylornithinyl-N<sup>6</sup>-lysine (PylC, Pyrrolysine synthetase) [15]. The pyrrole ring is then formed by oxidation with an atypical dehydrogenase, the Proline reductase (also called Pyl synthase, PylD) [16], with concomitant release of an amino group during the cycle formation. The gene product of *pylT* forms a dedicated tRNA used for the translational incorporation of Pyl. It is an amber decoding tRNA<sub>CUA</sub> [6], showing some unusual features compared to other tRNAs [11, 17–19]: the anticodon stem is longer (6 nucleotides instead of 5), while other parts are shorter: D-loop with only 5 bases, acceptor, and D-stems separated by one base instead of 2 and a variable loop of only 3 bases. Moreover, differing from almost all tRNAs, the D-loop does not contain the G<sub>18</sub>G<sub>19</sub> bases nor the usual T<sub>54</sub>Ψ<sub>55</sub>C<sub>56</sub> bases in the T-loop. Finally, the aaRS encoded by *pylS* catalyzes the ligation of Pyl to its cognate tRNA species warranting the right correspondence between DNA and proteins. The anticodon of the tRNA seems not to be recognized by the PylRS, at least in *D. hafniense* [20]. Whereas the archaeal PylRS is encoded by a single gene (*pylS*), the bacterial PylRS is encoded by two genes, *pylSn* for the first N-terminal 140 amino acids and *pylSc* for the remaining sequence. This pyrrolysyl-tRNA synthetase belongs to the class II aaRS and its structure has been resolved, with and without its substrates/analogs [17, 21–24]. It has likely a homodimeric or homotetrameric quaternary structure.

To date, Pyl-containing proteins have been found only in the methanogens of the family Methanosarcinaceae and in a few bacteria belonging to Firmicutes and two members of deltaproteobacteria, *Bilophila wadsworthia* and an endosymbiont of the worm *Olavius algarvensis* [25]. Pyl is present almost specifically in the methyltransferases (MT) involved in the methanogenesis pathway from monomethyl-, dimethyl-, and trimethylamine in methanogens, respectively, encoded by the genes *mtmB*, *mtbB*, and *mttB* [26, 27] and in their bacterial homologs, whose function is unclear. However, many bacteria harbor *mttB* homologs that lack the in-frame amber codon and the Methanosarcinales *Methanococcoides burtonii* has *mttB* genes with and without an in-frame amber codon [11, 25]. In contrast, the *mtbB* gene is almost exclusively present in Methanosarcinales and harbors an in-frame amber codon. The *mtmB* gene represents an intermediary case, with a few Pyl-containing bacteria possessing it, leading either to a MT with Pyl (*Acetohalobium arabaticum*, *Desulfotomaculum acetoxidans*) or not (*Bilophila wadsworthia*) [25].

The existence of a 7th order of methanogens related to Thermoplasmatales was proposed from molecular data of 16S rRNA and *mcrA* (methanogenesis marker) sequences retrieved from human stools [28, 29]. This is strengthened by growing molecular data from various environments [30, 31] and by phylogenomics studies [32] established from the first genomes of members of this clade [33, 34]. Moreover, a first member of this order, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, has been isolated and grows on methanol + H<sub>2</sub> [35]. We identified the presence of genes for methanogenesis from methanol and

also from dimethylsulfide and methylamines in the two other sequenced genomes (“*Candidatus* Methanomethylphilus alvus” [33], “*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis” [36]), together with the Pyl-coding genes and in-frame amber codon in the *mtmB*, *mtbB*, and *mttB* genes of these three species. It has now been shown that the H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis from trimethylamine is effective for *M. luminyensis* [37]. Also, ruminal methanogens of the same lineage as “*Ca. M. alvus*” (Rumen Cluster C, or RCC), when cultured in consortia with trimethylamine (TMA), show an increase of methanogenesis and mRNAs for MTs, with an amber in-frame codon, are detected [38]. Altogether, this greatly suggests the presence of Pyl in these MTs.

The recent uncovered lineage with all the features needed for Pyl encoding and use, representing a new archaeal methanogenic Order, provides an opportunity to better understand the origin, distribution, and diversity of Pyrrolysine-coding systems.

## 2. Materials and Methods

Genomic sequence data were obtained through GenBank. For the 7th order, Thermoplasmata-related methanogens, the accession numbers are CP004049.1 (“*Ca. Methanomethylphilus alvus*”), CP005934.1 (“*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*”), and NZ\_CAJE0100001 to NZ\_CAJE0100026 (*Methanomassiliicoccus luminyensis*). For the genomic organization and comparison of *pyl* genes, genomic sequences were either treated with the RAST annotation server [39] or a local Artemis platform [40]. Blast searches [41] were either performed directly on the RAST server, on the nr database at NCBI or locally. Sequence alignment (DNA, RNA, and proteins) was performed using ClustalW [42], T-coffee [43], and MUSCLE [44]. For RNAs, the dedicated R-Coffee program was also used [45], accessible at <http://www.tcoffee.org/>, which generates a multiple sequence alignment using structural information. RNAfold [46] (available at <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) and RNAstructure [47] (available at <http://rna.urmc.rochester.edu/>) were used to determine the secondary structure of tRNA. The structure of the tRNA<sup>Pyl</sup> was also manually drawn by comparison with the structure of the *D. hafniense* and *M. acetivorans* tRNA<sup>Pyl</sup> [11, 20]. Phylogenies were both inferred from maximum likelihood and Bayesian procedures. Datasets of protein homologues were aligned by MUSCLE [44] with default parameters, and unambiguously aligned positions were automatically selected by using the BMGE software for multiple-alignment trimming [48] with a BLOSUM30 substitution matrix. Maximum likelihood trees were calculated by PhyML [49] and the LG amino acid substitution model [50] with 4 rate categories as suggested by the AIC criterion implemented in Treefinder [51]. Trees were also calculated by Bayesian analysis with PhyloBayes [52], with the LG model (for single gene trees) or the CAT model (for the concatenated dataset) and 4 categories of evolutionary rates. In this case, two MCMC chains were run in parallel until convergence and the consensus tree was calculated by removing the first 25% of trees as burnin.

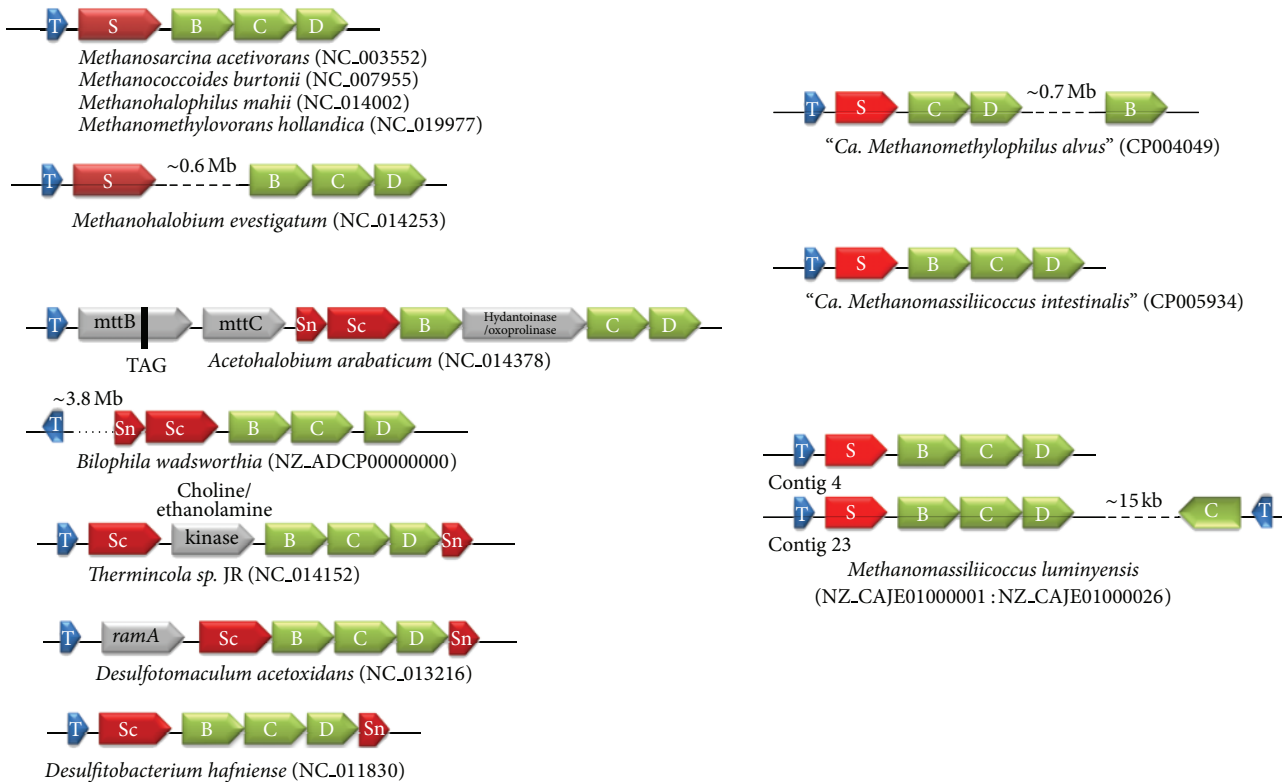


FIGURE 1: Gene organization of the Pyl system. On the left, the gene organization of the *pylBCD* and *pylS* (*pylSc* and *pylSn* in bacteria) is shown for Methanosarcinaceae and some representative bacteria (adapted and updated from [11, 13, 53]). On the right is shown the organization of these genes in the 7th order of methanogens.

### 3. Results

**3.1. Genomic Organization of the *pyl* Genes.** The *pyl* genes usually occur in close association in archaeal and bacterial genomes [11, 53]. In archaeal genomes, they form a cluster *pylTSBCD* that is not interrupted by other genes, except for *Methanohalobium evestigatum* (Figure 1). In bacterial genomes, the *pyl* genes are generally organized as *pylTScBCDSn* or *pylSnScBCD*. Moreover, the cluster can be interrupted by one or several genes. Each of the three genomes affiliated to 7th order of methanogen displays a distinct organization of the *pyl* genes. “*Ca. M. intestinalis*” has a single *pyl* cluster akin to the general organization observed in most of the Methanosarcinales. Two copies of an identically organized cluster are also found in *M. luminyensis* (contigs 4 and 23), together with a third isolated copy of *pylC* and *pylT* present 15 kb away on the complementary strand (contig 23). In the “*Ca. M. alvus*” genome, the *pyl* genes occur in single copy and the *pylB* gene is ~0.7 Mb distant from the *pylTSCD* cluster (Figure 1).

Usually, these genes are closely associated with the methylamines MT genes (*mtmB*, *mtbB*, and *mttB*) and other genes involved in these pathways (which do not encode Pyl-containing proteins). A similar gathering of the *pyl* genes cluster with the genes involved in methylotrophic methanogenesis, including *mtmB*, *mtbB*, and *mttB* is observed in the genomes of the 7th order of methanogens (data not shown).

**3.2. *tRNA<sup>Pyl</sup>*.** The *tRNA<sup>Pyl</sup>* homologues were retrieved from the three 7th order genomes by using the *tRNA<sup>Pyl</sup>* of *Methanosarcina barkeri* strain MS-DSM 800 (Accession number AY064401.1) as seed. As mentioned above the “*Ca. M. alvus*” and “*Ca. M. intestinalis*” genomes harbor one *pylT* gene, while three are present in the *M. luminyensis* genome (Figure 1). The third *tRNA<sup>Pyl</sup>* of *M. luminyensis* shows no typical stem-loop structures of tRNAs using dedicated bioinformatics tools [54] and is therefore likely a pseudogene. On the contrary, the remaining tRNAs from the three genomes all have a similar shape, different from previously known *tRNA<sup>Pyl</sup>* and with stabilities comprised between  $-28.5$  and  $-23.5$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Figure 2). The D-loop already shortened to 5 bases in other *tRNA<sup>Pyl</sup>* is here even shorter, with 4 bases in “*Ca. M. alvus*” and in one of the *M. luminyensis* sequences (contig 4, *tRNA<sup>Pyl</sup>* no. 1) and even with 3 bases in “*Ca. M. intestinalis*” and in one of the *M. luminyensis* sequences (contig 23, *tRNA<sup>Pyl</sup>* no. 2). The acceptor- and D-stems are either not separated (“*Ca. M. alvus*”) or separated by one (“*Ca. M. intestinalis*”; *tRNA<sup>Pyl</sup>* no. 2 of *M. luminyensis*) or two bases (*tRNA<sup>Pyl</sup>* no. 2 of *M. luminyensis*). The variable loop is conserved in all sequences and is equivalent to that of *D. hafniense*, formed of the three bases CAG. In the anticodon loop, the adjacent base of the anticodon CUA is A in “*Ca. M. alvus*” as observed in *D. hafniense* and *M. barkeri* and C in the two other species. However, the most striking feature

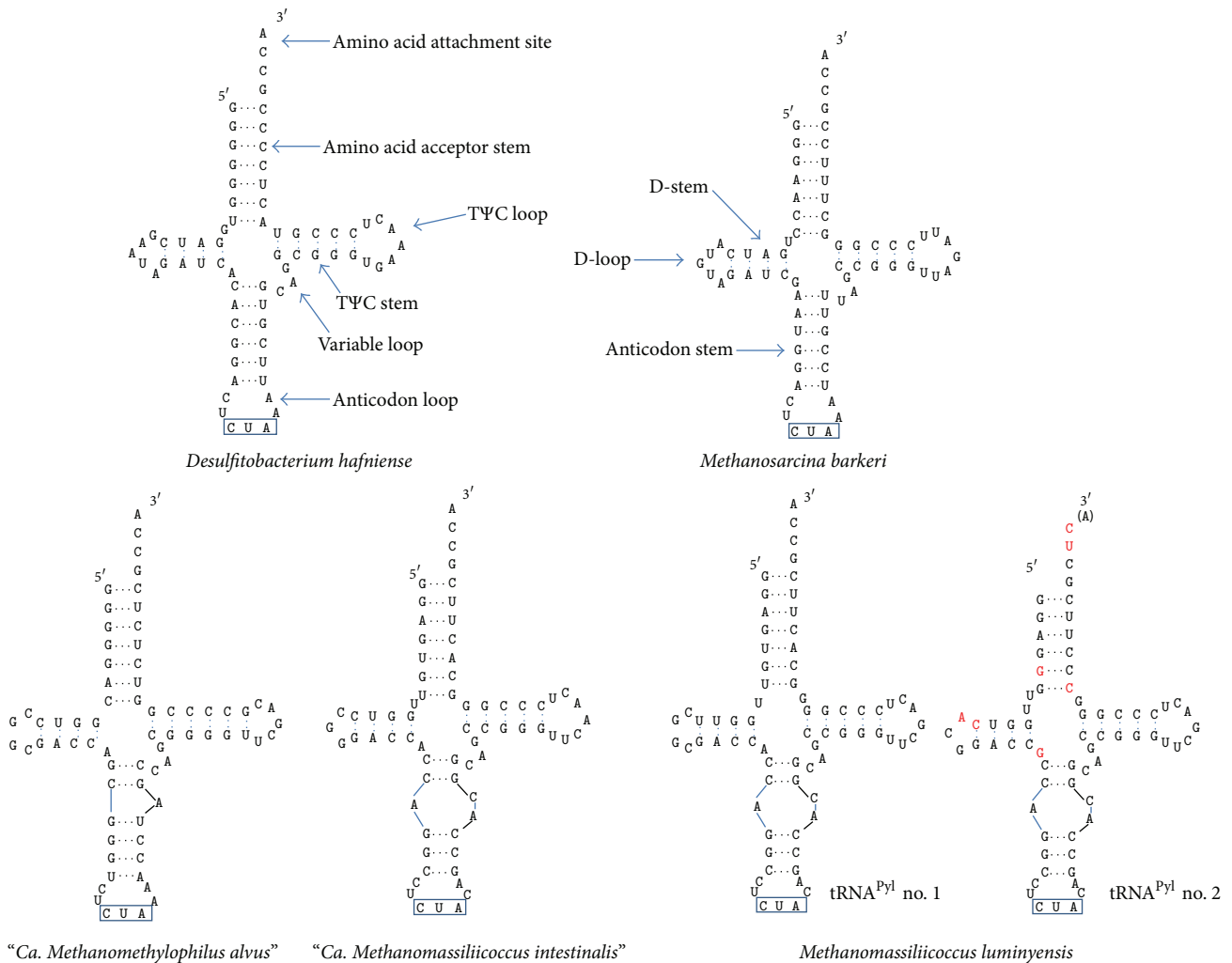


FIGURE 2: Secondary structure of the tRNA<sup>Pyl</sup> in the Thermoplasmata-related 7th order. The stem-loop structure of the tRNA<sup>Pyl</sup> in the 7th methanogenic order is shown, in comparison with the structure in bacteria (*Desulfitobacterium hafniense*, left) and in Methanosarcinaceae (*Methanosarcina barkeri*, right). The name of each region of the tRNA is indicated. The anticodon CUA (corresponding to the *amber* codon) is outlined in blue. For the two tRNA<sup>Pyl</sup> in *M. luminyensis*, the modified bases in no. 2 compared to no. 1 are written in red. Adapted and updated from [11, 13].

is the anticodon stem which is broken in all the tRNA<sup>Pyl</sup> observed in the 7th order of methanogens. This forms a small loop with a different shape in “*Ca. M. alvus*” and in “*Ca. M. intestinalis*”/*M. luminyensis* (Figure 2).

**3.3. *pyl*-tRNA Synthetase.** The *pylS* gene encoding the Pyl-tRNA synthetase PylRS is a class II-aaRS (subclass IIc) [21]. The four homologues present in the three genomes are shortened in their 5' end compared to their Methanosarcinales counterparts (usually around 420–460 AA) and encode, respectively, 275 amino acids in “*Ca. M. alvus*”, “*Ca. M. intestinalis*”, and for one of the two PylRS of *M. luminyensis*, and 271 amino acids (or possibly 308 due to uncertainty of the start codon) for the second. This should lead to an N-ter truncated protein with ~140 residues less, similar to the PylSc proteins that are present in bacteria. We could not identify in any of the three complete genomes a gene encoding a protein

similar to these ~140 N-terminal residues present in the Methanosarcinaceae PylS or the bacterial PylSn. Moreover, we found no homologue in these genomes of the particular domain TIGR03912 that is present in archaeal PylS and bacterial PylSn proteins and that enhances the interaction of the tRNA synthetase to its specific tRNA [55]. These particular features of the PylRS may be linked to the peculiar characteristics of the tRNA<sup>Pyl</sup> and suggest a different kind of interaction.

**3.4. Phylogenetic Analysis.** Phylogenetic analysis was carried out with each of the Pyl gene products by recovering all homologues available in current sequence databases. It appears that bacterial members belong to related Firmicutes species, and a single deltaproteobacterium, *Bilophila wadsworthia*, a common resident of the gut. For PylC, PylD, and PylS, no evident closely related homologues

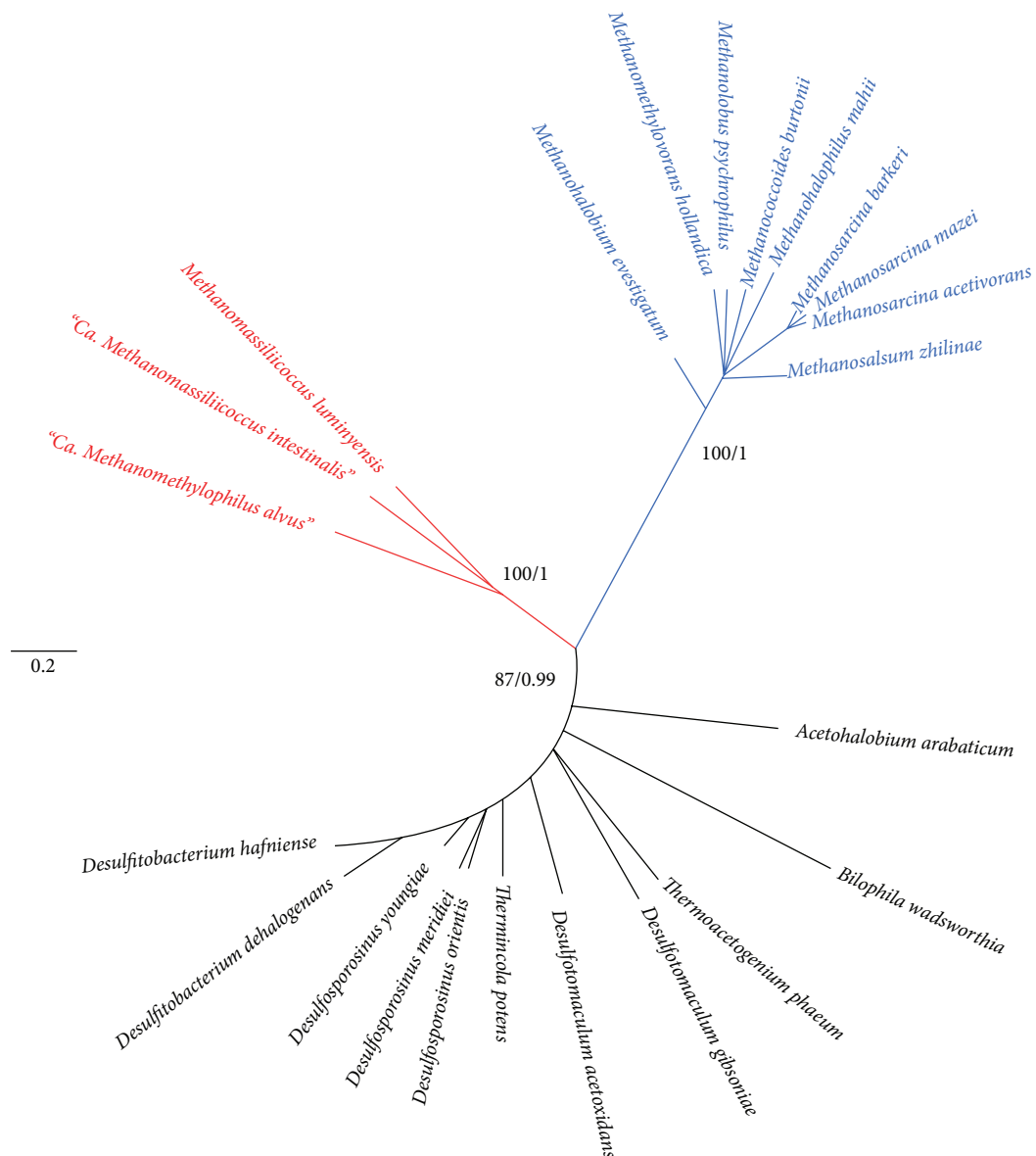


FIGURE 3: Phylogenetic trees of the *pylSCD* gene products. The phylogenetical analysis (PhyML) was performed from a concatenation (672 positions). See Sections 2 and 3 for more details. Individual trees are also reported in the additional file (supplementary Figures S1 to S3 with indication of the corresponding accession numbers). The 7th methanogenic order members are indicated in red, the Methanosarcinaceae in blue, and the bacteria in black.

could be found outside of the known Pyl-containing organisms, whereas PylB had a few distant homologues in various bacteria (not shown). Pyl proteins are very well conserved at the sequence level among *Archaea* and *Bacteria* (alignments are available on request from the authors). The PylC, PylD, and PylS datasets gave consistent results (additional files, Figures S1 to S3 available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/374146>) and were therefore concatenated to provide increased phylogenetic signal (Figure 3). “Ca. *M. alvus*”, “Ca. *M. intestinalis*,” and “*M. luminyensis*” form a robustly supported monophyletic cluster, indicating a common origin of the Pyl system in the 7th methanogenic order. The products of the two *pyl* gene clusters of

*M. luminyensis* (including the third extra PylC) are more closely related among them than to the other sequences, indicating that they originated from a specific duplication. Methanosarcinaceae and bacterial sequences also form two distinct and robustly supported monophyletic clusters. Moreover, the sequences from the 7th methanogenic order appear to be more closely related to their bacterial counterparts than to Methanosarcinaceae (Figure 3).

Concerning PylB, phylogenetic analyses gave more ambiguous results, with a poorly supported branching of the 7th methanogenic order within Bacteria, and different inferred evolutionary relationships according to exclusion or inclusion of the distant bacterial outgroup (data not shown).



An unrooted PhyML phylogenetic tree inferred exclusively from PylB (without the distant bacterial outgroup) is given in the additional file Figure S4.

#### 4. Discussion

We have shown here that all the genetic components for Pyl synthesis and use are present in a new order of Archaea performing methylotrophic methanogenesis from methanol and methylamines, therefore enlarging the taxonomic distribution of this genetic code expansion cassette. Moreover, this Pyl system has unique features and appears more closely related to the bacterial one than to those present in Methanosarcinaceae. Whether or not the Pyl system is active in these archaeons is beyond the scope of this paper. However, there are many arguments supporting a functional system. These include, for the three genomes available and analyzed to date, at least the global presence of all the genes for Pyl synthesis, charging and cotranslational incorporation, in cooccurrence with all the genes for methylotrophic methanogenesis from methylamines, that is, those coding for methylamines-corrinoid protein methyltransferases (MT) genes (*mtmB*, *mtbB*, and *mttB*) all bearing an in-frame *amber* codon. It is interesting to note that, as a nonsense (stop) codon, the *amber* codon is used with a low frequency, this value being maximal in the *M. luminyensis* genome, with only 11% of stop codon being an *amber* one. It is likely an adaptive strategy to the presence of the Pyl system in this order, similarly to what is observed in Methanosarcinaceae, but different from Bacteria: these last deal with the presence of Pyl through regulation rather than codon avoidance [25]. Ability to metabolize TMA into methane has been shown for *M. luminyensis* [37]. Moreover, it has also been shown that methylotrophic methanogenesis from methylamines is active in the rumen, very likely carried out by Rumen Cluster C, members of the 7th order of methanogens which are close neighbors or similar to “*Ca. M. alvus*” [38]. This is therefore conceivable that methylotrophic methanogenesis is constitutive of this whole order by dedicated MTs containing Pyl. The presence of unique features in the Pyl system in these archaeons raises the exciting question of how it functions. PylRS harbors a shorter form, more closely related to the product of the bacterial *pylSc* gene than to the C-terminus of the PylS present in Methanosarcinaceae, and lacks the ~140 amino acids equivalent to the bacterial *pylSn* or to the N-terminal of the archaeal PylS. Bacterial PylSn and the Nter part of Methanosarcinaceae PylRS contain the protein domain TIGR03912 [55]. In the three genomes of the 7th order of methanogens, no CDS containing this peculiar domain was found by an InterProScan analysis [56]. The lack of these elements in the tRNA<sup>Pyl</sup> synthetase (PylSn-TIGR03912 domain) indicate that PylRS must solely rely on a homomeric structure and might be able to fulfill this role without the domain corresponding to PylSn. Indeed, it has been shown that the *D. hafriense* PylSc is alone sufficient to charge a cognate tRNA<sup>Pyl</sup> with an analogue of pyrrolysine in a recombinant system [20]. Alternatively, it may rely on the presence of a yet unknown enhancing

component. Also exciting are the sequence and inferred structure of the tRNA<sup>Pyl</sup>: its extremely condensed nature, with a peculiar broken anticodon stem is of concern for future functional and evolutionary studies, together with the molecular mechanisms which sustain this orthogonal code between the tRNA<sup>Pyl</sup> and the PylRS. The peculiar structure of the tRNA<sup>Pyl</sup> may strengthen the interaction with its cognate PylRS and be an adaptation following the loss of the PylSn domain. Alternatively, mutations in the sequence of the tRNA<sup>Pyl</sup> may have led to the loss of the PylSn. However, it is also possible that this domain was never present in the Pyl system of these archaeons. In any case, active or not, the well-supported monophyly of the Pyl encoding genes in the three genomes argue for their presence in their common ancestor. Because these represent at least two distinct clades [32], this indicates the likely presence of a Pyl system early in the 7th order of methanogens or even in the ancestor of the whole order. The same conclusion stands also for the Methanosarcinaceae.

How the 22nd proteogenic amino acid Pyrrolysine was added to the genetic code is an exciting question. Based on experimental data, it has been proposed that the universal codon catalog was anterior to the aminoacylation systems [57]. 3D structure-based phylogeny of PylRS has led to the suggestion that it was already present in the last universal common ancestor (LUCA) of all present-day life beings and has a common origin with the phenylalanine tRNA synthetase PheRS [21]. If true, this would mean that Pyl was inherited from the LUCA and retained only in the few present-day methylamines-utilizing bacterial and archaeal species. Similarly, Fournier and colleagues proposed that Pyl originated in a pre-LUCA lineage representing a yet unidentified or more probably extinct 4th domain of life [58–60]. In this hypothesis, Pyl would have been acquired in a few *Bacteria* and *Archaea* via several independent lateral gene transfers (LGT) from members of this hypothetical 4th domain of life. However, its highly specific function and restricted distribution make it more likely that the addition of Pyl is as a more recent event.

The strong link of the Pyl system with methanogenesis, especially the methylotrophic one, argues for a common evolutionary history. Pyl is now essential for methylotrophic methanogenesis from methylamines, while methylotrophic methanogenesis from methanol is independent of Pyl. Pyl has been found in *Archaea* almost exclusively in the methyltransferases involved in methanogenesis from mono-, di-, and tri-methylamines (MtmB, MtbB, and MttB). Moreover, *pyl* genes and *mtm-mtb-mtt* genes are clustered in the genomes of methylamines-utilizing archaeal *species*; therefore, a stimulating hypothesis is that genes necessary for Pyl synthesis/incorporation and for methylotrophic methanogenesis from methylamines have coevolved, whereas this was not the case for methylotrophic methanogenesis from methanol, which is independent of pyrrolysine-containing enzymes.

Methanogenesis is believed to have arisen early in the evolution of Euryarchaeota, likely after the divergence of Thermococcales, and to have been lost several times independently in various lineages (e.g., Halobacteriales,

Archaeoglobales, and Thermoplasmatales) [32, 61, 62]. The first form of methanogenesis might have been the hydrogenotrophic one (present in the class I methanogens composed of Methanopyrales, Methanobacteriales, and Methanococcales), while other types of methanogenesis (methylotrophic non-H<sub>2</sub>-dependent and acetoclastic, involving cytochromes) would have emerged later. Based on phylogenomic studies, we have recently shown that the pathway for methylotrophic methanogenesis, at least from methanol, was already present in the ancestor of Methanobacteriales, in the ancestor of the 7th order, and in the ancestor of Methanosarcinales, which is the common ancestor of most euryarchaeal lineages excluding Thermococcales [32]. Therefore, H<sub>2</sub>-dependent methylotrophic methanogenesis from methanol may also be an ancient type of methanogenesis. The fact that it does not involve cytochromes and needs fewer genes could favor such hypothesis. The question is, can the same conclusions be made for the methylotrophic methanogenesis from methylamines? The fact that this methanogenesis is presently restricted to Methanosarcinaceae and the 7th order of methanogens, which emerged after class I methanogens, argues for a more recent event. It has also to be stressed that no *mta* gene (involved in methylotrophic methanogenesis from methanol) harbors an *amber*-Pyl codon. Moreover, the last MT enzyme of the methanogenesis pathway (encoded by *mtaA* gene for methanol) that precedes the steps corresponding to core methanogenesis (methyl-coM reduction to generate methane) is involved in methanogenesis from both methanol and some methylamines in Methanosarcinaceae and likely also in the 7th order (data not shown). Therefore, it is tempting to speculate that the Pyl-independent, H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis from methanol preceded the Pyl-dependent, H<sub>2</sub>-dependent methylotrophic methanogenesis from methylamines.

Taking together these pieces of evidence, it is likely that, in the archaeal domain, the Pyl system arose in a methanogenic euryarchaeote, in correspondence to the emergence of the genes coding for methylamines-corrinoid protein methyltransferases (MT) (*mtmB*, *mtbB*, and *mttB*) that all bear an in-frame *amber* codon, allowing the use of new substrates (mono-, di-, and trimethylamine, resp.). We will refer to the archaeon where the system arose as the archaeal Pyrrolysine ancestor (APA). The APA may correspond to the ancestor of Methanosarcinaceae, the ancestor of the 7th order of methanogens, or the common ancestor of both (depicted on Figure 4). Now, it can be asked how the Pyl system arose in this hypothetical euryarchaeote. Two possibilities can be envisaged: (i) it was acquired *via* a lateral gene transfer (LGT) or (ii) it emerged autogenously.

Concerning the hypothesis of an LGT from a 4th domain of life by Fournier and colleagues [58, 59], in the light of our results it may be reformulated by positing a single LGT from this extinct lineage into Archaea after the divergence of Thermococcales to give birth to the APA (Figure 4, dotted green arrow). The system would have then been retained only in present-day pyl-containing organisms, for example, the 7th order and Methanosarcinaceae, whereas it would have been lost multiple times independently in most euryarchaeal lineages, including methanogenic ones (Figure 4, red dots).

However, the hypothetical existence of a pre-LUCA lineage that gave rise to the Pyl system remains questionable because of the necessary coexistence of the donor and the APA and because the LGT would have taken place in a euryarchaeon, relatively recent and distant from LUCA, the 4th domain would have been composed at that time of many different lineages that would have subsequently all disappeared (broken dotted lines in the hypothetical 4th Domain, Figure 4).

Our data also make the hypothesis that the Pyl system arose in Bacteria and was introduced in the APA via LGT less likely (Figure 4). In fact, its presence in the 7th order now makes its taxonomic distribution much larger in Archaea than the few pyl-containing bacteria representing a sublineage of Firmicutes and two deltaproteobacteria and its link to methylotrophic methanogenesis stronger.

Therefore, our preferred hypothesis is that the Pyl system is an archaeal invention (green box, Figure 4). PylRS might have emerged by gene duplication followed by fast evolutionary rates from another class II RS gene, while a mutation in the anticodon of a duplicated tRNA could have led to an *amber* decoding tRNA. This would have had less detrimental effects for the cell than the recoding of another codon, affecting potentially all the proteins of the cell. Interestingly, PylRS does not need to recognize the anticodon of the tRNA<sup>Pyl</sup> [17, 55], and this may be a remnant of the birth of the orthogonal pair tRNA<sup>Pyl</sup>/PylRS. Moreover, the recent discovery of the whole synthesis pathway of Pyl, with PylB being a lysine mutase [13] shows that Pyl is entirely a derivative of a proteogenic amino acid (two lysines) and this could make sense in the light of the coevolution theory, such are the cases of Asp/Asn and Glu/Gln in Archaea [63]. APA may have been an early diverging euryarchaeote performing H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis from methanol, perhaps the ancestor of Methanosarcinales and the 7th order of methanogens and therefore after the emergence of Thermococcales and methanogens class I (Methanococcales, Methanobacteriales, and Methanopyrales). Vertical inheritance of the Pyl system would have paralleled that of H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis from methylamines whereas multiple independent losses would have occurred over time in most euryarchaeal lineages, including methanogenic ones (Figure 4, red dots), but retained only in the Methanosarcinaceae and the 7th order. Alternatively, the system would have emerged later, in either the ancestor of Methanosarcinaceae or in the ancestor of the 7th order and then spread among them via LGT (not indicated in the Figure 4 for clarity). Because their Pyl systems are different (notably the absence of the N-terminus of PylS and the unique peculiarity of the tRNA<sup>Pyl</sup>), it may be asked which on the two is the ancestral one. However, it is likely that the unique system of the 7th order is derived from a more “classical” one such as those present in bacteria and Methanosarcinaceae.

Under the hypothesis of an archaeal invention of the Pyl system, the bacterial one may have arisen via LGT from the 7th order of methanogens, considering their closer evolutionary relations, before the loss of the N-terminus of PylS (Figure 4, PylS structure indicated above the Pyl-containing groups). It is unclear if one or several LGTs

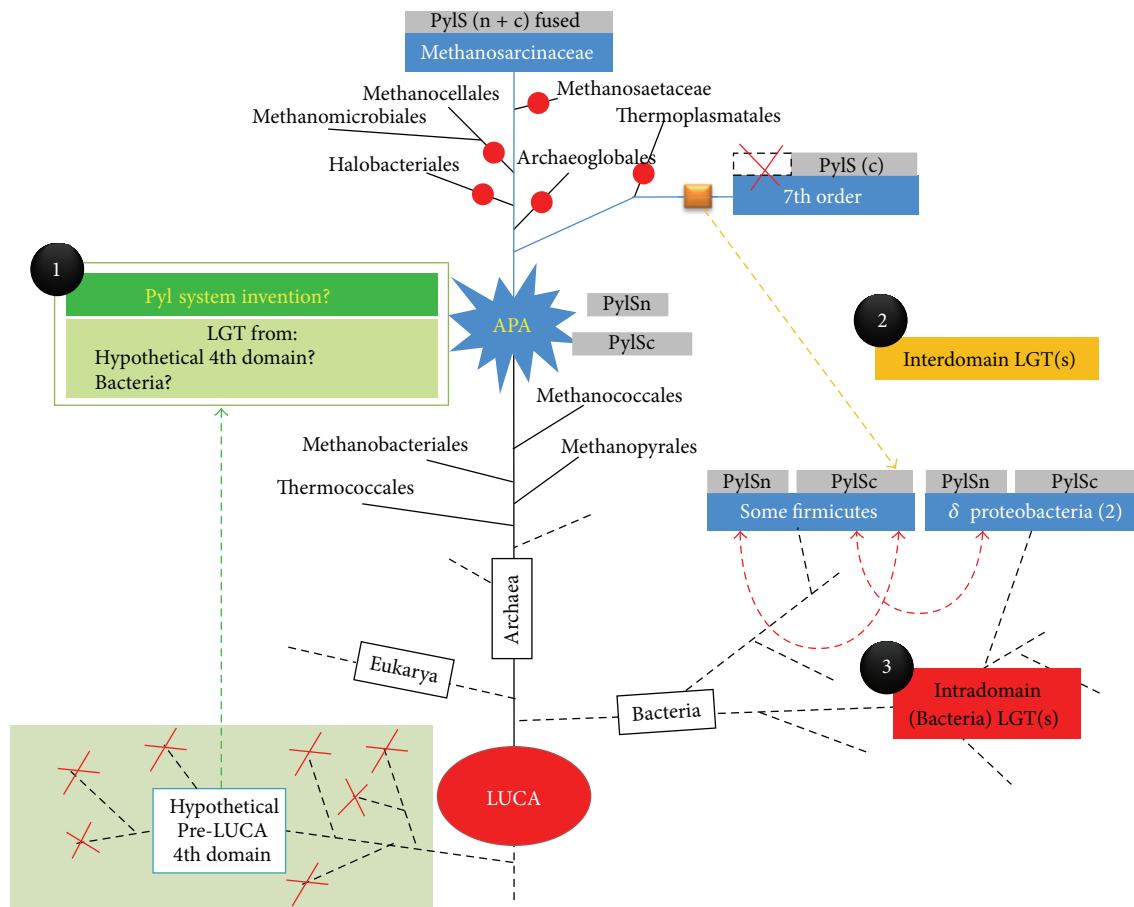


FIGURE 4: Proposed scenarios for the origin and evolution of the pyrrolysine system. One of the various possible models leading to the genesis of APA, the ancestral Pyl-coding archaeon, is schematized. This model supports less LGTs than previously proposed ones. APA (blue star) emerged in the Euryarchaeota (black circle no. 1) after the birth of the methanogenesis and was an ancestor of the Methanosarcinales and/or of the Thermoplasmata-related 7th order of methanogens. Only the hypothesis of a common ancestor of both Methanosarcinales and Thermoplasmata-related 7th order of methanogens is depicted here (see text for an alternative model with APA as a more recent ancestor, of the Methanosarcinales or of the Thermoplasmata-related 7th order of methanogens, but not both). The putative genesis of APA (green boxes) relies either from an archaeal invention (Box 1), from a bacterial contribution, or from a whole functional system acquired from a hypothetical pre-LUCA 4th domain of life. APA was therefore likely a methanogenic archaeon performing both a methanol- $H_2$ -dependent methylotrophic methanogenesis and a hydrogenotrophic one. The Pyl system was vertically inherited (symbolized by large blue lines) to Methanosarcinaceae and to the 7th methanogenic order and was lost several times independently on various branches, including methanogenic ones (red dots). Due to the closest relationship of the Pyl system (orange square) between the 7th order and bacteria, at least one LGT is supposed to have occurred from a 7th order ancestor (before the loss of the *pylSc* gene in this lineage), likely to a Firmicute (no. 2, orange arrow). Other LGTs from the 7th order to Bacteria (i.e., a deltaproteobacterium) are also conceivable. In a third period, intradomain LGT(s) could have originated next putatively among Firmicute and/or into a deltaproteobacterium (no. 3, red arrows). Pyl-coding organisms are symbolized in blue boxes. The nature of the PylRS is depicted with each Pyl-containing group in grey boxes and is either formed by a unique PylS (Methanosarcinaceae), a split complete version (PylSc//PylSn in bacteria), or a unique PylSc form (7th methanogenic order).

occurred from the 7th order onto bacteria (Firmicutes and deltaproteobacteria). The group of Firmicutes is likely the recipient of this first transfer and would have then given the system to a deltaproteobacterium. Alternatively, due to their close environmental relationship (the gut), a distinct LGT could have arisen from a 7th order member of the gut into *Bilophila sp.* However, it cannot be excluded that bacteria took it from Methanosarcinaceae and split the PylS gene into PylSn and PylSc and then they later passed only PylSc to the 7th order. The tree of PylB may suggest such hypothesis, albeit statistical support is not very strong and

no similar pattern is observed for the other components of the system. Unfortunately, phylogenetic analysis prevents concluding the direction of these transfers, because of the absence of outgroup sequences. In every case, that these inter- and/or intradomain LGTs were not rejected is a fascinating event. Introducing a stop codon suppressor is in fact likely deleterious and has to be compensated by a strong selective advantage for the organism, such as the use of new metabolic substrates (e.g., methylamines). Introducing a Pyl-coding cassette into a heterologous genome has been successfully experimentally realized [14, 64]. It is possible that

the acquired genes remained silent or with a low expression level and would have been activated progressively, leading concomitantly to the negative selection of UAG nonsense codons. A more likely hypothesis is an LGT leading to an inducible expression of the Pyl components, such as dependence of the presence of substrates like methylamines. The natural expansion of the genetic code in the Firmicute *Acetohalobium arabaticum* able to genetically encode the 20 usual amino acids when grown on pyruvate, and to expand its repertoire to 21 by adding pyrrolysine when grown on TMA [25] provides the paradigm.

In conclusion, when considering at least the archaeal domain, there has been a Pyl-coding ancestor. It appeared likely relatively recently, as an ancestor of the Methanosarcinales, an ancestor of the 7th order of methanogens, or the common ancestor of both. It was likely a methanogen performing a methanol/H<sub>2</sub>-dependent methanogenesis and, considering the probable coevolution history between methylotrophic methanogenesis and Pyl, with their strong interdependence, it was concomitant or rapidly followed by the emergence of methanogenesis from methylamines compounds. This has led nowadays in the archaeal lineage to conservation of a Pyl system only in methylamines-utilizing/Pyl-dependent methanogens. Therefore, this provides an example that the genetic code may be still under evolution with a conceivable expansion shaped by metabolic requirements.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This work was funded by PhD Scholarship supports from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” to Nadia Gaci Simonetta Gribaldo was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) through Grant ANR-10-BINF-01-01 “Ancestrôme.” Paul W. O’Toole was supported by Science Foundation Ireland through a Principal Investigator award and by an FHRI award to the ELDERMET project by the Department of Agriculture, Fisheries and Marine of the Government of Ireland.

## References

- [1] A. P. Lothrop, M. P. Torres, and S. M. Fuchs, “Deciphering post-translational modification codes,” *FEBS Letters*, vol. 587, pp. 1247–1257, 2013.
- [2] F. Wold, “In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification),” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 50, pp. 783–814, 1981.
- [3] A. Bock and T. C. Stadtman, “Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism,” *BioFactors*, vol. 1, no. 3, pp. 245–250, 1988.
- [4] T. C. Stadtman, “Selenocysteine,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 65, pp. 83–100, 1996.
- [5] M. Ibba and D. Söll, “Genetic code: introducing pyrrolysine,” *Current Biology*, vol. 12, no. 13, pp. R464–R466, 2002.
- [6] G. Srinivasan, C. M. James, and J. A. Krzycki, “Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA,” *Science*, vol. 296, no. 5572, pp. 1459–1462, 2002.
- [7] A. Bock, K. Forchhammer, J. Heider et al., “Selenocysteine: the 21st amino acid,” *Molecular Microbiology*, vol. 5, no. 3, pp. 515–520, 1991.
- [8] Y. Zhang, H. Romero, G. Salinas, and V. N. Gladyshev, “Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues,” *Genome Biology*, vol. 7, no. 10, article R94, 2006.
- [9] M. Rother, A. Resch, R. Wilting, and A. Böck, “Selenoprotein synthesis in archaea,” *BioFactors*, vol. 14, no. 1–4, pp. 75–83, 2001.
- [10] T. Stock and M. Rother, “Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1790, no. 11, pp. 1520–1532, 2009.
- [11] M. A. Gaston, R. Jiang, and J. A. Krzycki, “Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, no. 3, pp. 342–349, 2011.
- [12] M. Rother and J. A. Krzycki, “Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea,” *Archaea*, vol. 2010, Article ID 453642, 14 pages, 2010.
- [13] M. A. Gaston, L. Zhang, K. B. Green-Church, and J. A. Krzycki, “The complete biosynthesis of the genetically encoded amino acid pyrrolysine from lysine,” *Nature*, vol. 471, no. 7340, pp. 647–650, 2011.
- [14] D. G. Longstaff, R. C. Larue, J. E. Faust et al., “A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 3, pp. 1021–1026, 2007.
- [15] J. A. Krzycki, “The path of lysine to pyrrolysine,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 17, no. 4, pp. 619–625, 2013.
- [16] F. Quitterer, P. Beck, A. Bacher, and M. Groll, “Structure and reaction mechanism of pyrrolysine synthase (PylD),” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, no. 27, pp. 7033–7037, 2013.
- [17] K. Nozawa, P. O’Donoghue, S. Gundllapalli et al., “Pyrrolysyl-tRNA synthetase-tRNA<sup>Pyl</sup> structure reveals the molecular basis of orthogonality,” *Nature*, vol. 457, no. 7233, pp. 1163–1167, 2009.
- [18] C. Polycarpo, A. Ambrogelly, A. Bérubé et al., “An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 34, pp. 12450–12454, 2004.
- [19] A. Théobald-Dietrich, M. Frugier, R. Giegé, and J. Rudinger-Thirion, “Atypical archaeal tRNA pyrrolysine transcript behaves towards EF-Tu as a typical elongator tRNA,” *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 3, pp. 1091–1096, 2004.
- [20] S. Herring, A. Ambrogelly, C. R. Polycarpo, and D. Söll, “Recognition of pyrrolysine tRNA by the Desulfotobacterium hafniense pyrrolysyl-tRNA synthetase,” *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 4, pp. 1270–1278, 2007.
- [21] J. M. Kavran, S. Gundllapalli, P. O’Donoghue, M. Englert, D. Söll, and T. A. Steitz, “Structure of pyrrolysyl-tRNA synthetase, an archaeal enzyme for genetic code innovation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 27, pp. 11268–11273, 2007.



- [22] M. M. Lee, R. Jiang, R. Jain, R. C. Larue, J. Krzycki, and M. K. Chan, "Structure of Desulfitobacterium hafniense PylSc, a pyrrolysyl-tRNA synthetase," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 374, no. 3, pp. 470–474, 2008.
- [23] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, and S. Yokoyama, "Crystallographic studies on multiple conformational states of active-site loops in pyrrolysyl-tRNA synthetase," *Journal of Molecular Biology*, vol. 378, no. 3, pp. 634–652, 2008.
- [24] T. Yanagisawa, T. Sumida, R. Ishii, and S. Yokoyama, "A novel crystal form of pyrrolysyl-tRNA synthetase reveals the pre- and post-aminoacyl-tRNA synthesis conformational states of the adenylate and aminoacyl moieties and an asparagine residue in the catalytic site," *Acta Crystallographica D*, vol. 69, pp. 5–15, 2013.
- [25] L. Prat, I. U. Heinemann, H. R. Aerni, J. Rinehart, P. O'Donoghue, and D. Söll, "Carbon source-dependent expansion of the genetic code in bacteria," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. 21070–21075, 2012.
- [26] L. Paul, D. J. Ferguson Jr., and J. A. Krzycki, "The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of Methanosarcina barkeri contain in-frame and read-through amber codons," *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 9, pp. 2520–2529, 2000.
- [27] J. A. Soares, L. Zhang, R. L. Pitsch et al., "The residue mass of L-pyrrolysine in three distinct methylamine methyltransferases," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 44, pp. 36962–36969, 2005.
- [28] A. Mihajlovski, M. Alric, and J.-F. Brugère, "A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the mcrA gene," *Research in Microbiology*, vol. 159, no. 7–8, pp. 516–521, 2008.
- [29] A. Mihajlovski, J. Doré, F. Levenez, M. Alric, and J.-F. Brugère, "Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity," *Environmental Microbiology Reports*, vol. 2, no. 2, pp. 272–280, 2010.
- [30] T. Iino, H. Tamaki, S. Tamazawa et al., "Candidatus Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of Methanomassiliicocaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata," *Microbes and Environments*, vol. 28, pp. 244–250, 2013.
- [31] K. Paul, J. O. Nonoh, L. Mikulski, and A. Brune, "Methanoplasmatales, Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, pp. 8245–8253, 2012.
- [32] G. Borrel, P. W. O'Toole, P. Peyret, J. F. Brugère, and S. Gribaldo, "Phylogenomic data support a seventh order of methylophilic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis," *Genome Biology and Evolution*, vol. 5, pp. 1769–1780, 2013.
- [33] G. Borrel, H. M. Harris, W. Tottey et al., "Genome sequence of, 'Candidatus Methanomethylophilus alvus' Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens," *Journal of Bacteriology*, vol. 194, pp. 6944–6945, 2012.
- [34] A. Gorlas, C. Robert, G. Gimenez, M. Drancourt, and D. Raoult, "Complete genome sequence of Methanomassiliicoccus luminyensis, the largest genome of a human-associated Archaea species," *Journal of Bacteriology*, vol. 194, no. 17, p. 4745, 2012.
- [35] B. Dridi, M. L. Fardeau, B. Ollivier, D. Raoult, and M. Drancourt, "Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 62, pp. 1902–1907, 2012.
- [36] G. Borrel, H. M. Harris, N. Parisot et al., "Genome sequence of 'Candidatus methanomassiliicoccus intestinalis' Isoire-Mx1, a third Thermoplasmatales-related methanogenic archaeon from human feces," *Genome Announcements*, vol. 1, no. 4, Article ID e00453, 13 pages, 2013.
- [37] J. F. Brugère, G. Borrel, N. Gaci, W. Tottey, P. W. O. Toole, and C. Malpuech-Brugère, "Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease," *Gut Microbes*, vol. 5, no. 1, 2013.
- [38] M. Poulsen, C. Schwab, B. B. Jensen et al., "Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen," *Nature Communications*, vol. 4, article 1428, 2013.
- [39] R. K. Aziz, D. Bartels, A. Best et al., "The RAST server: rapid annotations using subsystems technology," *BMC Genomics*, vol. 9, article 75, 2008.
- [40] K. Rutherford, J. Parkhill, J. Crook et al., "Artemis: sequence visualization and annotation," *Bioinformatics*, vol. 16, no. 10, pp. 944–945, 2000.
- [41] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, "Basic local alignment search tool," *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, 1990.
- [42] M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown et al., "Clustal W and clustal X version 2.0," *Bioinformatics*, vol. 23, no. 21, pp. 2947–2948, 2007.
- [43] C. Notredame, D. G. Higgins, and J. Heringa, "T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment," *Journal of Molecular Biology*, vol. 302, no. 1, pp. 205–217, 2000.
- [44] R. C. Edgar, "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797, 2004.
- [45] A. Wilm, D. G. Higgins, and C. Notredame, "R-Coffee: a method for multiple alignment of non-coding RNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, no. 9, article e52, 2008.
- [46] A. R. Gruber, R. Lorenz, S. H. Bernhart, R. Neuböck, and I. L. Hofacker, "The Vienna RNA websuite," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, pp. W70–W74, 2008.
- [47] J. S. Reuter and D. H. Mathews, "RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, article 129, 2010.
- [48] A. Criscuolo and S. Gribaldo, "BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 10, no. 1, article 210, 2010.
- [49] S. Guindon, J.-F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, and O. Gascuel, "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0," *Systematic Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 307–321, 2010.
- [50] S. Q. Le and O. Gascuel, "An improved general amino acid replacement matrix," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 25, no. 7, pp. 1307–1320, 2008.
- [51] G. Jobb, A. von Haeseler, and K. Strimmer, "TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 4, article 18, 2004.

- [52] N. Lartillot, T. Lepage, and S. Blanquart, "PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 17, pp. 2286–2288, 2009.
- [53] J. Yuan, P. O'Donoghue, A. Ambrogelly et al., "Distinct genetic code expansion strategies for selenocysteine and pyrrolysine are reflected in different aminoacyl-tRNA formation systems," *FEBS Letters*, vol. 584, no. 2, pp. 342–349, 2010.
- [54] I. L. Hofacker, "RNA secondary structure analysis using the Vienna RNA package," *Current Protocols in Bioinformatics*, 2004, Chapter 12, Unit 12.2.
- [55] R. Jiang and J. A. Krzycki, "PylSn and the homologous N-terminal domain of pyrrolysyl-tRNA synthetase bind the tRNA that is essential for the genetic encoding of pyrrolysine," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, pp. 32738–32746, 2012.
- [56] E. M. Zdobnov and R. Apweiler, "InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro," *Bioinformatics*, vol. 17, no. 9, pp. 847–848, 2001.
- [57] M. J. Hohn, H.-S. Park, P. O'Donoghue, M. Schnitzbauer, and D. Söll, "Emergence of the universal genetic code imprinted in an RNA record," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 48, pp. 18095–18100, 2006.
- [58] G. Fournier, "Horizontal gene transfer and the evolution of methanogenic pathways," *Methods in Molecular Biology*, vol. 532, pp. 163–179, 2009.
- [59] G. P. Fournier, J. Huang, and J. Peter Gogarten, "Horizontal gene transfer from extinct and extant lineages: biological innovation and the coral of life," *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 364, no. 1527, pp. 2229–2239, 2009.
- [60] A. V. Lobanov, A. A. Turanov, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev, "Dual functions of codons in the genetic code," *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 45, no. 4, pp. 257–265, 2010.
- [61] É. Bapteste, C. Brochier, and Y. Boucher, "Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens," *Archaea*, vol. 1, no. 5, pp. 353–363, 2005.
- [62] S. Gribaldo and C. Brochier-Armanet, "The origin and evolution of Archaea: a state of the art," *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 361, no. 1470, pp. 1007–1022, 2006.
- [63] J. T.-F. Wong, "Coevolution theory of genetic code at age thirty," *BioEssays*, vol. 27, no. 4, pp. 416–425, 2005.
- [64] D. G. Longstaff, S. K. Blight, L. Zhang, K. B. Green-Church, and J. A. Krzycki, "In vivo contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine," *Molecular Microbiology*, vol. 63, no. 1, pp. 229–241, 2007.

## ANNEXE 5

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine

Guillaume Borrel<sup>1,2†</sup>, Nicolas Parisot<sup>1,3†</sup>, Hugh MB Harris<sup>2</sup>, Eric Peyretailade<sup>1</sup>, Nadia Gaci<sup>1</sup>, William Tottey<sup>1</sup>, Olivier Bardot<sup>4</sup>, Kasie Raymann<sup>5,6</sup>, Simonetta Gribaldo<sup>5,6</sup>, Pierre Peyret<sup>1</sup>, Paul W O'Toole<sup>2</sup> and Jean-François Brugère<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** A seventh order of methanogens, the Methanomassiliicoccales, has been identified in diverse anaerobic environments including the gastrointestinal tracts (GIT) of humans and other animals and may contribute significantly to methane emission and global warming. Methanomassiliicoccales are phylogenetically distant from all other orders of methanogens and belong to a large evolutionary branch composed by lineages of non-methanogenic archaea such as Thermoplasmatales, the Deep Hydrothermal Vent Euryarchaeota-2 (DHVE-2, *Aciduliprofundum boonei*) and the Marine Group-II (MG-II). To better understand this new order and its relationship to other archaea, we manually curated and extensively compared the genome sequences of three Methanomassiliicoccales representatives derived from human GIT microbiota, "*Candidatus* Methanomethylophilus alvus", "*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis" and *Methanomassiliicoccus luminyensis*.

**Results:** Comparative analyses revealed atypical features, such as the scattering of the ribosomal RNA genes in the genome and the absence of eukaryotic-like histone gene otherwise present in most of Euryarchaeota genomes. Previously identified in Thermoplasmatales genomes, these features are presently extended to several completely sequenced genomes of this large evolutionary branch, including MG-II and DHVE2. The three Methanomassiliicoccales genomes share a unique composition of genes involved in energy conservation suggesting an original combination of two main energy conservation processes previously described in other methanogens. They also display substantial differences with each other, such as their codon usage, the nature and origin of their CRISPRs systems and the genes possibly involved in particular environmental adaptations. The genome of *M. luminyensis* encodes several features to thrive in soil and sediment conditions suggesting its larger environmental distribution than GIT. Conversely, "*Ca. M. alvus*" and "*Ca. M. intestinalis*" do not present these features and could be more restricted and specialized on GIT. Prediction of the *amber* codon usage, either as a termination signal of translation or coding for pyrrolysine revealed contrasted patterns among the three genomes and suggests a different handling of the Pyl-encoding capacity.

(Continued on next page)

\* Correspondence: jf.brugere@udamail.fr

†Equal contributors

<sup>1</sup>EA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, 28 Place Henri Dunant, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

Full list of author information is available at the end of the article

(Continued from previous page)

**Conclusions:** This study represents the first insights into the genomic organization and metabolic traits of the seventh order of methanogens. It suggests contrasted evolutionary history among the three analyzed Methanomassiliicoccales representatives and provides information on conserved characteristics among the overall methanogens and among Thermoplasmata.

**Keywords:** Archaea, Methanomassiliicoccales, *Methanomethylophilus*, *Methanomassiliicoccus*, Origin of replication (ORI) binding (ORB) motif, Genome streamlining, CRISPR, Pyrrolysine Pyl, H<sub>2</sub>-dependent methylotrophic methanogenesis, Energy conservation

## Background

Methanogenic archaea are distributed worldwide in anaerobic environments and account for a large proportion of methane emissions into the atmosphere, partly due to anthropogenic activity (e.g. rice fields and livestock). Over the last ten years, sequences of novel archaeal lineages distantly related to all orders of methanogens have recurrently been found in diverse anaerobic environments. One of these lineages, phylogenetically related to the Thermoplasmatales, was first reported in the rumen [1,2] and was thereafter referred as Rumen Cluster-C in this environment [3]. The methanogenic nature of these archaea was subsequently strongly supported by the co-occurrence in human stool samples of 16S rRNA affiliated to this lineage and *mcrA* genes (a functional marker of methanogens) distantly related to any other methanogens [4,5]. The final evidence that they represent a new order of methanogens was recently given with the isolation of *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 from human feces [6] and the culture in consortia of several strains of this order: “*Candidatus* Methanomethylophilus alvus” [7] and “*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis” [8] from human feces samples, MpT1 and MpM2 [9] from termite gut and “*Candidatus* Methanogranum caenicola” [10] from waste treatment sludge. All the culture-based studies agreed on a common methanogenic pathway relying on the obligate dependence of the strains on an external H<sub>2</sub> source to reduce methyl-compounds into methane. The restriction to this metabolism was previously only observed in two methanogens from digestive tract (*Methanosphaera stadtmanae* and *Methanomicrococcus blatticola*) and considered an exception [11]. The apparently large distribution of this obligate metabolism among this novel order of methanogens turns this exception into one of the important pathways among the overall methanogens. It also highlights the need for a more cautious utilisation of the term of “hydrogenotrophic methanogens” which is generally used to refer to methanogens growing on H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, but also fits for an increasing number of described methanogens growing on H<sub>2</sub> + methyl-compounds. Two names were proposed for this order, Methanoplasmatales [9] and Methanomassiliicoccales [10], the latter being now validated by the

International Committee on Systematics of Prokaryotes [12]. For this reason, the name of Methanomassiliicoccales will be used in the current publication to refer to this novel order of methanogens.

The global contribution of Methanomassiliicoccales representatives to methane emission could be large, considering that it constitutes one of the three dominant archaeal lineages in the rumen [3] and in some ruminants it represents half or more of the methanogens [13-15]. Using *mcrA* and 16S rRNA sequences, several studies have also highlighted the broad environmental distribution of this order, not limited to digestive tracts of animals but also retrieved in rice paddy fields, natural wetlands, subseafloor and freshwater sediments for example [9,10,16,17]. Methanomassiliicoccales were split into three large clusters, the “*Ca. M. alvus*” cluster, grouping sequences mostly retrieved from digestive tract of animals, the *M. luminyensis* cluster, mainly composed of sequences from soils and sediments and to a lesser extent from digestive tracts, and the Lake Pavin cluster formed by sequences retrieved from diverse environments but not digestive tracts [16].

The genome sequences of three different Methanomassiliicoccales members cultured from human stool samples, *M. luminyensis* B10 [18], “*Ca. M. intestinalis* Mx1-Issoire” [8] and “*Ca. M. alvus* Mx1201” [7], have recently been made available [19]. *M. luminyensis* shows 98% identity with “*Ca. M. intestinalis*” over the whole 16S rRNA gene and only 87% with “*Ca. M. alvus*”. According to the environmental origin of the sequences constituting the large cluster to which they belong, *M. luminyensis* and “*Ca. M. intestinalis*” might be more recently adapted to gut condition than “*Ca. M. alvus*”. Moreover the important difference in genome size and [G + C] % content between the two *Methanomassiliicoccus* spp. genomes suggests a rapid evolution of one of them in response to its adaptation from soil or sediment to digestive tract conditions [8]. Despite the important phylogenetic distance between “*Ca. M. alvus*” and the *Methanomassiliicoccus* spp., these genomes uncover common unique genomic characteristics. In particular, the analysis of “*Ca. M. alvus*” and *M. luminyensis* methanogenic pathways revealed they lack the 6 step C<sub>1</sub>-pathway forming methyl-CoM by the reduction of CO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub>, otherwise present



in all previously sequenced methanogens, fitting with their restriction to H<sub>2</sub>-dependent methylotrophic methanogenesis [16]. Moreover, these analyses helped define putative alternative substrates to methanol by identification of genes involved in the use of methylated-amines and dimethyl-sulfide. Methylated-amines utilization by Methanomassiliicoccales representatives has also been proposed in a metatranscriptomic study on rumen methanogens [17]. The use of tri-, di- and monomethylamine, with the obligate dependence on H<sub>2</sub>, has subsequently been validated *in vivo* with *M. luminyensis* [20]. This property could be significant for human health since gut-produced TMA could be implied in two different diseases [19-22]. The presence of pyrrolysine (Pyl, O), the 22<sup>nd</sup> proteinogenic amino acid, is associated to this metabolism as it is incorporated in methyltransferases involved in utilization of methylated-amines through an *amber* codon suppression by a Pyl-tRNA [23,24]. All the necessary genetic machinery is found in the three genomes of the Methanomassiliicoccales, including the genes for pyrrolysine synthesis (pylBCD), the *amber* suppressor tRNA<sup>Pyl</sup> (pylT) and the dedicated amino-acyl tRNA synthetase (pylS). Their structure and unusual features, together with the evolutionary implications of this system have been recently described elsewhere [25].

These original metabolic and genetic characteristics, as well as the closer phylogenetic proximity of this order with Thermoplasmatales than other orders of methanogens prompted us to perform a more comprehensive analysis of these three genomes. We provide here their general characteristics, including comparisons to phylogenetic neighbor genomes, and derived potential metabolism and adaptation to environmental conditions from their gene composition. In the particular context of the missing genes of the CO<sub>2</sub> reduction-pathway otherwise shared by all other methanogens, we reevaluate the global core of enzymes that are unique and specific to all methanogens and highlight the atypical composition of genes likely involved in energy conservation. The potential usage of the *amber* codon as a translational stop signal or encoding a Pyl in proteins was analyzed and suggests a differential handling of the Pyl-encoding capacity among the three Methanomassiliicoccales representatives.

## Results and discussion

### General genomic features

Genome size, [G + C] %, CDS and tRNA numbers were separately reported in the announcement of these genomes [7,8,18]. Data are gathered in the Table 1 with other newly defined general features.

The tRNA gene complement present in the genomes is in part redundant and covers the usual 20 amino acids, with the exception of Lys in *M. luminyensis*, for which no tRNA was detected: this amino acid is likely encoded

in the remnant ~17 kbp from this genome which are currently not available (Table 1). An archaeal complete set of amino-acyl tRNA synthetases is found in all three genomes, Asn- and Gln- tRNAs being obtained by an Asp-/Glu- tRNA (Asn/Gln) amidotransferase [26]. As previously described [25], an important feature is the presence of a tRNA<sup>Pyl</sup> in all the three genomes. Several small non-coding RNAs (ncRNAs, complete list in Additional file 1: Table S1) were detected. Among them are found a Group II catalytic intron (only in "*Ca. M. alvus*"), the RNA component of the archaeal signal recognition particle (aSRP RNA) and the archaeal RNase P.

Strikingly, 16S and 23S rRNA genes are not clustered and do not form a transcriptional unit as found in most bacterial and archaeal genomes. Among archaea, this unusual characteristic was first documented in Thermoplasmatales [27], but is also found in related lineages such as the uncultured Marine Group II (MG-II) and *Aciduliprofundum boonei* (Figure 1). This particular organization of the rRNA genes is consistent with the phylogenetic position of the seventh order of methanogens determined using a concatenation of ribosomal proteins [16] and constitutes a distinctive characteristic of Thermoplasmatales and related lineages. On a practical point of view, this also indicates that the Ribosomal Intergenic Transcribed Spacer Analysis, recently proposed as a tool to study the diversity of the methanogenic archaea in digesters [28], will likely fail to detect the Methanomassiliicoccales representatives.

As previously reported [8], the three genomes show significant size heterogeneity, with a variation of 58% (from around 1.7 Mbp to 2.6 Mbp, Table 1). Such heterogeneity is found even within the same genus with 36% size variation between the genomes of "*Ca. M. intestinalis*" and *M. luminyensis* (1.9 to 2.6 Mbp). The number of genes is highly variable and ranges from 1,705 ("*Ca. M. alvus*") to 2,713 (*M. luminyensis*). The average CDS size and gene density is very close among the three genomes (around 900 bp and a protein coding gene every 984 to 1,054 bp). The main translation initiation codon is methionine (AUG) for which two copies of the corresponding tRNA are detected in "*Ca. M. alvus*" and three copies in "*Ca. M. intestinalis*" and *M. luminyensis*. In a lower extent, GUG and UUG are also found as translation start codons (Additional file 1: Table S2). Nucleotide composition [G + C] % ranges from 41.3% to 60.5% (Table 1) [7,8,18]. Codon usage patterns among CDS primarily reflect this [G + C] % variation, "*Ca. M. intestinalis*" primarily using AT-rich codons for a given amino acid (Additional file 1: Table S2). Two of the three stop codons follow this usage pattern, the *ochre* codon UAA accounts for 45% of the stop codons in the genome of "*Ca. M. intestinalis*" and respectively only 17% and 14% in the genomes of "*Ca. M. alvus*" and *M. luminyensis* and a

**Table 1 Genome statistics**

Feature	" <i>Ca. M. alvus</i> "	" <i>Ca. M. intestinalis</i> "	<i>M. luminyensis</i>
Genome size <sup>a</sup>	1,666,795	1,931,651	2,637,810 <sup>d</sup> (2,620,233)
DNA G + C content	55.6%	41.3%	60.5%
% DNA coding region	89.5%	88.4%	87.6%
Intergenic regions mean size (SD) <sup>a</sup>	102 (175)	119 (264)	121 (238)
Genes mean G + C content	56.3%	42.4%	61.0%
Putative replicons	1(+1) <sup>b</sup>	1(+1) <sup>b</sup>	1 (+1) <sup>b</sup>
Extrachromosomal elements	NA <sup>c</sup>	NA <sup>c</sup>	NA <sup>c</sup>
Total genes	1,705	1,882	2,713
RNA genes	52	50	52
rRNA genes (5S-16S-23S)	4 (2 - 1 - 1)	4 (2 - 1 - 1)	4 (2 - 1 - 1)
tRNA genes	48	46	48
Protein coding genes	1,653	1,832	2,661
Mean size of protein coding genes (SD) <sup>a</sup>	901 (667)	930 (890)	859 (676)
Median size of protein coding genes <sup>a</sup>	771	780	732
Gene products with function prediction	1,335	1,476	2,002
Gene products assigned to arCOGs	1,271	1,438	2,065
Gene products assigned Pfam domains	123	125	204
Gene products with signal peptides	247	336	512
Gene products with transmembrane helices	281	389	585
CRISPR repeats	1 <sup>e</sup>	1	1

<sup>a</sup>Sizes are given in bp.

<sup>b</sup>Presence of two different *cdc6* genes per genome. See the text for more information.

<sup>c</sup>Not available.

<sup>d</sup>Data from [8]: in bracket stands the total bp (26 contigs) available from database [GenBank: CAJE01000001 to CAJE01000026], analyzed in this study.

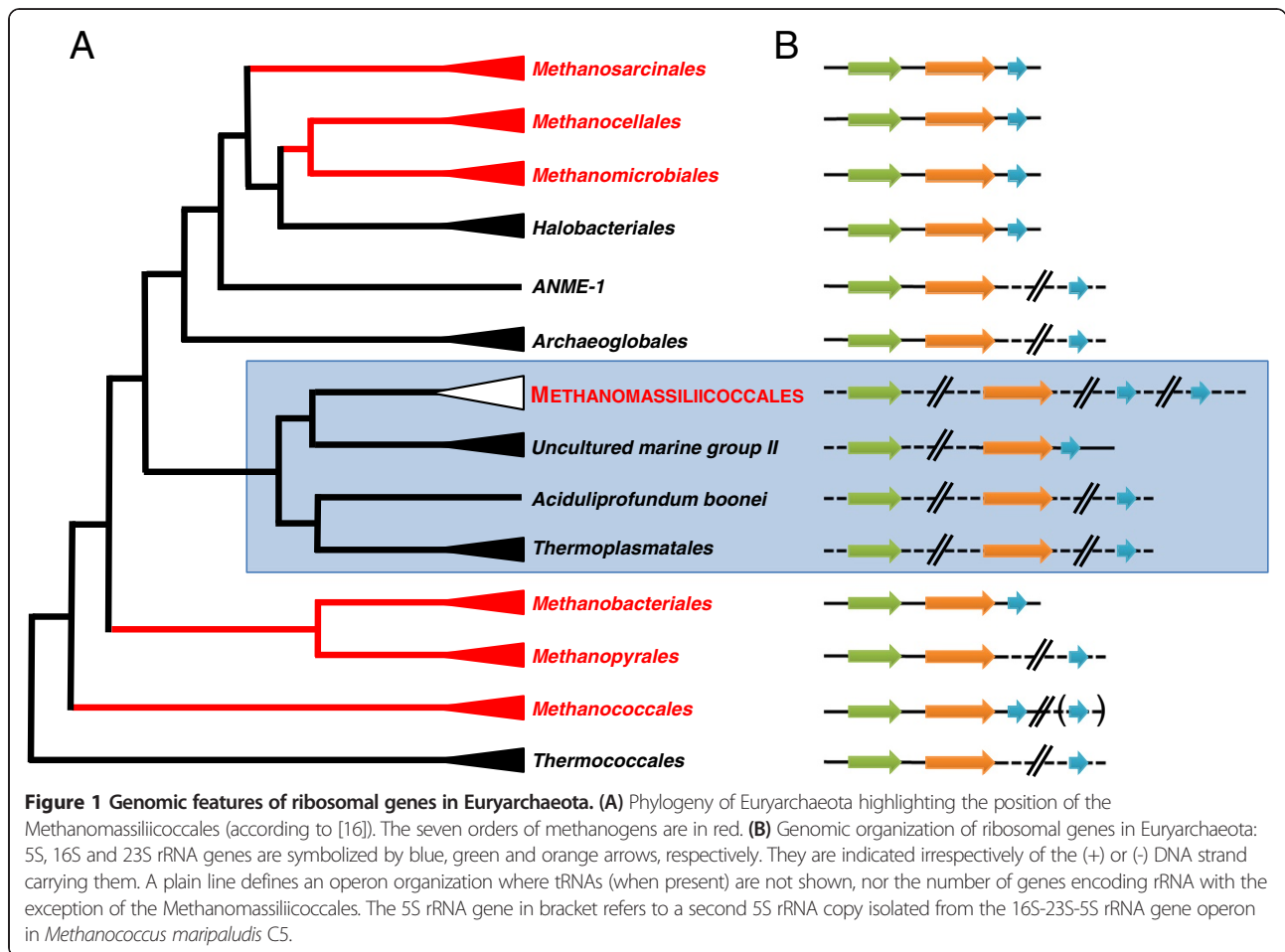
<sup>e</sup>Presence of CRISPR repeats split into two neighboring loci (see Additional file 1: Table S3) surrounding a DNA sequence containing one gene encoding a putative transposase.

same trend is observed for *opal* codon UGA (Additional file 1: Table S2). However, a different pattern is observed for the *amber* codon UAG and could be the result of a different selection process (see dedicated section on *amber* codon usage and putative Pyl-containing proteins). All the ribosomal RNA genes of the three genomes have a [G + C] % above 50%. In "*Ca. M. intestinalis*", they thus have a largely higher [G + C] % than the genome average. When compared to *M. luminyensis*, general characteristics of the "*Ca. M. intestinalis*" genome suggest streamlining accompanied by a sharp [G + C] % reduction as previously observed in free-living *Prochlorococcus* [29]. This potential genomic evolution could be related to the recent colonization of digestive tract by "*Ca. M. intestinalis*" from soil or sediment environments.

### CRISPR elements

The CRISPR system confers to prokaryotes a highly adaptive and heritable resistance to foreign genetic elements such as plasmids and phages [30-33]. CRISPR loci are composed of genome-specific conserved Direct Repeats (DRs) separated by small sequences (spacers) which constitute a

record of past infections. CRISPR-associated (Cas) proteins are responsible for integration of new spacers borrowed from invasive DNA and use the small antisense RNA transcript of these spacers to protect the cell from new invasions. CRISPR loci were previously notified in the three Methanomassiliococcales genomes [7,8,18] and are characterized in the present study. The CRISPR DRs are concentrated in one genomic unit in "*Ca. M. intestinalis*" and *M. luminyensis* but are interrupted by a gene encoding a putative IS4-type transposase (AGI85628.1) in "*Ca. M. alvus*". The DRs of the three genomes differ from each other in length (31 and 36 bp, Additional file 1: Table S3), sequence and associated 2D-structure (Additional file 2: Figure S1), and belong to three different superclasses. A CRISPR map analysis [34] attributed the *M. luminyensis* DRs to the superclass D, family 3 and the "*Ca. M. intestinalis*" DRs to the superclass A (no family) with a partial motif #27 which is exclusively shared with Methanococcales sequences (from *Methanothermus okinawensis*, *Methanocaldococcus jannaschii* and *Methanocaldococcus fervens*, Additional file 2: Figure S1). The "*Ca. M. alvus*" DRs (ATCTACACTAGTAGAAATTCTGAATGAGTTTT



AGAC, superclass E) could not be classified in any sequence/structure family and likely represents a new family of CRISPR DR elements. The number of spacers within DRs ranges from 12 to 113 per locus (from 59 to 113 per genome). Each spacer has a particular size range, from 25 to 28 bp in “*Ca. M. alvus*” to 35 to 40 bp in *M. luminyensis* (Additional file 1: Table S3). A few other CRISPR-like elements are also found in as many as three copies and their functional role remains unknown (Additional file 1: Table S3).

According to the CRISPR system classification proposed by Makarova et al. [35] on the basis of organization and composition of the Cas protein-coding genes found in the neighborhood of the CRISPRs, *M. luminyensis* presents a CRISPR-Cas system subtype I-C (WP\_019177384.1 to WP\_019177390.1). The CRISPR-Cas system of “*Ca. M. intestinalis*” is a hybrid of the subtypes I-A and I-B since its organization corresponds to subtype I-B, but contains the signature gene of the subtype I-A (Cas8a) (AGN26276 to AGY50180.1). The recently defined PreFan subtype (for *Prevotella* and *Francisella*) is present in “*Ca. M. alvus*” (AGI85629 to AGI85632). Notably, the Cas1 protein of “*Ca. M. alvus*” is predicted to contain a pyrrolysine

(see section on *amber* codon usage and putative Pyl-containing proteins).

As suggested by the different superclass assignments of the repeats and the different types of CRISPR-Cas system, these CRISPRs likely result from non-vertical inheritance among the three species. The PreFan type, only found in 20 bacterial genomes so far is rather uncommon in comparison to the type I of the *Methanomassiliicoccus* spp. Bacteria that hold the PreFan type are generally found in tight association with animals and the genus *Prevotella* is one of the dominant in rumen [36] and human gut [37] suggesting that “*Ca. M. alvus*” may have acquired this system through other gut bacteria. Moreover, the spacers are specific to each of the three genomes suggesting they undergone different histories of infection. In “*Ca. M. alvus*”, one of the spacers is 93% similar (25 of 27 nt) to a ssDNA virus isolated from pig feces (JX305998.1).

With the exception of viruses from the families of *Myoviridae* and *Siphoviridae* (head-tail viruses) which also infect bacteria, archaeal viruses sequenced to date have almost no significant residue identity with each other and sequences in public databases [38,39]. Accordingly,



the lack of detection of prophage sequences by dedicated software does not imply the absence of prophages in these three genomes: some clusters of 10-30 adjacent genes with few significant matches in public databases might represent still unknown prophages. Furthermore, genes distantly related to phage ones are found in the three genomes and could belong to unknown prophages or represent residual traces of past infection. This is for example the case of two contiguous genes, present in the vicinity of the “*Ca. M. intestinalis*” CRISPR locus, which encode putative proteins (YP\_008071639.1 & YP\_008071640.1) with similarity to phage capsid synthesis proteins.

### Genome replication

Origins of replication were identified with a consensus Origin Recognition Box (ORB) motif recently identified from active replication origins of Thaumarchaeota (*Nitrosopumilus maritimus*), Crenarchaeota and Euryarchaeota [40]. Several ORB motifs were found in the three genomes, most of them gathered by pairs (Table 2). A consensus sequence for a Methanomassiliococcales ORB motif was deduced and shows little difference with the archaeal consensus recently proposed [40] (Table 2).

Each of the three genomes possesses two copies of the *orc1/cdc6* (Origin Recognition complex/Cell division cycle 6) gene (Table 3). At least two ORB motifs are found in the vicinity of only one of the two *orc1/cdc6* genes. In the draft genome of *M. luminyensis*, these two genes are associated in the same contig (CAJE01000021), allowing comparison with the other two genomes. In every case, the *orc1/cdc6* genes are each located on a different strand (Additional file 2: Figure S2). They are close together within the *M. luminyensis* and “*Ca. M.*

*intestinalis*” genomes (respectively around 70 and 90 kbp), and more distant in “*Ca. M. alvus*” (around 695 kbp). They are inversely oriented in the three genomes. Consistent with a recent study [41], phylogenetic analysis reveals that these genes correspond to two paralogs, *orc1/cdc6.1* and *orc1/cdc6.2* (Additional file 2: Figure S3). *orc1/cdc6.1* lies close to the predicted origin of replication, displays a conserved genomic context (Figure 2) is slow-evolving and groups phylogenetically with Thermoplasmatales/DHVE2/uncultured Marine Group II (Additional file 2: Figure S3), consistent with vertical inheritance. On the other hand, *orc1/cdc6.2* copies display much faster evolutionary rates, lies in a non-conserved genomic context (Figure 2), and show inconsistent phylogenetic placement close to Crenarchaeota (Additional file 2: Figure S3). This may be due to a tree reconstruction artifact or may represent a possible horizontal gene transfer from an unspecified crenarchaeon. Given its higher conservation, its conserved genomic context and its vicinity to ORB motifs, Orc1/Cdc6.1 is likely the main initiator protein and Orc1/Cdc6.2 may represent an inactive or accessory copy, possibly active in different environmental conditions.

The replication gene set is similar to that of the most closely related lineages (Table 3). However, some interesting features are present in the three genomes. For example, they do not harbor any homologs of the single-stranded binding protein SSB similarly to MG-II, whereas Thermoplasmatales and DHVE2 have both RPA and SSB. The absence of SSB may strengthen the sister relationship of the Methanomassiliococcales and MG-II lineages as observed in a phylogenetic reconstruction based on ribosomal proteins [16]. The Methanomassiliococcales,

**Table 2 ORBs motifs found in the Methanomassiliococcales genomes**

ORB	Sequence	Position	Spacing	Orientation	Comment
“ <i>Ca. M. alvus</i> ” ORB1	<b>GTTCCAGTGGAAATGG-TGGGGT</b>	78 - 99	39	inverted	downstream <i>orc1/cdc6.1</i>
“ <i>Ca. M. alvus</i> ” ORB2	<b>GTTCCACTGGAAACAG-AGGGGT</b>	138 - 159		inverted	downstream <i>orc1/cdc6.1</i>
“ <i>Ca. M. alvus</i> ” ORB3	<b>TTCCACTGGAAACAG-AGGGGT</b>	1977 - 1998	47		upstream <i>orc1/cdc6.1</i>
“ <i>Ca. M. alvus</i> ” ORB4	<b>GTTCCACTGGAAATGG-TGGGGT</b>	2045 - 2066			upstream <i>orc1/cdc6.1</i>
“ <i>Ca. M. intestinalis</i> ” ORB1	<b>ATTACAGTGGAAATGA-AGGGGT</b>	15 - 36	256	inverted	downstream <i>orc1/cdc6.1</i>
“ <i>Ca. M. intestinalis</i> ” ORB2	<b>TTGCACTGGAAATGA-AGGGGT</b>	292 - 313			downstream <i>orc1/cdc6.1</i>
“ <i>Ca. M. intestinalis</i> ” ORB3 <sup>a</sup>	<b>GTTCCAGTGGAAATGA-AGGGGT</b>	795626 - 795647			downstream <i>fstZ</i>
“ <i>Ca. M. intestinalis</i> ” ORB4 <sup>a</sup>	<b>TCTGCACTGGAAATGA-AGGGGT</b>	1576211 - 1576232		inverted	downstream fused <i>nifH/nifE</i>
<i>M. luminyensis</i> ORB1	<b>GTTCCATGGAAATCG-GCAGGA</b>	73488 - 73475 <sup>b</sup>	113		downstream <i>orc1/cdc6.1</i>
<i>M. luminyensis</i> ORB2	<b>GTTCCAGTGGAAATAA-AGGGGT</b>	73341 - 73362 <sup>b</sup>		inverted	downstream <i>orc1/cdc6.1</i>
Methanomassiliococcales consensus ORB	<b>GTTCCAGTGGAAATGG-AGGGGT</b> <b>A</b>				
Archaea consensus ORB	<b>CTTCCAGTGGAAACGAAAGGGGT</b>				Pelve et al., [40]

Bases in bold indicate consensual bases of the ORB sequence in the Methanomassiliococcales. The “*Ca. M. alvus*” ORBs, and the ORB2 of *M. luminyensis* and “*Ca. M. intestinalis*” might be extended by a “GGGGT” sequence otherwise not conserved in the 4 other Methanomassiliococcales ORBs and the Archaea consensus ORB.

<sup>a</sup>Not found in close association to another ORB.

<sup>b</sup>Contig [GenBank: CAJE01000021.1].

**Table 3 DNA replication proteins compared to the corresponding components in Thermoplasmatales, MG-II and DHEV2**

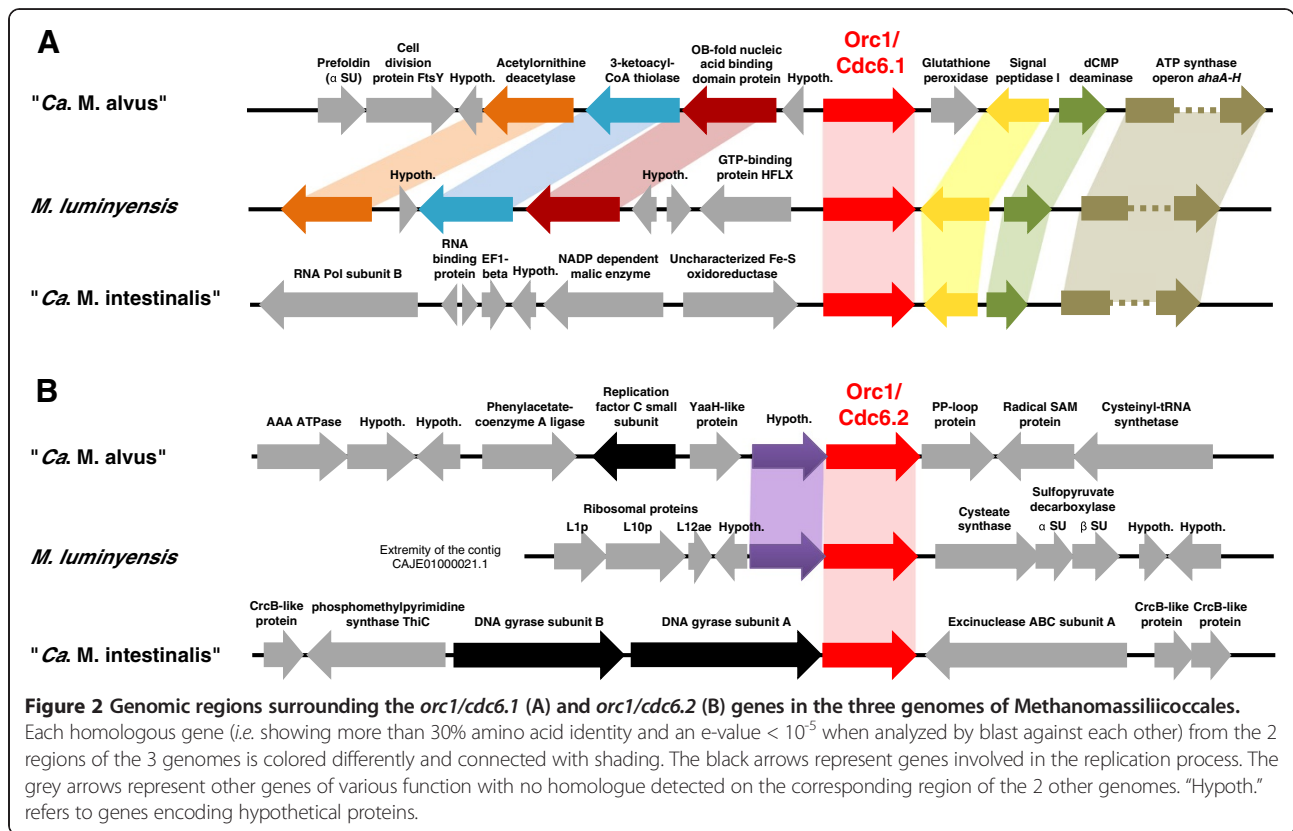
	" <i>Ca. M. alvus</i> "	" <i>Ca. M. intestinalis</i> "	<i>M. luminyensis</i>	MG-II	DHEV2	Thermoplasmatales
ATP-dependent DNA ligase	AGI85913	AGN25909	WP_019176428	X	■	■
Orc1/Cdc6	AGI84758 (1)	AGN25419 (1)	WP_019178385 (1)	■	■	■
	AGI85775 (2)	AGN27158 (2)	WP_019178317 (2)			
DNA Pol D large subunit (DPL)	AGI85099	AGN26720	WP_019177373	■	■	■
DNA Pol D small subunit (DPS)	AGI84772	AGN27082	WP_019178373	■	■	■
FEN-1	AGI85207	AGN26626	WP_019176843	■	■	■
GINS 51	AGI84890	AGN27100	X	X	■	■
GINS 23	X	X	X	X	X	X
DNA Gyrase subunit B	[AGI86382]	[AGY50228]	[WP_019178436]	[■]	[■]	[■]
DNA Gyrase subunit A	[AGI86381]	[AGN27159]	[WP_019178437]	[■]	[■]	[■]
MCM	AGI86392	AGN26346	WP_019178416	■	■	■
		<i>AGN27203</i>				
PCNA	AGI84935	AGN27068	WP_019176118	■	■	■
DNA Pol B	AGI86264	AGN26701	WP_019177962	■	■	■
			<i>WP_019177491</i>			
Primase large subunit (PriL)	AGI84820	AGN27177	WP_019178297	■	■	■
Primase small subunit (PriS)	AGI86400	AGY50234	WP_019178400	■	■	■
RFC large subunit	AGI85559	AGN26596	WP_019176873	■	■	■
RFC small subunit	AGI85778	AGN26166	WP_019177244	■	■	■
RNaseH II	AGI86158	AGN25790	WP_019177553	■	■	■
TopoVI subunit A	AGI85998	AGN26743	WP_019177592	■	■	X
TopoVI subunit B	AGI85997	AGN26742	WP_019177591	■	■	X
Topo IB	X	X	X	X	X	X
SSB	X	X	X	X	■	■
RPA2	AGI84916	AGN25568	WP_019178149	■	■	■
		<i>AGY50184</i>	<i>WP_019177069</i>			
rpa2A (rp associated protein)	AGI84915	AGN25567	WP_019178150	■	■	■
NAD-dependent DNA ligase	[AGI85455]	X	X	[■]	X	X

Proteins in brackets indicate horizontal transfers from bacteria; Proteins in italics indicate fast evolving additional copies likely representing decaying paralogs, genes horizontally transferred among archaea, or homologs arising from integration of foreign elements. Absent proteins (or unavailable due to genome incompleteness) are indicated by an X. (1) and (2) in front of the Orc1/Cdc6 protein accession numbers indicate the Orc1/Cdc6.1 and Orc1/Cdc6.2, respectively.

Marine Group II, and DHVE2 harbor both subunits of the archaeal topoisomerase TopoVI, strengthening a specific loss of this gene in Thermoplasmatales, which replaced it by a bacterial-type DNA gyrase [42]. Moreover, all three Methanomassiliicoccales representatives also harbor a bacterial-like DNA gyrase, known to have been acquired from bacteria in late emerging Euryarchaeota [41]. Some components are present as extra copy in the three genomes (in bold in Table 3), for example the Minichromosome Maintenance Protein (MCM) in the genome of "*Ca. M. intestinalis*", which is highly divergent with respect to the other MCM coding genes and lies in a genome region with no synteny with the other closely related genomes. This is also the case for an extra PolB coding gene identified in the genome of *M. luminyensis*. Finally, genes coding for two additional OB-fold containing proteins (RPA-like) were

identified in the genomes of "*Ca. M. intestinalis*" and *M. luminyensis*. All these extra copies are very divergent and likely represent decaying paralogs or homologs arising from integration of foreign elements. In addition, we found a bacterial type NAD-dependent DNA ligase homolog in the genome of "*Ca. M. alvus*" that appears to originate via a specific and recent horizontal gene transfer from a bacterium of the *Prevotella* genus, which is abundant in the human gut microbiota (Additional file 2: Figure S4A).

An important feature shared by the three Methanomassiliicoccales representatives, the Thermoplasmatales and other related lineages is the lack of Eukaryotic-like histone found in other Euryarchaeota [43], suggesting that the loss of this gene occurred early in the evolution of the whole lineage. Surprisingly, no gene coding for homologues of the bacterial-type HTa histones known to



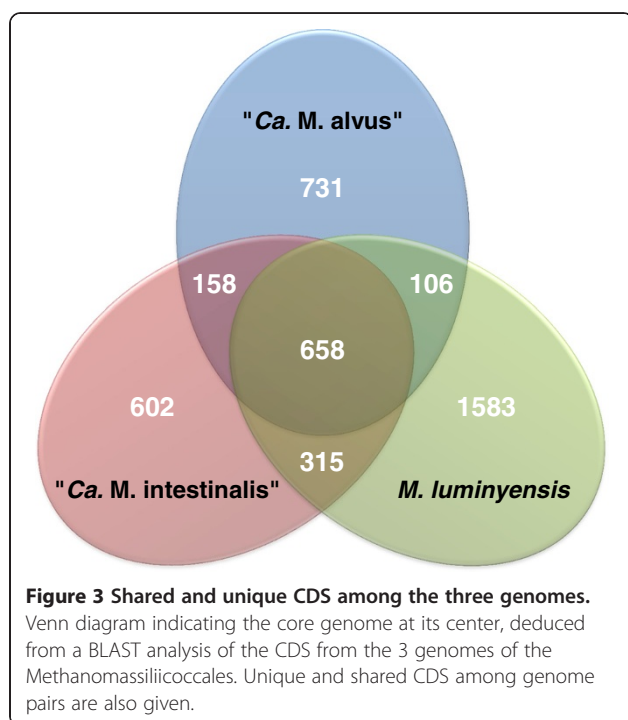
have replaced the native histone in Thermoplasmatales and DHVE2 are present in the Methanomassiliicoccales genomes and the MG-II genome. The DNA packaging function could be fulfilled in *M. luminyensis* by an Alba protein (WP\_019176109.1) also presents in *Thermoplasmatales* [44] and MG-II, but absent in "*Ca. M. alvus*" and "*Ca. M. intestinalis*". Few candidate proteins with a very weak similarity to bacterial histones and a Lys- and Arg-rich tail were identified in *M. luminyensis* (WP\_019177894.1) and "*Ca. M. intestinalis*" (AGN26805.1) but not in "*Ca. M. alvus*". While the proteins responsible for this crucial function remain elusive, a homologue of the histone acetyltransferase of the ELP3 family was identified in the three genomes (WP\_019178580.1, AGN27049 and AGI86364). Only *M. luminyensis* possesses a histone deacetylase HdaI, related to Crenarchaeota and not found in other Thermoplasmatales (WP\_019177579.1).

### Core genome

The best BLAST hits of the CDS from the three genomes were most frequently found in other archaeal members (70% to 82%), around 18% to 30% to Bacteria, and less than 0.3% to Eukaryota (Additional file 1: Table S4). It is likely that some of these reflect lateral gene transfer events, consistent with the presence of genomic islands with different [G + C] % composition from the genome average, as observed in "*Ca. M. alvus*" and, more

pronounced, in "*Ca. M. intestinalis*" (Additional file 2: Figure S2).

The core genome of the three species is composed of 658 CDS. While the number of CDS shared between genome pairs reflects partly their phylogenetic relatedness, an impressive proportion of CDS are specific to each one, in particular for *M. luminyensis* (Figure 3, Additional file 1: Table S5 for a complete list). Of the core genome, 173 genes are not found in the closest lineages (*Ferroplasma acidarmanus*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*, uncultured Marine Group II and *Aciduliprofundum boonei* (Table 4, complete data in Additional file 1: Table S5). A part of these genes could correspond to specific traits of the Methanomassiliicoccales, at least for 20 of them which have no close homologue sequence in the databases (Additional file 1: Table S5). Another part of these genes reflects the metabolic pathway of the Methanomassiliicoccales representatives, methanogenesis, not shared with the Thermoplasmatales and any of the other related lineages for which genomic or physiological data are available. As discussed below, some of these genes are unique to methanogens. Among the predicted core proteins, 227 have no homologues in the two other methanogens commonly found in the same environment, the human gut (*Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae*). Some of these differences rely on the particular methanogenic pathway of the Methanomas-



siliicoccales which can use methylated amines as substrate [20], which is not the case of *M. smithii* and *M. stadtmanae*. One hundred and two core proteins have no homologues in either the closely related lineages or the two gut methanogens (Table 4, complete data in Additional file 1: Table S6). Some show hits to other methanogens (Methanocellales, Methanomicrobiales and Methanosarcinales), and are specific for methanogenesis/energy conservation. Others likely reflect ancient lateral gene transfer events (LGTs) in the ancestor of the Methanomassiliicoccales. They include proteins involved in

carbohydrate metabolism (glycosyl transferases, sugar transporters), nitrogen metabolism, and several proteins specific to the Methanosarcinaceae and involved in methanogenesis (see below).

#### General metabolism and adaptations to environment

Analysis of archaeal clusters of orthologous groups (ArCOG [45]) resulted in 1,271; 1,438 and 2,065 assigned functions for “*Ca. M. alvus*”, “*Ca. M. intestinalis*” and *M. luminyensis* respectively (representing between 77-79% of all CDS) (Additional file 1: Table S7). Components of cell wall/membrane and envelope biogenesis (class M) were less abundant when compared to the other gut methanogens *M. smithii* and *M. stadtmanae*. Indeed, comparatively to these Methanobacteriales, electron micrographies of *M. luminyensis* did not show a prominent cell-wall-like structure [6]. However, it seems that the synthesis of activated mannose is likely possible from fructose-6-P, therefore allowing the biosynthesis of N-glycans potentially associated to a cell-wall. A specific enrichment was observed for inorganic ion transport and metabolism (class P) and, as noted for other methanogens, for coenzyme transport and metabolism (class H): when analyzed in more details, many of the predicted transporters are ABC transporter permease proteins with homology to those identified in other methanogens (Additional file 1: Table S8). Noteworthy is the presence of quaternary ammonium compound efflux pumps as well as specialized systems involved in substrate acquisition for specialized methanogenesis-related functions ( $H_2$ -dependent methylotrophic methanogenesis, see below): this includes putative transporters for dimethylamine (AGI85872.1/AGI85374.1/AGI85246.1 for “*Ca. M. alvus*”, AGN26255.1 for “*Ca. M. intestinalis*”, WP\_019178528.1 for *M. luminyensis*) and trimethylamine (AGI85867.1,

**Table 4 Proteome of the three Methanomassiliicoccales representatives compared to their phylogenetic neighbors, human gut methanogens and NCBI nr proteins**

Core genome of Methanomassiliicoccales: 658 protein sequences	Specific <sup>a</sup>	Shared <sup>b</sup>
Phylogenetic neighbors	173	485 <i>125 absent from human gut methanogens</i>
Human gut methanogens	227	431 <i>63 absent from phylogenetic neighbors</i>
Phylogenetic neighbors and human gut methanogens	102	556 shared with at least one <i>Encompassing:</i> <i>125 absent from human gut methanogens</i> <i>71 absent from phylogenetic neighbors</i> 360 shared with the two groups
NCBI non-redundant protein sequences database	20 (21) <sup>c</sup>	637

<sup>a</sup>Number of deduced proteins of the core genome of Methanomassiliicoccales that are not found in the corresponding organisms.

<sup>b</sup>Number of deduced proteins of the core genome of Methanomassiliicoccales that are also found in the corresponding organisms.

<sup>c</sup>The value of 21 encompasses CDS that are specific of the proteome of the Methanomassiliicoccales together with either the ones of the phylogenetic neighbors or of the human gut methanogens, without any other blast hits with the NCBI nr protein sequences database.



AGN26256.1, WP\_019178522.1). The following part of the section focuses on several genomic features of the three Methanomassiliicoccales representatives that suggest metabolic adaptations to their environment. An overview of the inferred general metabolism is given in Additional file 2: Figure S5. As usually observed in methanogens, the three species harbors an incomplete reductive TCA cycle [46]. Further details on lipid, amino acid and purine synthesis pathways, as well as molecular nitrogen fixation are also presented in Additional file 3.

Similarly to other methanogens and differently from the Thermoplasmatales representatives, the three Methanomassiliicoccales lack PurK for purine synthesis pathway. Two purE-like enzymes were identified (AGI84793.1, AGI85002.1, AGN25661.1, AGN26431.1, WP\_01917835.1, WP\_019177087.1) without clear assignment to class I or class II PurE (Additional file 3). Depending on the assignment of these PurE, the ATP-dependent activity of PurK might be substituted by a class I PurE in presence of high concentration of CO<sub>2</sub> or a class II PurE, both avoiding the hydrolysis of ATP [47]. The former possibility could represent an adaptation to the high CO<sub>2</sub> concentrations in anaerobic environments as proposed for other methanogens [47].

Two possible sources of ammonia are predicted to be common in the three Methanomassiliicoccales, a direct uptake from the environment by dedicated transporters (Additional file 1: Table S8) and an intracellular production, as a by-product of methanogenesis from monomethylamine. The presence of some of these transporters in close association to the genes involved in methanogenesis from monomethylamine suggests that they could alternatively be used to export ammonium when monomethylamine is used for methanogenesis. Ammonia could also be derived from urea in “*Ca. M. intestinalis*” which possesses a *ureA-G* operon encoding a urease (AGN27148.1 to AGN27154.1) and a urea transporter (AGN27055.1). Ammonia is likely assimilated by a glutamine synthetase GlnN, one in “*Ca. M. alvus*” and “*Ca. M. intestinalis*” (AGI86325.1; AGN25771.1) and two in *M. luminyensis* (WP\_019177566.1; WP\_019177539.1, this second one likely acquired through LGT from bacteria). *M. luminyensis* is predicted to be diazotroph with a putative flexibility upon the dependency on Molybdenum, while “*Ca. M. alvus*” and “*Ca. M. intestinalis*” probably lack the capacity to fix N<sub>2</sub> (Additional file 3). N<sub>2</sub> fixation capacity has been found among soil and sediment methanogens but not in common gut methanogens (Additional file 3) [48-50]. Accordingly, the potential capacity of *M. luminyensis* to fix N<sub>2</sub> could reflect an adaptation to soil or sediment conditions and a facultative association to digestive tracts.

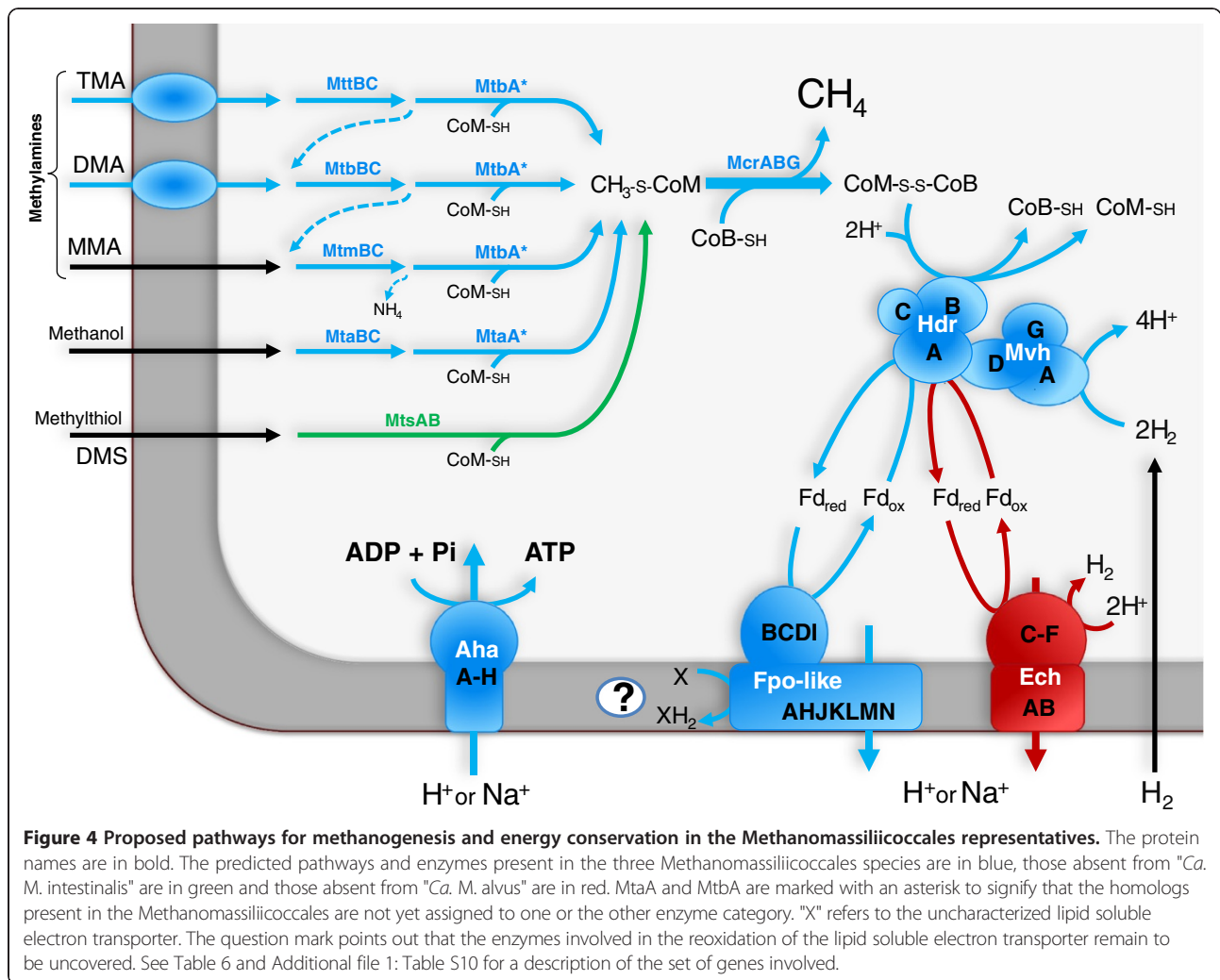
Each Methanomassiliicoccales genome encodes at least one catalase (*katE*), peroxiredoxin (*prx*), rubredoxin (*rub*) and rubrerythrin (*rbr*) to resist to oxygen exposure

(Additional file 1: Table S9). *M. luminyensis* presents the highest antioxidant capacity, in particular with 8 copies of a peroxiredoxins (*prx*) gene, against 4 and 2 copies in “*Ca. M. intestinalis*” and “*Ca. M. alvus*” respectively. *M. luminyensis* is also the only one to harbor homologues of superoxide dismutase (*sodA*) and desulfoferrodoxin (*dfx*). A large diversity and redundancy of the antioxidant systems was previously reported for dominant rice field soil methanogens, Methanocellales, and described as a specific adaptation of these methanogens to oxic episodes regularly occurring in these environments [48,49]. In line with its probable diazotrophic capacity, the larger number and diversity of genes encoding antioxidant enzymes in *M. luminyensis* argue for a greater adaptation to soil environments than “*Ca. M. alvus*” and “*Ca. M. intestinalis*”. A glycine-betaine ABC transporter (WP\_019176328.1, WP\_019176329.1, WP\_019176330.1) was also found in *M. luminyensis*. This kind of transporter helps to cope with external variations in salt concentration by accumulating glycine-betaine as an osmoprotectant and was previously identified in Methanosarcinales [51,52]. No similar transporter of glycine-betaine was identified in “*Ca. M. alvus*” or “*Ca. M. intestinalis*”.

Interestingly, among the three Methanomassiliicoccales representatives, “*Ca. M. alvus*” is the only one to encode a choloylglycine hydrolase (YP\_007713843.1), which confers resistance to bile salts encountered in the gastro-intestinal tracts (GIT). This gene is also present in the genome of the two other dominant human gut methanogens, *M. smithii* and *M. stadtmanae* [53,54], and could have been transferred from other gut bacteria (Additional file 2: Figure S4B). Another adaptation to GIT could be inferred through the presence of a conserved amino acid domain corresponding to COG0790 (TPR repeat, SEL1 subfamily) in at least one protein of each Methanomassiliicoccales representative. This conserved domain has been previously identified in proteins involved in interactions between bacteria and eukaryotes and was never reported in archaea [55] suggesting an adaptation to digestive tracts unique to Methanomassiliicoccales among archaea. In that case, the occurrence of the genes encoding proteins with this domain in the Methanomassiliicoccales genomes, 28 in “*Ca. M. alvus*”, 6 in “*Ca. M. intestinalis*” and one in *M. luminyensis* would support a higher adaptation of “*Ca. M. alvus*” to digestive tracts.

#### **Methanogenesis and core enzymes specific to methanogens**

It was previously reported that *M. luminyensis* and “*Ca. M. alvus*” lack the genes that encode the 6 step C<sub>1</sub>-pathway leading to methyl-CoM by the reduction of CO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub> [16]. Our current analysis revealed a similar lack of these genes in “*Ca. M. intestinalis*” (Figure 4). It also reveals that “*Ca. M. intestinalis*” does not harbor the



genes *mtsAB* (Figure 4) which code for enzymes likely involved in methanogenesis from dimethylsulfide [56]. The composition of the methyltransferases involved in the H<sub>2</sub>-dependent methylotrophic methanogenesis from the three genomes was partially determined before [7,8,16,17] and is compiled in the Additional file 1: Table S10, with their relative genomic position displayed in the Additional file 2: Figure S6.

A pool of genes conserved among all methanogens and not found in any other archaea was recently determined by Kaster *et al.* [57]. These genes encode the subunits of two enzymatic complexes unique and shared by all methanogens, the methyl-H<sub>4</sub>MPT: coenzyme M methyltransferase (Mtr) and the methyl coenzyme reductase (two complexes of isoenzymes Mcr and Mrt), as well as proteins of unknown function. Being unique to methanogens, these uncharacterized proteins likely have an important role for methanogenesis and could be directly associated to the functioning of Mcr and Mtr [57]. The lack of Mtr and the other genes of the CO<sub>2</sub>-reductive pathway in the

three Methanomassiliococcales described here, prompted us to reevaluate the overall methanogenesis markers. In addition to the five genes coding for subunits of the Mtr enzymatic complex, two former methanogenesis markers (annotated as methanogenesis markers 10 and 14 in the databases and belonging to arCOG00950 and arCOG04866, respectively) are absent from the three Methanomassiliococcales genomes (Table 5). One of these genes (belonging to arCOG04866) is present in the vicinity of the operon coding for Mtr in *Methanosaeta thermophila*, Methanobacteriales, Methanopyrales and Methanocellales genomes. Its genomic position in methanogens encoding Mtr and its absence in Methanomassiliococcales suggests its involvement in the functioning of Mtr. Fifteen genes present in the three Methanomassiliococcales genomes have homologues (and/or paralogs in the case of *atwA* and the *mcr/mrt* operons) conserved in all other methanogens and not in other archaea and could still be considered as methanogenesis markers (Table 5). Interestingly, 13 of these genes, including the *mcr* operon, are clustered on a small genomic portion (~16 Kb)

**Table 5 Core proteins of methanogenesis**

Annotation	" <i>Ca. M. alvus</i> "	" <i>Ca. M. intestinalis</i> "	<i>M. luminyensis</i>	Distribution	arCOG
Nitrogenase molybdenum-iron like protein (NifD-like/NifD)	<i>AGI86050</i>	<i>AGN27015</i>	<i>WP_019176684.1</i>	1	arCOG04888
UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide synthase like protein (MurF-like)	<i>AGI86051</i>	<i>AGN27016</i>	<i>WP_019176685.1</i>	1	arCOG02822
Methyl-coenzyme M reductase operon associated like protein (McrC-like)	<b>AGI85157</b>	<b>AGN26013</b>	<b>WP_019176790.1</b>	1	arCOG03226
Conserved hypothetical protein	<b>AGI85156</b>	<b>AGN26012</b>	<b>WP_019176789.1</b>	1	arCOG04904
CoA-substrate-specific enzyme activase	<b>AGI85155</b>	<b>AGN26011</b>	<b>WP_019176788.1</b>	1	arCOG02679
Conserved hypothetical protein	<b>AGI85154</b>	<b>AGN26010</b>	<b>WP_019176787.1</b>	1	arCOG04903
Conserved hypothetical protein	<b>AGI85153</b>	<b>AGN26009</b>	<b>WP_019176786.1</b>	1	arCOG04901
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related protein	<b>AGI85152</b>	<b>AGN26008</b>	<b>WP_019176785.1</b>	1	arCOG04900
Methyl coenzyme M reductase operon associated protein (McrC)	<b>AGI85151</b>	<b>AGN26006</b>	<b>WP_019176783.1</b>	1	arCOG03225
Methyl-coenzyme M reductase, component A2 (AtwA)	<b>AGI85150</b>	<b>AGN26005</b>	<b>WP_019176782.1</b>	1*†	arCOG00185
Methyl coenzyme M reductase, beta subunit (McrB/MrtB)	<b>AGI85141</b>	<b>AGN26874</b>	<b>WP_019176771.1</b>	1*	arCOG04860
Methyl coenzyme M reductase, protein D (McrD/MrtD)	<b>AGI85142</b>	<b>AGN26873</b>	<b>WP_019176772.1</b>	1*	arCOG04859
Methyl coenzyme M reductase, gamma subunit (McrG/MrtG)	<b>AGI85143</b>	<b>AGN26872</b>	<b>WP_019176773.1</b>	1*	arCOG04858
Methyl coenzyme M reductase, alpha subunit (McrA/MrtA)	<b>AGI85144</b>	<b>AGN26871</b>	<b>WP_019176774.1</b>	1*	arCOG04857
SH3 fold protein	<b>AGI85145</b>	<b>AGN26870</b>	<b>WP_019176775.1</b>	1	arCOG04846
Conserved hypothetical protein	<b>AGI85146</b>	<b>AGN26876</b>	<b>WP_019176769.1</b>	2*†	arCOG02882
AIR synthase-like protein	<i>AGI85549</i>	<i>AGN26462</i>	<i>WP_019176932.1</i>	2	arCOG00640
Predicted DNA-binding protein containing a Zn-ribbon domain	<i>AGI84948</i>	<i>AGN25597</i>	<i>WP_019176187.1</i>	2*	arCOG01116
Methyltransferase related protein (MtxX)	<i>AGI85117</i>	<i>AGN26654</i>	<i>WP_019177314.1</i>	3	arCOG00854
Conserved hypothetical protein	<i>AGI84870</i>	<i>AGN25885</i>	<i>WP_019178690.1</i>	3*	arCOG04893
Fe-S oxidoreductase, related to NifB/MoaA family	-	-	-	4*	arCOG00950
Conserved hypothetical protein	-	-	-	4	arCOG04866
N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase, subunit A (MtrA)	-	-	-	4*	arCOG03221
N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase, subunit B (MtrB)	-	-	-	4	arCOG04867
N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase, subunit C (MtrC)	-	-	-	4	arCOG04868
N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase, subunit D (MtrD)	-	-	-	4	arCOG04869
N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase, subunit E (MtrE)	-	-	-	4	arCOG04870
Soluble P-type ATPase	-	-	-	5	arCOG01579
Uncharacterized conserved protein	-	-	-	5*	arCOG04844
Conserved hypothetical protein (putative kinase)	-	-	-	6	arCOG04885

Protein accession numbers with the same font (bold, italics or bold-italics) are encoded by genes situated close to each other in their respective genomes.

\*Paralogues.

†Related to a bacterial cluster with same conserved domain.

1, Methanogenesis marker, present in and unique to all sequenced methanogens and not in other archaea.

2, Present in all sequenced methanogens and less than 5% of other sequenced archaea.

3, Present in more than 90% of sequenced methanogens including Methanomassiliicoccales and less than 5% of other sequenced archaea.

4, Absent from the Methanomassiliicoccales but present and unique to all other methanogens.

5, Absent from the Methanomassiliicoccales but present in more than 90% other methanogens and not in other archaea.

6, Absent from the Methanomassiliicoccales but present in more than 90% of sequenced methanogens and less than 5% of other sequenced archaea.

of *M. luminyensis* and "*Ca. M. alvus*". At the exception of *mcrABG* and *atwA* [58], they encode for proteins of unknown function. One of these proteins (WP\_019176775.1, AGN26870, AGI85145), not previously reported as a

methanogenesis marker, might be associated to the functioning of Mcr as it is encoded by a gene located directly upstream *mcrA* in the three Methanomassiliicoccales genomes. The *nifD*-like (NifD) gene previously proposed

to be involved in the biosynthesis of the coenzyme F<sub>430</sub>, the prosthetic group of Mcr/Mrt, is also present in the three genomes [59]. It forms a cluster with a UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide synthase like gene (Table 5) and a *nifH*-like gene also suggested to be involved in coenzyme F<sub>430</sub> biosynthesis. Several uncharacterized proteins are shared by almost all methanogens, while present in very few other archaea, suggesting a tight relationship with methanogenesis (Table 5). This is for example the case of a putative methyltransferase MtxX [60] only missing in *Methanosaeta concilii* GP6 (but still present as a pseudogene, MCON\_2260) among methanogens and only present in *Ferroglobus placidus* DSM-10642 among non-methanogens.

Other genes present in the three genomes are more widely distributed than in methanogens but play a crucial role in methanogenesis. This is the case of genes required for the biosynthesis of the coenzyme M and coenzyme B involved in the last step of methanogenesis. Inferred CoM biosynthesis uses sulfopyruvate, which originates from 3-phosphoserine converted to cysteate by a cysteate synthase and then to sulfopyruvate (ComDE), as observed in Methanosarcinales, Methanomicrobiales [61] and Methanocellales (Additional file 1: Table S11). An alternative pathway takes place in other methanogens, where CoM originates from phosphoenolpyruvate and sulfite to produce sulfolactate, which is then oxidized [62-64]. These steps require the activity of enzymes encoded by the *comABC* genes which are absent in the three genomes, similar to what is observed in Methanosarcinales and Methanomicrobiales (Additional file 1: Table S11).

### Energy conservation

Methanogenesis is coupled to energy conservation through the establishment of a proton and/or sodium ion electrochemical gradient across the cytoplasmic membrane that drives an archaeal-type A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATP synthase complex to form ATP [65]. The genes coding for this complex are found in close association with the putative origin of replication in the three genomes (Figure 2, Table 6). The exergonic reduction of the heterodisulfide CoM-S-S-CoB formed by the Mcr complex is a crucial step for energy conservation conserved in all methanogens. The three genomes harbor at least one copy of *hdrA*, *hdrB* and *hdrC* homologues encoding a soluble heterodisulfide reductase (Table 6), HdrB representing the catalytic activity for CoM-S-S-CoB reduction. The current HdrA differs from its homologues present in other methanogens by its longer size and the presence of two predicted FAD-binding sites instead of one, and three 4Fe-4S centers instead of four. The three genomes also contain homologues of *hdrD*, encoding the catalytic site of a second class of heterodisulfide reductase (HdrDE), but

no homologues of *hdrE* encoding the membrane bound cytochrome subunit of this complex. Similarly to the Methanococcales, Methanobacteriales and Methanopyrales, the *hdrB* and *hdrC* genes are adjacent whereas the *hdrA* gene is located apart and in close association with *mvhDGA* encoding the cytoplasmic F<sub>420</sub>-non-reducing hydrogenase, absent from members of the Methanosarcinales and some Methanomicrobiales [66]. MvhA contains the Ni-Fe domain for activation of H<sub>2</sub>. MvhADG and HdrABC were shown to form a complex that couples the reduction of CoM-S-S-CoB and a ferredoxin with H<sub>2</sub> through a flavin-based electron bifurcation in *Methanothermobacter marburgensis* [67]. Presence of MvhADG and HdrABC in the three Methanomassiliococcales representatives suggests a similar process (Figure 4). Energy conservation may likely result from the subsequent reoxidation of ferredoxin coupled to translocation of H<sup>+</sup> (or possibly Na<sup>+</sup>) across the membrane by a membrane associated enzymatic complex (Figure 4), as proposed by Thauer *et al.* [68] for *M. stadtmanae*. However the Ehb complex likely responsible for the translocation Na<sup>+</sup> in *M. stadtmanae* is not present in the three Methanomassiliococcales representatives.

The only identified complex shared by the three genomes which could fulfil this role corresponds to the 11-subunits respiratory complex I found in a large number of archaea and bacteria [69]. This complex is homologous to the Fpo complex (F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> dehydrogenase) of Methanosarcinales [70]. Characterized respiratory complex I and Fpo catalyze the exergonic transfer of electrons from a cytoplasmic electron transporter to a membrane soluble electron transporter coupled to the translocation of ions across the membrane [69,70]. A similar process in Methanomassiliococcales would thus imply a membrane associated electron transport chain which was so far only observed in *Methanosarcinales* among methanogens. The currently predicted enzymatic complex is truncated as compared to the Fpo of *Methanosarcina* spp. with the lack of homologues of the FpoO and FpoF subunits, forming an FpoABCDHIJKLMN like complex (Figure 4, Table 6). The lack of the FpoF subunit is similar to the Fpo complex of *Methanosaeta* representatives which were proposed to use ferredoxin instead of F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> as electron donor [71] (Table 6). The three genomes also harbor genes required for biosynthesis of a liposoluble electron transporter (Additional file 3, Table 6), whose role may be to accept electrons from the Fpo complex [72]. This membrane-soluble electron carrier, whose biochemical nature has to be determined experimentally, would drive electron transfer in the membrane, linking the Fpo complex to another membrane bound protein/complex, possibly a second coupling site reducing the heterodisulfide. The energy-converting hydrogenase EchA-F is another membrane enzymatic complex which could also translocate ions by the re-oxidation of the ferredoxin [73] but it only



**Table 6 Genes involved in energy conservation in "Ca. M. alvus", "Ca. M. intestinalis" and M. luminyensis and accession numbers of the proteins they encode**

	"Ca. M. alvus"	"Ca. M. intestinalis"	M. luminyensis	Transmembrane helices
ATP synthase				
<i>ahaH</i>	AGI84762.1	AGN25422.1	WP_019178382.1	no
<i>ahaI</i>	AGI84763.1	AGN25423.1	WP_019178381.1	yes
<i>ahaK</i>	AGI84764.1	AGN25424.1	WP_019178380.1	yes
<i>ahaE</i>	AGI84765.1	AGN25425.1	WP_019178379.1	no
<i>ahaC</i>	AGI84766.1	AGN25426.1	WP_019178378.1	no
<i>ahaF</i>	AGI84767.1	AGN25427.1	WP_019178377.1	no
<i>ahaA</i>	AGI84768.1	AGN25428.1	WP_019178376.1	no
<i>ahaB</i>	AGI84769.1	AGN25429.1	WP_019178375.1	no
<i>ahaD</i>	AGI84770.1	AGN25430.1	WP_019178374.1	no
Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase				
<i>hppA</i>	/	AGN26077.1	WP_019176822.1	yes
Heterodisulfide reductase				
<i>hdrA</i>	AGI85054.1	AGN25863.1	WP_019177460.1	no
<i>hdrB1</i>	AGI86093.1	AGN25718.1	WP_019177711.1	no
<i>hdrB2</i>	AGI85474.1	AGN25916.1	WP_019176125.1	no
<i>hdrC1</i>	AGI86094.1	AGN25719.1	WP_019177712.1	no
<i>hdrC2</i>	/	/	WP_019176126.1	no
<i>hdrD1</i>	AGI86375.1	AGN25510.1	WP_019178460.1	no
<i>hdrD2</i>	AGI86212.1	AGN25649.1	WP_019177852.1	no
<i>hdrD3</i>	/	/	WP_019177557.1	no
<i>hdrE</i>	/	/	/	/
Methyl-viologen-reducing hydrogenase				
<i>mvhD1</i>	AGI85055.1	AGN25864.1	WP_019177459.1	no
<i>mvhD2</i>	/	AGN25453.1	WP_019176201.1	no
<i>mvhD3</i>	/	/	WP_019176130.1	no
<i>mvhG</i>	AGI85056.1	AGN25865.1	WP_019177458.1	no
<i>mvhA</i>	AGI85057.1	AGN25866.1	WP_019177457.1	no
F <sub>420</sub> H <sub>2</sub> dehydrogenase-like/11-subunit respiratory complex 1				
<i>fpoA</i>	AHA34030.1	AGN25601.1	WP_019176183.1	yes
<i>fpoB</i>	AGI84952.1	AGN25602.1	WP_019176182.1	no
<i>fpoC</i>	AGI84953.1	AGN25603.1	WP_019176181.1	no
<i>fpoD</i>	AGI84954.1	AGN25604.1	WP_019176180.1	no
<i>fpoF</i>	/	/	/	
<i>fpoH</i>	AGI84955.1	AGN25605.1	WP_019176179.1	yes
<i>fpoI</i>	AGI84956.1	AGN25606.1	WP_019176178.1	no
<i>fpoJ<sub>N</sub></i>	AGI84957.1	AGN25607.1	WP_019176177.1	yes
<i>fpoJ<sub>C</sub></i>	AGI84958.1	AGN25608.1	WP_019176176.1	yes
<i>fpoK</i>	AGI84959.1	AGN25609.1	WP_019176175.1	yes
<i>fpoL</i>	AGI84960.1	AGN25610.1	WP_019176174.1	yes
<i>fpoM</i>	AGI84961.1	AGN25611.1	WP_019176173.1	yes
<i>fpoN</i>	AGI84962.1	AGN25612.1	WP_019176172.1	yes

**Table 6 Genes involved in energy conservation in "Ca. M. alvus", "Ca. M. intestinalis" and *M. luminyensis* and accession numbers of the proteins they encode (Continued)**

<i>fpoO</i>	/	/	/	
Energy-converting hydrogenase				
<i>echA1</i>	/	AGN25511.1	WP_019178471.1	yes
<i>echA2</i>	/	AGN26997.1	WP_019176386.1	yes
<i>echB1</i>	/	AGN25512.1	WP_019178472.1	yes
<i>echB2</i>	/	AGN26998.1	WP_019176385.1	yes
<i>echC1</i>	/	AGN25513.1	WP_019178473.1	no
<i>echC2</i>	/	AGN26999.1	WP_019176384.1	no
<i>echD1</i>	/	AGN25514.1	WP_019178474.1	no
<i>echD2</i>	/	AGN27000.1	WP_019176383.1	no
<i>echE1</i>	/	AGN25515.1	WP_019178475.1	no
<i>echE2</i>	/	AGN27001.1	WP_019176382.1	no
<i>echF1</i>	/	AGN25516.1	WP_019178476.1	no
<i>echF2</i>	/	AGN27002.1	WP_019176381.1	no
Liposoluble electron transporter synthesis				
<i>ispA<sup>a</sup></i>	AGI84964.1	AGN25614.1	WP_019176170.1	/
<i>ubiA<sup>b</sup></i>	AGI85875.1	AGN26416.1	WP_019178349.1	/
		AGN26109.1		
<i>ubiE<sup>c</sup></i>	AGI85874.1	AGN26417.1	WP_019178072.1	/
		AGN25541.1	WP_019178198.1	
			WP_019176998.1	

<sup>a</sup>encoding a geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS).

<sup>b</sup>encoding a 1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase (DHNOPT).

<sup>c</sup>encoding a 2-heptaprenyl-1,4-naphthoquinone methyltransferase (HPNQMT).

occurs in *M. luminyensis* and "Ca. M. intestinalis" (Figure 4). Nevertheless EchA-F could also operate in reverse and exploit the chemosmotic gradient for anabolic reactions [74]. Finally, a gene encoding a membrane-bound pyrophosphatase is found in the genomes of *M. luminyensis* and "Ca. M. intestinalis" (Table 6) but not in "Ca. M. alvus". This protein is predicted to allow the translocation of protons across the cytoplasmic membrane by hydrolysis of PPi to phosphate [75,76].

The three genomes share an original combination of genes likely involved in energy conservation, suggesting a different process than what is observed in other methanogens. The predicted flavin-based electron bifurcation in MvhADG/HdrABC complex is a feature shared by most methanogens with the exception of Methanosarcinales and some Methanomicrobiales representatives, while the putative membrane associated electron transport chain related to the activity of the Fpo-like complex was so far a unique feature of Methanosarcinales among methanogens. However, no membrane-bound cytochrome protein like those of the Methanosarcinales was detected to be encoded by the three genomes and the complete process remains to be uncovered.

#### Amber codon usage and putative Pyl-containing proteins

Previous studies have shown that the genes coding for methyl:corrinoic methyltransferases B dedicated to methylamines utilization (*mtmB*, *mtbB* and *mttB* for mono-, di- and tri-methylamines, respectively) present in *M. luminyensis*, "Ca. M. intestinalis" and "Ca. M. alvus" contain an in-frame *amber* Pyl-encoding codon [7,8,25], similarly to what is observed in Methanosarcinaceae and in a few bacteria [77,78], where it encodes the 22<sup>nd</sup> proteogenic amino acid pyrrolysine (Pyl, O). All the necessary genetic machinery is found in the three Methanomassiliicoccales genomes, including the genes for pyrrolysine synthesis (*pylBCD*), the *amber* suppressor tRNA<sup>Pyl</sup> (*pylT*) and the dedicated amino-acyl tRNA synthetase (*pylS*) [25]. The presence of decoding *amber* machinery questions the occurrence of Pyl in other proteins than the methyltransferases involved in methylotrophic methanogenesis. This possibility was addressed in the present study by searching all the TAG-interrupted CDS which share the same BLASTP hit with the virtual in-frame translation of the 3' flanking region. These CDS were fused *in silico* as a unique CDS, stopping at the next stop codon and predicted as potentially incorporating Pyl

during the translation process. As a positive control, this strategy identified the above-mentioned methylamines: corrinoid methyltransferases in the three genomes. No putative other Pyl-containing proteins were identified in *M. luminyensis*. One additional *amber*-containing CDS was determined in "*Ca. M. intestinalis*", a putative Fe-S binding protein (AGY50215), which is absent in "*Ca. M. alvus*" and present in *M. luminyensis* but not predicted to incorporate Pyl. "*Ca. M. alvus*" contains the highest number of predicted Pyl-containing proteins, 16 in addition to the methylamines: corrinoid methyltransferases (Table 7, Figure 5). Half of them have homologues in the two other genomes but without in-frame *amber* codons (in bold, Table 7). Among these 16 proteins, several have a hypothetical function and some are highly conserved in methanogens and/or archaea. This is the case of a digerylgeranylgeranyl glyceryl phosphate synthase required in the synthesis of archaeal phospholipids and of the putative methyltransferase MtxX (Tables 5 and 7). The CRISPR associated *cas1* gene, although present in the three genomes, is only detected as a Pyl-containing enzyme in "*Ca. M. alvus*". The activity and the effective incorporation of Pyl in such a large range of enzymes of the same organisms remain to be determined experimentally. However, this could reasonably be assumed considering

the existence of few functional Pyl-containing proteins (different of methylamines:corrinoid methyltransferases) reported from both Pyl-decoding archaea and bacteria [77,79,80].

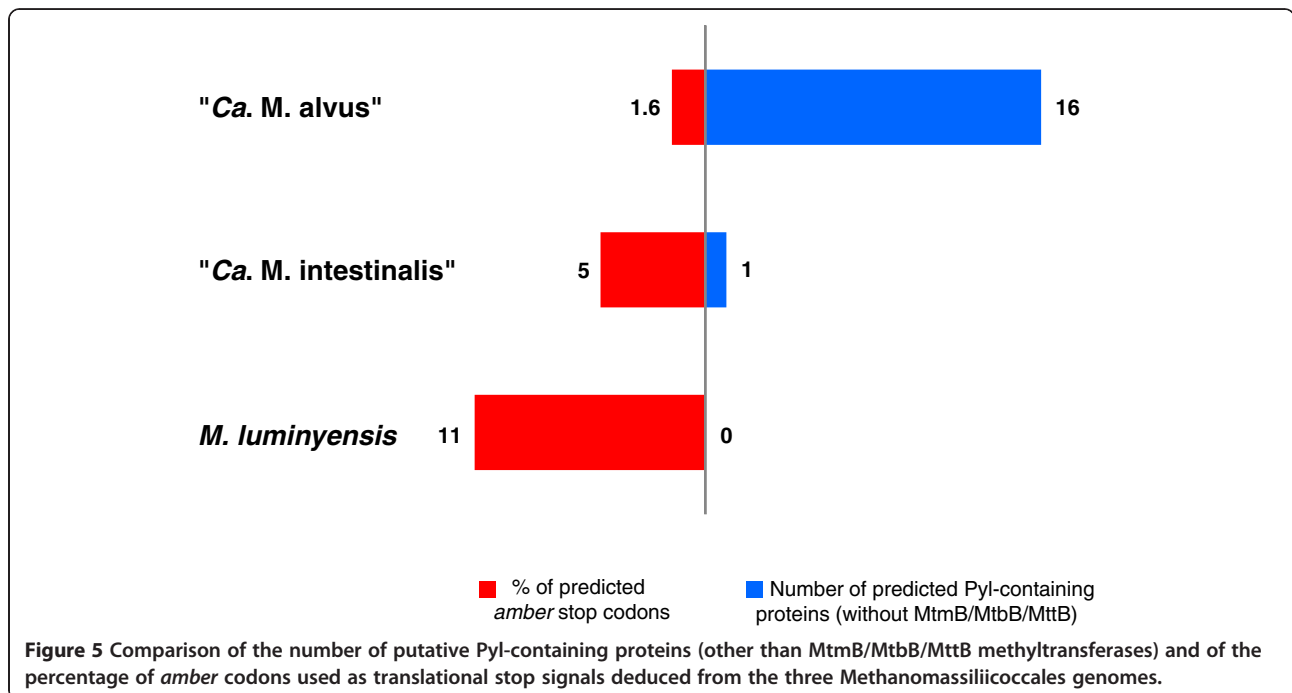
Particular genetic signals in the genes containing an in-frame TAG have been proposed to enhance the incorporation of Pyl in the proteins but are not obligatorily requested for that purpose [81]. Two alternative adaptations have been proposed for *Methanosarcina* spp. and the bacteria *Acetohalobium arabaticum* to minimize proteome alteration in consequence of the insertion of Pyl on the stop codons normally intended to stop the translation [77]. In *A. arabaticum* the expression of the Pyl-cassette has been shown to be regulated by substrate (trimethylamine) availability, while in *Methanosarcina* spp. which constitutively express the Pyl-cassette [79,82], the frequency of genes ended by a TAG stop codon is minimized (~4-5% in *Methanosarcina* spp. vs. 20-30% in *A. arabaticum* and other Pyl-decoding bacteria, see Additional file 1: Table S12 adapted from [77]). Accordingly, the extremely low frequency of TAG stop codons in "*Ca. M. alvus*" (1.6%) suggests a constitutive expression of the Pyl-cassette and an efficient ability to incorporate Pyl in proteins (Figure 5, Additional file 1: Table S12). In such tRNA<sup>Pyl</sup> suppressing context, the apparition of an in-frame *amber* codon in a

**Table 7 Putative Pyl-containing proteins in "*Ca. M. alvus*"**

Accession number	Annotation	Size <sup>a</sup>	Comments
<b>AGI84833.1</b>	hypothetical protein	253	DPM synthase like/GT2 superfamily
<b>AGI85009.1</b>	hypothetical protein	270	digeranylgeranyl glyceryl phosphate synthase
<b>AGI85117.2</b>	phosphotransacetylase-like protein	242	putative methyltransferase MtxX
<b>AGI85168.2</b>	filamentation induced by cAMP protein Fic	425	
AGI85186.1	hypothetical protein	149	Rv0623-like transcription factor
AGI85280.1	hypothetical protein	917	glycosyltransferase family 29
AGI85290.1	hypothetical protein	148	
AGI85300.1	hypothetical protein	444	ATPase domain
AGI85437.1	hypothetical protein	536	prophage Lp3 protein 8 (helicase) of <i>Lactobacillus</i> spp.
AGI85443.1	hypothetical protein	717	
<b>AGI85449.1</b>	hypothetical protein	262	putative methyltransferase
AGI85596.1	hypothetical protein	162	putative acetyltransferase
AGI85630.1	hypothetical protein	322	CRISPR- associated endonuclease cas1
<i>AGI85862.1</i>	<i>MMA:corrinoid methyltransferase</i>	459	
<i>AGI85863.1</i>	<i>MMA:corrinoid methyltransferase</i>	461	
<i>AGI85869.1</i>	<i>TMA:corrinoid methyltransferase</i>	504	
<i>AGI85870.1</i>	<i>DMA:corrinoid methyltransferase</i>	469	
AGI86303.1	hypothetical protein	389	Sel-1 domain containing protein
AGI86346.1	transporter family protein	289	bacterial/archaeal transporter family protein
<b>AGI86379.1</b>	uncharacterized protein	187	conserved in archaea (DUF531)

Proteins in bold indicate homologs in the two other members of the Methanomassiliicoccales, devoided of Pyl. Proteins in italics indicate homologs in the two other members of the Methanomassiliicoccales also containing Pyl.

<sup>a</sup>Number of amino acids.



CDS would lead to a stable mutation as supported by the high occurrence of genes predicted to encode Pyl-containing proteins in "*Ca. M. alvus*". The phylogenetic position of "*Ca. M. alvus*" among a large cluster of gut methanogens suggests a long evolutionary history in this type of environments where mono- di- and trimethylamine are likely not limiting [17,83,84] and may be obtained through the degradation of glycine betaine, choline and L-carnitine by co-occurring microorganisms [85-87]. This high availability of methylamines during the evolution of "*Ca. M. alvus*", involving a possibly high and constant expression of the Pyl-machinery, could have been a driving factor that has led to this particularly low usage of the triplet TAG in CDSs as termination signals during translation. In addition, the insertion of an *amber* codon in a gene coding for a protein of major function (such as the highly conserved MtxX, Cas1 or the digeranylgeranylglycerol phosphate synthase in the present case) might have turned the expression of the Pyl cassette and the efficient ability to incorporate Pyl essential for growth. As a feedback this would contribute to tight the association of "*Ca. M. alvus*" cluster methanogens with digestive tract environments. The absence of predicted Pyl-encoding proteins other than MtmB, MtbB and MttB and the high frequency of genes ended by TAG (11.3%) in *M. luminyensis* (Figure 5, Additional file 1: Table S12) argue for a different handling of the Pyl-encoding capacity, possibly through a more important regulation of Pyl-incorporation, and could reflect an adaptation to lower or more variable availability in methylamines [88]. Together with other genomic traits described above, this supports a

larger distribution of *M. luminyensis* than digestive tract environments. Following the hypothesis of a methylamine-directed selective pressure on TAG usage in CDSs of the Methanomassiliococcales, the intermediate TAG usage in the CDSs of "*Ca. M. intestinalis*" (Figure 5, Additional file 1: Table S12) would reflect a more stringent association to digestive tracts compared to *M. luminyensis*.

## Conclusions

Several atypical features were identified in the three genomes such as the scattering of the ribosomal RNA genes and the absence of eukaryotic-like histone gene otherwise present in most of Euryarchaeota genomes. The lack of the eukaryotic-like histone gene could represent an ancestral loss of the overall branch composed by Thermoplasmatales and related lineages, replaced by bacterial-type histone in Thermoplasmatales or Alba protein present in all genomes of the branch with the exception of "*Ca. M. intestinalis*" and "*Ca. M. alvus*". Intriguingly, the nature of this protein remains elusive in "*Ca. M. intestinalis*" and "*Ca. M. alvus*".

The absence of a large number of genes otherwise present in all methanogens, but not all restricted to methanogens, was previously reported in *M. luminyensis* and "*Ca. M. alvus*" genomes and is presently extended to "*Ca. M. intestinalis*". The large lack of these genes involved in the CO<sub>2</sub> reduction/methyl-oxidation pathways in other methanogens offers a unique context to redefine the genes encoding enzymes or isoenzymes shared by all and only methanogens. Interestingly, the reevaluation shows that this core is not deeply changed when

Methanomassiliicoccales are considered. In addition to the genes encoding the Mtr complex, only two of these methanogenesis marker genes are absent from the Methanomassiliicoccales genomes. Gathered with *mcrABG* on a small genomic portion in *M. luminyensis* and “*Ca. M. alvus*”, core genes encoding uncharacterized proteins could be intimately involved in the functioning of the Mcr complex. The process of energy conservation associated to methanogenesis on methyl-compound reduction with H<sub>2</sub> was analyzed. The original composition of genes presently identified to take part to this process suggests the involvement of a flavin-based electron bifurcation and a membrane associated electron transport chain which are distinctive elements of the two main energy conservation processes defined in other methanogens. However the complete process remains to be uncovered and several components have to be characterized.

While the three Methanomassiliicoccales representatives were cultured from gastrointestinal tract, the analysis of their genome revealed differential adaptations to this environment and possibly contrasted evolutionary history. One of the striking differences among the three species relies on their usage of the TAG codon which could have been shaped by the availability of methylamines as a substrate during their evolution. The long term adaptation of “*Ca. M. alvus*” to GIT environments, suggested by its position among a large cluster of GIT-derived sequences, is supported by its gene composition, along with lateral gene transfer from GIT-associated bacteria. The phylogenetic position of *M. luminyensis* and “*Ca. M. intestinalis*” among soil and sediment methanogens suggests a more recent adaptation or more facultative association to GIT conditions. Consistent with this hypothesis, the *M. luminyensis* genome contains several important genes which are specifically present in soil and sediment methanogens. Although phylogenetically close to *M. luminyensis*, “*Ca. M. intestinalis*” has a reduced genome with a lower [G + C] % and does not share the signatures of soil or sediment adaptations of *M. luminyensis*. These differences could reflect a phenomenon of streamlining in the “*Ca. M. intestinalis*” genome linked with its adaptation to GIT conditions. A similar phenomenon was previously reported from free-living bacteria [29] and with more extreme amplitude, in obligate pathogens [89] as well as in bacterial [90] and archaeal [91] symbionts.

## Methods

### Gene structure prediction

Complete genome sequences of “*Ca. M. alvus*” [GenBank: NC\_020913.1] and “*Ca. M. intestinalis*” [GenBank: NC\_021353.1] were obtained from enriched consortia of stool-derived cultures from a 91-year-old woman, with an average genome sequence coverage respectively of 36.9 fold and 42.7 fold [7,8]. Genomic sequences from

*Methanomassiliicoccus luminyensis* B10 were retrieved from the Genbank database [GenBank: CAJE01000001-CAJE01000026]. Raw sequences from “*Ca. M. alvus*” Mx1201, “*Ca. M. intestinalis*” Mx1-Issoire and *M. luminyensis* were fed to the RAST Annotation server [92] using Glimmer3 [93] for open-reading frames prediction. The RAST Annotation used the released 59 of FIGfam and no frameshifts fixing parameters. To perform an accurate structural annotation of these genomes, a comparative analysis of the “*Ca. M. alvus*”, “*Ca. M. intestinalis*” and *M. luminyensis* annotated proteomes was conducted using the TBLASTN program. To identify genes or distantly related genes, a BLOSUM45 substitution matrix was chosen, and low-complexity filters were suppressed. TBLASTN analyses were manually validated to take into account genes with frame-shifts due to sequencing errors. Translation start codons were then validated through a BLASTP comparative analysis of the three annotated proteomes. Protein sequences from the three proteomes were compared together with the curated SWISS-PROT protein sequences database [94]. Results were filtered using 80% length and 40% identity thresholds and start codons were manually corrected taking into account protein sizes and local alignments. Non-coding RNAs were predicted using the Rfam database [95] with an E-value threshold of 1 and results were manually curated. Additional analyses were performed to detect tRNAs by merging results from tRNAscan [96], TFAM [97], ARAGORN [98] and BLASTN [99]. CRISPRFinder [100] was applied for each of the three genomes to detect CRISPR loci that were compared together using CRISPRcompar [101] and CRISPRmap [102]. Finally, prophages were sought using PHAST [103]. Circular representation of the “*Ca. M. alvus*” and “*Ca. M. intestinalis*” genomes were performed using the CGView Server [104].

### Comparative genome analysis and functional annotation

An ‘all-versus-all’ BLASTP comparison of the predicted protein sequences within each of the three genomes was conducted [99]. On the basis of the best BLASTP hits, orthologous relationships were established between the protein sequences of “*Ca. M. alvus*”, “*Ca. M. intestinalis*” and *M. luminyensis*. A Venn diagram was then drawn using the Venny web service [105]. Predicted functions provided by the RAST annotation server for each CDS of the three species were kept as functional annotation. Using orthology relationships previously established, a functional annotation transfer was performed. Protein sequences of genes with frame-shift mutations were manually reconstructed. In order to distinguish protein sequences only found within the three genomes and shared protein sequences with closely related species, a BLASTP analysis was conducted. Each protein sequence from the core proteome was compared to i) phylogenetic



neighbors proteomes (*Aciduliprofundum boonei* T469, accession code: NC\_013926; *Aciduliprofundum sp.* MAR08-339, accession code: NC\_019942; *Ferroplasma acidarmanus* fer1, accession code: CM000428; *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728, accession code: NC\_002578; *Thermoplasma volcanium* DSS1, accession code: NC\_002689 and MG-II, accession code: CM001443), ii) methanogenic archaeon from human gut (*Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061, accession code: NC\_009515 and *Methanosphaera stadtmanae* DSM 3091, accession code: NC\_007681) and iii) the NCBI non-redundant protein sequences database (release 12/2012). Identity threshold was set at 30% with a minimum length coverage of 80%. An arCOG [45] analysis was also performed using the December 2012 release (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/wolf/COGs/arCOG/>). Each annotated protein sequence from the three genomes was compared to the arCOG database using BLASTP and an E-value threshold equal to  $1e^{-3}$ . The arCOG profiles of the three genomes and those of the arCOG database were used to identify proteins potentially shared by all and only methanogens, as well as proteins almost specific to methanogens and shared by almost all methanogens. Distribution of each selected protein among sequenced organisms was checked by BLASTP. Conserved domains of the selected proteins were compared to those of the closest results that belong to non-methanogens and phylogenetic trees were constructed to verify their monophyly. Additional proteomes from various archaeal orders were also submitted to this comparison: *A. boonei* T469; *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, accession code: NC\_013926; *Archaeoglobus veneficus* SNP6, accession code: NC\_015320; *M. smithii* ATCC 35061; *M. stadtmanae* DSM 3091; *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728, accession code: NC\_002578 and MG-II. In order to detect putative lateral gene transfers, the same BLASTP analysis was performed for the three proteomes using the UniprotKB database [106]. Only best hits were retrieved and classified according to the three domains of life: Archaea, Bacteria or Eukaryota. The genomes of the Methanomassiliococcales representatives were not included in the subject database. Metabolic pathways reconstruction was performed through the KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) [107] using a bi-directional best hit strategy and a custom list of reference organisms. Indeed, based on best BLAST hit results from the three proteomes, 40 species were selected for the KAAS (three-letter organism codes are listed as follows: abi, mac, tac, mba, rci, mig, afu, mpd, tba, mpi, pab, mka, pho, mhu, mja, mla, mth, cdc, amt, drm, mbn, ssg, ele, fnu, mel, mrv, fsv, tsi, lba, ral, sti, msi, sce, eco, ere, aas, eha, sfu, bla, cau). The transportome was determined using the TransportTP server [108] (reference organism: *Escherichia coli*; E-value threshold: 0.1). Results were manually validated and curated using BLASTP analysis

using transportDB [109] and taking into account orthology relationships. Signal peptides, transmembrane helices and PFAM domains were predicted through the InterProScan annotation module provided by the BLAST2GO software [110] with default parameters.

#### Phylogenomic analysis of DNA replication components

Homologs of each major archaeal DNA replication component were retrieved from the reference sequence database at the NCBI using the BLASTP program with different seeds from each archaeal order [99]. The top 100 best hits for each order were then used to create HMM profiles [111] (<http://www.hmmer.org>) that allowed iteratively searching a local database of 142 complete or nearly complete archaeal genomes including 98 plasmid sequences, as well as in a local database of the available complete archaeal virus genomes (56 total) downloaded from the Viral Genomes database of NCBI (as of June 20<sup>th</sup> 2013). Absences of a given homolog in a specific genome were verified by performing additional TBLASTN searches [99]. Multiple alignments were done with MUSCLE 3.8.31 [112] and manually inspected using the ED program from the MUST package to remove non-homologous or partial sequences [113]. The alignments were trimmed using the software BMGE [114] with default parameters. Phylogenetic analyses were performed on single protein datasets using Maximum Likelihood and Bayesian methods. Maximum likelihood analyses were performed with RaxML [115]. Mr. Bayes 3.2 [116] was used to perform Bayesian analyses using the mixed amino acid substitution model and four categories of evolutionary rates. Two independent runs were performed for each data set, and runs were stopped when they reached a standard deviation of split frequency below 0.01 or the log likelihood values reached stationarity. The majority-rule consensus trees were obtained after discarding first 25% samples as 'burn-in'.

#### Data access

The whole genome shotgun projects, the complete genome sequences and annotations have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank for "*Ca. M. alvus*" Mx1201 [GenBank: CP004049] and for "*Ca. M. intestinalis*" Issoire-Mx1 [GenBank: CP005934]. Predicted CDS and protein sequences for *M. luminyensis*, some of which are not annotated in GenBank are provided respectively through Additional file 1: Tables S12 and S13.

#### Additional files

**Additional file 1: Additional tables in a zipped folder containing:**  
**Table S1.** tRNA and ncRNA contents for the genomes of the three Methanomassiliococcales representatives. **Table S2.** Codon usage in the three genomes of Methanomassiliococcales. **Table S3.** CRISPR DR elements found in the three genomes. **Table S4.** Number of best hits

score among the three domains of life. **Table S5.** Genes list of the core genome of the Methanomassiliicoccales, as deduced by a TBLASTN analysis (with reference to CDS of "Ca. M. alvus" genome), and their presence or not in phylogenetical neighbors, human gut Methanobacteriales and non-redundant genbank DB. **Table S6.** CDS list of the core genome of the Methanomassiliicoccales, absent in phylogenetical neighbors and the human gut Methanobacteriales. In blue, the 20 CDS not retrieved in genbank database. **Table S7.** arCOG distribution among the Methanomassiliicoccales representative genomes, gut methanogens and some other archaea. **Table S8.** Complete list of transporters detected by TransportDB, in the three genomes of Methanomassiliicoccales. **Table S9.** List of the antioxidant systems in the three genomes of Methanomassiliicoccales. **Table S10.** Genes involved in methanogenesis in "Ca. M. alvus", "Ca. M. intestinalis" and *M. luminyensis* and accession numbers of the proteins they encode. **Table S11.** Comparative presence of the genes involved in the synthesis of the coM among the seven orders of methanogens. **Table S12.** Numbers of CDS with in-frame TAG, and % of the total CDS in various genomes of microorganisms coding or not pyrrolysine (update information from Prat et al. [77]). **Table S13.** CDS list of *M. luminyensis* B10. **Table S14.** Proteome of *M. luminyensis* B10.

**Additional file 2: Additional figures in a zipped folder containing:**

**Figure S1.** CRISPR Direct Repeats structure. The figure shows the 2D, Minimum Free Energy structure of CRISPR DRs retrieved from the three genomes of the Methanomassiliicoccales (using RNAfold web server [117]) and the sequence alignment of *M. luminyensis* DR with the family 3, motif 27 DRs (using CRISPRmap [34]). **Figure S2.** Chromosome circular maps of (A) "Candidatus Methanomethylophilus alvus" Mx1201 and (B) "Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis" Mx1-Isoire genomes (generated with CGView [104]). Circles display from outside: 1 and 4, rRNA genes respectively on forward and reverse strand; 2 and 3, CDS on forward and reverse strand; 5, BLASTX results with a maximum expected value of  $1e^{-3}$  versus the "Ca. M. intestinalis" proteome; 6, [G + C] % content deviation from the average [G + C] % content of the genome. Arrows, location and sense of the *orc1/cdc6* genes. **Figure S3.** Phylogeny of Cdc6/Orc1 proteins.

**Figure S4.** Phylogenetic trees of NAD-dependent DNA ligase (A) and Chologlycine hydrolase (B) genes likely transferred from bacteria to "Ca. M. alvus". In red, sequences of "Ca. M. alvus", in blue sequences from other gut-associated methanogens. **Figure S5.** Metabolic comparison of the three genomes based on KEGG maps. Series of three boxes represent presence or absence of the E.C. numbered enzyme (yellow for "Ca. M. alvus", green for "Ca. M. intestinalis" and blue for *M. luminyensis*). Green arrows replace complex pathways. Blue boxes, synthesized compounds by the 3 species; Red boxes, compounds not synthesized by the three species. Orange boxes, compounds synthesized by at least 1 species. Question marks show pathways where there is at least one enzyme missing. **Figure S6.** Comparison of the physical map of genes involved in methanogenesis on methyl compounds + H<sub>2</sub> in the three analyzed genomes.

**Additional file 3: Additional Data in a zipped MS Word file.** Details on lipids, amino acids and purine synthesis, as well as molecular nitrogen fixation deduced from the genomes of the three members of the Methanomassiliicoccales.

## Abbreviations

aaRS: Aminoacyl tRNA synthetase; AIR: 5-amino-4-imidazole ribonucleotide; arCOG: Archaeal Cluster of Orthologous Genes; ASAT: Aspartate aminotransferase; BSH: Bile Salt Hydrolase; CAIR: 5-amino-4-imidazole carboxylic acid ribonucleotide; Cdc6: Cell division cycle 6; CDS: Coding DNA sequence; CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat; CS: Cysteate Synthase; DHNOPT: 1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase; DMS: Dimethylsulfide; DPL: DNA polymerase D large subunit; DPM: Dolichol-phosphate mannose; DPS: DNA polymerase D small subunit; FEN-1: Flap EndoNuclease 1; GGPS: (S)-3-O-geranylgeranylglycerol phosphate synthase; GINS: Go-Ichi-Nii-San protein; GIT: Gastro-intestinal tract; GT: Glycosyl Transferase; H<sub>4</sub>MP: Tetrahydromethanopterin; Hec: Unknown hydrogenase, probable energy-converting; HPNQMT: 2-heptaprenyl-1,4-naphthoquinone methyltransferase; IPPK: Isopentenyl phosphate kinase; LGT: Lateral Gene Transfer; LSU: Large subunit; MCM: Minichromosome maintenance protein; MG-II: Uncultured Marine Group II; NCAIR: N5-5-amino-4-imidazole carboxylic acid ribonucleotide; nr: Non-redundant; ORB: Origin recognition box; ORF: Open Reading Frame; Ori: Origin of replication; PCNA: Proliferating Cell Nuclear

Antigen; PFOR: Pyruvate:ferredoxin oxydoreductase; PMDC: Phosphomevalonate decarboxylase; PMK: Phosphomevalonate kinase; PPS: Polyprenyl synthetase; PriL: Primase large subunit; PriS: Primase small subunit; PRPP: Phosphoribosyl pyrophosphate; Pyl: Pyrrolysine; RCC: Rumen cluster C; RFC: Replication Factor C; RNaseH: Ribonuclease H; RPA: Replicative Protein A; SD: Standard Deviation; SSB: Single Strand Binding protein; SSU: small subunit; TMA: Trimethylamine; Topo: Topoisomerase.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

GB, NP, HMBH, EP, NG, WT, PP, PWOT and JFB performed the bioinformatic analyses of these genomes (from assembly to the functional annotations, encompassing general statistics, tRNAs, ncRNA, CRISPRs, transporters,...). OB, GB, NP and JFB determined the general metabolisms. KR and SG identified the core DNA replication genes and performed phylogenetic analyses. GB, NP, PP, EP, PWOT and JFB conceived the study, participated in its design and coordination. GB, NP, PP, EP, PWOT, SG and JFB helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by three PhD. Scholarship supports, one from the "Direction Générale de l'Armement" (DGA) to N.P., one from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" to N.G. and one of the European Union (UE) and the Auvergne Council to W.T. (FEDER). P.W. O.T. was supported by Science Foundation Ireland through a Principal Investigator award, by a CSET award to the Alimentary Pharmabiotic Centre, and by an FHRI award to the ELDERMET project by the Dept. Agriculture, Fisheries and Marine of the Government of Ireland. SG is supported by the Investissement d'Avenir grant "Ancestrom" (ANR-10- BINF-01-01). KR is a scholar from the Pasteur - Paris University (PPU) International PhD program and receives a stipend from the Paul W. Zuccaire Foundation. JFB thanks the "centre hospitalier Paul Ardier" in Issoire, especially Dr Mansoor, Dr Denozi and their staff for their valuable help, and Agnès Mihajlovski for her help in initiating this project.

This article is dedicated to the memory of PB (1937-2009), who was much more than the anecdotally first human known to carry an archaeon from the 7<sup>th</sup> methanogenic order.

## Author details

<sup>1</sup>EA-4678 CIDAM, Clermont Université, Université d'Auvergne, 28 Place Henri Dunant, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>2</sup>School of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre, University College Cork, Cork, Ireland. <sup>3</sup>CNRS, UMR 6023, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>4</sup>GReD, CNRS, UMR 6293, Inserm, UMR 1103, Clermont Université, Université d'Auvergne 28 Place Henri Dunant, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France. <sup>5</sup>Département de Microbiologie, Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrémophiles, Paris 75724 Cedex 15, France. <sup>6</sup>Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, Paris 75724 Cedex 15, France.

Received: 10 January 2014 Accepted: 18 July 2014

Published: 13 August 2014

## References

1. Tajima K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov R: **Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens.** *FEMS Microbiol Lett* 2001, **200**(1):67-72.
2. Wright A-DG, Williams AJ, Winder B, Christophersen CT, Rodgers SL, Smith KD: **Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia.** *Appl Environ Microb* 2004, **70**(3):1263-1270.
3. Janssen PH, Kirs M: **Structure of the archaeal community of the rumen.** *Appl Environ Microb* 2008, **74**(12):3619-3625.
4. Mihajlovski A, Alric M, Brugère J-F: **A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene.** *Res Microbiol* 2008, **159**(7):516-521.
5. Mihajlovski A, Doré J, Levenez F, Alric M, Brugère J-F: **Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity.** *Environ Microbiol Rep* 2010, **2**(2):272-280.

6. Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M: *Methanomassiliococcus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012, **62**(Pt 8):1902–1907.
7. Borrel G, Harris HM, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, Peyret P, Gribaldo S, O'Toole PW, Brugère JF: Genome sequence of “*Candidatus Methanomethylphilus alvus*” Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *J Bacteriol* 2012, **194**(24):6944–6945.
8. Borrel G, Harris HM, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, Deane J, Gribaldo S, Bardot O, Peyretailade E: Genome sequence of “*Candidatus Methanomassiliococcus intestinalis*” Issoire-Mx1, a third Thermoplasmatales-related methanogenic archaeon from human feces. *Genome Announc* 2013, **1**(4):e00453–00413.
9. Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A: “Methanoplasmatales”, Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microb* 2012, **78**(23):8245–8253.
10. Iino T, Tamaki H, Tamazawa S, Ueno Y, Ohkuma M, Suzuki K, Igarashi Y, Haruta S: *Candidatus Methanogramum caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of methanomassiliococaceae fam. nov. and Methanomassiliococcales ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class Thermoplasmata. *Microbes Environ/JSME* 2013, **28**(2):244–250.
11. Hedderich R, Whitman WB: Physiology and biochemistry of the methane-producing Archaea. In *The prokaryotes*. New York: Springer; 2006:1050–1079.
12. Oren A, Garrity GM: List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013, **63**(11):3931–3934.
13. Huang XD, Tan HY, Long R, Liang JB, Wright A-DG: Comparison of methanogen diversity of yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*) from the Qinghai-Tibetan plateau, China. *BMC Microbiol* 2012, **12**(1):237.
14. Wright A-DG, Auckland CH, Lynn DH: Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Appl Environ Microb* 2007, **73**(13):4206–4210.
15. Wright A-DG, Toovey AF, Pimm CL: Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 2006, **12**(3):134–139.
16. Borrel G, O'Toole PW, Harris HM, Peyret P, Brugère J-F, Gribaldo S: Phylogenomic data support a seventh order of methanogenic archaea and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol* 2013, **5**(10):1769–1780.
17. Poulsen M, Schwab C, Jensen BB, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fregner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A, Urlich T: Methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun* 2013, **4**:1428.
18. Gorlas A, Robert C, Gimenez G, Drancourt M, Raoult D: Complete genome sequence of *Methanomassiliococcus luminyensis*, the largest genome of a human-associated Archaea species. *J Bacteriol* 2012, **194**(17):4745–4745.
19. Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF: Archaea from the human gut: the new beginning of an old story. *World J Gastroenterol* in press.
20. Brugère JF, Borrel G, Gaci N, Tottey W, O'Toole PW, Malpuech-Brugère C: Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes* 2014, **5**(1):6.
21. Mackay RJ, McEntyre CJ, Henderson C, Lever M, George PM: Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. *Clin Biochem Rev* 2011, **32**(1):33.
22. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung Y-M: Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011, **472**(7341):57–63.
23. Srinivasan G, James CM, Krzycki JA: Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 2002, **296**(5572):1459–1462.
24. Krzycki JA: Function of genetically encoded pyrrolysine in corrinoid-dependent methylamine methyltransferases. *Curr Opin Chem Biol* 2004, **8**(5):484–491.
25. Borrel G, Gaci N, Peyret P, O'Toole PW, Gribaldo S, Brugère J-F: Unique characteristics of the pyrrolysine system in the 7<sup>th</sup> order of methanogens: implications for the evolution of a genetic code expansion cassette. *Archaea* 2014, **2014**:374146.
26. Sheppard K, Yuan J, Hohn MJ, Jester B, Devine KM, Söll D: From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(6):1813–1825.
27. Ree HK, Zimmermann RA: Organization and expression of the 16S, 23S and 5S ribosomal RNA genes from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Res* 1990, **18**(15):4471–4478.
28. Ciesielski S, Bulkowska K, Dabrowska D, Kaczmarczyk D, Kowal P, Mozejko J: Ribosomal intergenic spacer analysis as a tool for monitoring methanogenic archaea changes in an anaerobic digester. *Curr Microbiol* 2013.
29. Dufresne A, Garczarek L, Partensky F: Accelerated evolution associated with genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biol* 2005, **6**(2):R14.
30. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007, **315**(5819):1709–1712.
31. Fischer S, Maier LK, Stoll B, Brendel J, Fischer E, Pfeiffer F, Dyal-Smith M, Marchfelder A: An archaeal immune system can detect multiple protospacer adjacent motifs (PAMs) to target invader DNA. *J Biol Chem* 2012, **287**(40):33351–33363.
32. Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P: CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**(3):181–186.
33. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM: Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002, **43**(6):1565–1575.
34. Lange SJ, Alkhnbashi OS, Rose D, Will S, Backofen R: CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems. *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(17):8034–8044.
35. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**(6):467–477.
36. Venesson DM, Weimer PJ: Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **75**(1):165–174.
37. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borrel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, et al: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011, **473**(7346):174–180.
38. Prangishvili D, Forterre P, Garrett RA: Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**(11):837–848.
39. Prangishvili D, Garrett RA, Koonin EV: Evolutionary genomics of archaeal viruses: unique viral genomes in the third domain of life. *Virus Res* 2006, **117**(1):52–67.
40. Pelve EA, Martens-Habben W, Stahl DA, Bernander R: Mapping of active replication origins *in vivo* in thaum- and euryarchaeal replicons. *Mol Microbiol* 2013, **90**(3):538–550.
41. Raymann K, Forterre P, Brochier-Armanet C, Gribaldo S: Global phylogenomic analysis disentangles the complex evolutionary history of DNA replication in Archaea. *Genome Biol Evol* 2014, **6**(1):192–212.
42. Forterre P, Gribaldo S, Gabelle D, Serre M-C: Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 2007, **89**(4):427–446.
43. Brochier-Armanet C, Forterre P, Gribaldo S: Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Curr Opin Microbiol* 2011, **14**(3):274–281.
44. White MF, Bell SD: Holding it together: chromatin in the Archaea. *Trends Genet* 2002, **18**(12):621–626.
45. Makarova KS, Sorokin AV, Novichkov PS, Wolf YI, Koonin EV: Clusters of orthologous genes for 41 archaeal genomes and implications for evolutionary genomics of archaea. *Biol Direct* 2007, **2**:33.
46. Huynen MA, Dandekar T, Bork P: Variation and evolution of the citric-acid cycle: a genomic perspective. *Trends Microbiol* 1999, **7**(7):281–291.
47. Brown AM, Hoopes SL, White RH, Sarrisky CA: Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme. *Biol Direct* 2011, **6**(1):63.
48. Sakai S, Takaki Y, Shimamura S, Sekine M, Tajima T, Kosugi H, Ichikawa N, Tasumi E, Hiraki AT, Shimizu A, Kato Y, Nishiko R, Mori K, Fujita N, Imachi H, Takai K: Genome sequence of a mesophilic hydrogenotrophic methanogen *Methanocella paludicola*, the first cultivated representative of the order Methanocellales. *PLoS One* 2011, **6**(7):e22898.



49. 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**(5785):370–372.
50. Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC, Dixon R: **Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes.** *BMC genomics* 2012, **13**:162.
51. Lai MC, Hong TY, Gunsalus RP: **Glycine betaine transport in the obligate halophilic archaeon *Methanohalophilus portucalensis*.** *J Bacteriol* 2000, **182**(17):5020–5024.
52. Roessler M, Pflüger K, Flach H, Lienard T, Gottschalk G, Müller V: **Identification of a salt-induced primary transporter for glycine betaine in the methanogen *Methanosarcina mazei* Go1.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(5):2133–2139.
53. Fricke WF, Seedorf H, Henne A, Krüger M, Liesegang H, Hedderich R, Gottschalk G, Thauer RK: **The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis.** *J Bacteriol* 2006, **188**(2):642–658.
54. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, Latreille P, Kim K, Wilson RK, Gordon JL: **Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(25):10643–10648.
55. Mittl PR, Schneider-Brachert W: **Sell-like repeat proteins in signal transduction.** *Cell Signal* 2007, **19**(1):20–31.
56. Tallant TC, Paul L, Krzycki JA: **The MtsA subunit of the methylthiol: coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina barkeri* catalyses both half-reactions of corrinoid-dependent dimethylsulfide: coenzyme M methyl transfer.** *J Biol Chem* 2001, **276**(6):4485–4493.
57. Kaster A-K, Goenrich M, Seedorf H, Liesegang H, Wollherr A, Gottschalk G, Thauer RK: **More than 200 genes required for methane formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> and energy conservation are present in *Methanothermobacter marburgensis* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*.** *Archaea* 2011, **2011**:973848.
58. Rouvière PE, Escalante-Semerena JC, Wolfe RS: **Component A2 of the methylcoenzyme M methylreductase system from *Methanobacterium thermoautotrophicum*.** *J Bacteriol* 1985, **162**(1):61–66.
59. Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE: **The natural history of nitrogen fixation.** *Mol Biol Evol* 2004, **21**(3):541–554.
60. Shin DH: **Preliminary structural studies on the MtxX protein from *Methanococcus jannaschii*.** *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun* 2008, **64**(4):300–303.
61. Graham DE, Taylor SM, Wolf RZ, Namboori SC: **Convergent evolution of coenzyme M biosynthesis in the Methanosarcinales: cysteate synthase evolved from an ancestral threonine synthase.** *Biochem J* 2009, **424**(3):467–478.
62. Graham DE, Graupner M, Xu H, White RH: **Identification of coenzyme M biosynthetic 2-phosphosulfolactate phosphatase: a member of a new class of Mg(2+)-dependent acid phosphatases.** *Eur J Biochem* 2001, **268**(19):5176–5188.
63. Graham DE, Xu H, White RH: **Identification of coenzyme M biosynthetic phosphosulfolactate synthase: a new family of sulfonate-biosynthesizing enzymes.** *J Biol Chem* 2002, **277**(16):13421–13429.
64. Graupner M, Xu H, White RH: **Identification of an archaeal 2-hydroxy acid dehydrogenase catalyzing reactions involved in coenzyme biosynthesis in methanoarchaea.** *J Bacteriol* 2000, **182**(13):3688–3692.
65. Schlegel K, Müller V: **Evolution of Na and H bioenergetics in methanogenic archaea.** *Biochem Soc T* 2013, **41**(1):421–426.
66. Anderson I, Ulrich LE, Lupa B, Susanti D, Porat I, Hooper SD, Lykidis A, Sieprawska-Lupa M, Dharmarajan L, Goltzman E: **Genomic characterization of methanomicrobials reveals three classes of methanogens.** *PLoS One* 2009, **4**(6):e5797.
67. Kaster A-K, Moll J, Paredy K, Thauer RK: **Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(7):2981–2986.
68. Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R: **Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation.** *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**(8):579–591.
69. Moparthi VK, Hägerhäll C: **The evolution of respiratory chain complex I from a smaller last common ancestor consisting of 11 protein subunits.** *J Mol Evol* 2011, **72**(5–6):484–497.
70. Bäumer S, Ide T, Jacobi C, Johann A, Gottschalk G, Deppenmeier U: **The F420H<sub>2</sub> dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases.** *J Biol Chem* 2000, **275**(24):17968–17973.
71. Welte C, Deppenmeier U: **Membrane-bound electron transport in *Methanosarcina thermophila*.** *J Bacteriol* 2011, **193**(11):2868–2870.
72. Tran QH, Bongaerts J, Vlad D, Udden G: **Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase i of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetic implications.** *Eur J Biochem* 1997, **244**(1):155–160.
73. Welte C, Krätzer C, Deppenmeier U: **Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina mazei*.** *FEBS J* 2010, **277**(16):3396–3403.
74. Meurer J, Kuettnner HC, Zhang JK, Hedderich R, Metcalf VWW: **Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(8):5632–5637.
75. Bäumer S, Lentjes S, Gottschalk G, Deppenmeier U: **Identification and analysis of proton-translocating pyrophosphatases in the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei*.** *Archaea* 2002, **1**(1):1.
76. Baykov AA, Malinen AM, Luoto HH, Lahti R: **Pyrophosphate-fueled Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport in prokaryotes.** *Microbiol Mol Biol R* 2013, **77**(2):267–276.
77. Prat L, Heinemann IU, Aerni HR, Rinehart J, O'Donoghue P, Soll D: **Carbon source-dependent expansion of the genetic code in bacteria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(51):21070–21075.
78. Gaston MA, Jiang R, Krzycki JA: **Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine.** *Curr Opin Microbiol* 2011, **14**(3):342–349.
79. Heinemann IU, O'Donoghue P, Madinger C, Benner J, Randau L, Noren CJ, Soll D: **The appearance of pyrrolysine in tRNAHis guanylyltransferase by neutral evolution.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(50):21103–21108.
80. Krzycki JA: **Translation of UAG as Pyrrolysine.** In *Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression*. New York: Springer; 2010:53–77.
81. Longstaff DG, Blight SK, Zhang L, Green-Church KB, Krzycki JA: **In vivo contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine.** *Mol Microbiol* 2007, **63**(1):229–241.
82. Veit K, Ehlers C, Schmitz RA: **Effects of nitrogen and carbon sources on transcription of soluble methyltransferases in *Methanosarcina mazei* strain Gö1.** *J Bacteriol* 2005, **187**(17):6147–6154.
83. Bailey S, Rycroft A, Elliott J: **Production of amines in equine cecal contents in an *in vitro* model of carbohydrate overload.** *J Anim Sci* 2002, **80**(10):2656–2662.
84. Smith E, Macfarlane G: **Studies on amine production in the human colon: enumeration of amine forming bacteria and physiological effects of carbohydrate and pH.** *Anaerobe* 1996, **2**(5):285–297.
85. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L: **Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis.** *Nat Med* 2013, **19**(5):576–585.
86. Mitchell AD, Chappell A, Knox K: **Metabolism of betaine in the ruminant.** *J Anim Sci* 1979, **49**(3):764–774.
87. Neill AR, Grime DW, Dawson R: **Conversion of choline methyl groups through trimethylamine into methane in the rumen.** *Biochem J* 1978, **170**:529–535.
88. Benstead J, King G, Williams H: **Methanol promotes atmospheric methane oxidation by methanotrophic cultures and soils.** *Appl Environ Microb* 1998, **64**(3):1091–1098.
89. Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM: **The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*.** *Science* 1995, **270**(5235):397–404.
90. Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H: **Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp.** *APS Nat* 2000, **407**(6800):81–86.
91. Waters E, Hohn MJ, Ahel I, Graham DE, Adams MD, Barnstead M, Beeson KY, Bibbs L, Bolanos R, Keller M: **The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(22):12984–12988.
92. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen G, Olson R, Osterman A, Overbeek R, McNeil L, Paarmann D, Paccian T, Parrello B, Pusch G, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O: **The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.** *BMC Genomics* 2008, **9**:75.
93. Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL: **Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer.** *Bioinformatics* 2007, **23**(6):673–679.
94. Bairoch A, Boeckmann B: **The SWISS-PROT protein sequence data bank.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**(Suppl):2247.

95. Gardner PP, Daub J, Tate JG, Nawrocki EP, Kolbe DL, Lindgreen S, Wilkinson AC, Finn RD, Griffiths-Jones S, Eddy SR: **Rfam: updates to the RNA families database.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(suppl 1):D136–D140.
96. Schattner P, Brooks AN, Lowe TM: **The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(Web Server issue):W686–W689.
97. Taquist H, Cui Y, Ardell DH: **TFAM 1.0: an online tRNA function classifier.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue):W350–W353.
98. Laslett D, Canback B: **ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(1):11–16.
99. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(17):3389–3402.
100. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C: **CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue):W52–W57.
101. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C: **CRISPRcompar: a website to compare clustered regularly interspaced short palindromic repeats.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(Web Server issue):W145–W148.
102. Lange SJ, Alkhnbashi OS, Rose D, Will S, Backofen R: **CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(17):8034–8044.
103. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS: **PHAST: a fast phage search tool.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**(Web Server issue):W347–W352.
104. Grant JR, Stothard P: **The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(suppl 2):W181–W184.
105. Oliveros J: **VENNY: an interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.** 2007, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
106. Magrane M: **UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data.** *Database* 2011, **2011**:bar009.
107. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M: **KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(suppl 2):W182–W185.
108. Li H, Benedito V, Udvardi M, Zhao P: **TransportTP: a two-phase classification approach for membrane transporter prediction and characterization.** *BMC Bioinform* 2009, **10**(1):418.
109. Ren Q, Chen K, Paulsen IT: **TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(suppl 1):D274–D279.
110. Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A: **High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(10):3420–3435.
111. Johnson LS, Eddy S, Portugaly E: **Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure.** *BMC Bioinform* 2010, **11**(1):431.
112. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(5):1792–1797.
113. Philippe H: **MUST, a computer package of management utilities for sequences and trees.** *Nucleic Acids Res* 1993, **21**(22):5264–5272.
114. Crisuolo A, Gribaldo S: **BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments.** *BMC Evol Biol* 2010, **10**(1):210.
115. Stamatakis A: **RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models.** *Bioinformatics* 2006, **22**(21):2688–2690.
116. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP: **MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.** *Syst Biol* 2012, **61**(3):539–542.
117. Hofacker IL: **Vienna RNA secondary structure server.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(13):3429–3431.

doi:10.1186/1471-2164-15-679

**Cite this article as:** Borrel et al.: Comparative genomics highlights the unique biology of *Methanomassiliococcales*, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 2014 **15**:679.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## ANNEXE 6

## Archaeobiotics

### Proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease

Jean-François Brugère<sup>1\*</sup>, Guillaume Borrel<sup>1,2</sup>, Nadia Gaci<sup>1</sup>, William Tottey<sup>1</sup>, Paul W O'Toole<sup>2</sup>, and Corinne Malpuech-Brugère<sup>3</sup>

<sup>1</sup>EA 4678 CIDAM; Clermont Université; Université d'Auvergne; Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>Department of Microbiology and Alimentary Pharmabiotic Centre; University College Cork; Cork, Ireland; <sup>3</sup>Clermont Université; Université d'Auvergne – INRA; UMR 1019 UNH; Clermont-Ferrand, France

**T**rimethylamine (TMA) is produced by gut bacteria from dietary ingredients. In individuals with a hereditary defect in flavin-containing monooxygenase 3, bacterial TMA production is believed to contribute to the symptoms of trimethylaminuria (TMAU; fish-odor syndrome). Intestinal microbiota TMA metabolism may also modulate atherosclerosis risk by affecting trimethylamine oxide (TMAO) production levels. We propose that reducing TMA formation in the gut by converting it to an inert molecule could be used to prevent or limit these human diseases, while avoiding the major drawbacks of other clinical interventions. Reducing TMA levels by microbiological interventions could also be helpful in some vaginoses. Particular members of a recently discovered group of methanogens, that are variably present in the human gut, are unusual in being apparently restricted to utilizing only methyl compounds including TMA as substrates. We confirmed experimentally that one of these strains tested, *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10, is able to deplete TMA, by reducing it with H<sub>2</sub> for methanogenesis. We therefore suggest that members of this archaeal lineage could be used as treatments for metabolic disorders.

#### The Gut Origin of TMA in Human

The tertiary amine trimethylamine (TMA) is a volatile compound which has a characteristic fishy odor, and is formed by bacterial reduction of trimethylamine

oxide (TMAO). This alkylamine is detected as unpleasant by the human olfactory system at even very low levels, thereby preventing humans from ingesting rotting fish. Ironically, this molecule is also endogenous in humans, being synthesized in the gut and sometimes in the vagina by the endogenous microbiota. The microbiome of the gastrointestinal tract is better characterized than that of other body sites, so only this niche will be discussed here, although relevant metabolic processes in the vagina are probably similar.

In the gut, TMA is formed by microbial conversion of dietary ingredients<sup>1</sup> and is further absorbed before being oxidized into TMAO in the liver (see Fig. 1). Such TMA precursors include TMAO (in abundance in seafood), and choline (eggs, soybean, cauliflower), which is likely the most important TMA source. Recent data also show that L-carnitine<sup>2</sup> found in red meat (and in some energy drinks and dietary supplements) is converted into TMA. The metabolic pathways leading to TMA are thought to be exclusively microbial in humans: the mechanism of conversion of choline by an anaerobic mammalian gut *Desulfovibrio* has recently been identified and relies on the *cut* (choline utilization) operon, in which *cutC* encodes a glycyl radical enzyme with a choline trimethylamine-lyase activity.<sup>3</sup> Choline is an important factor for human health, with an adequate intake for adults of 425 mg and 550 mg per day being recommended for women and men respectively in the US.<sup>4</sup> Choline depletion resulting from a choline-deficient diet

**Keywords:** trimethylaminuria (TMAU), cardiovascular disease (CVD), TMA, TMAO, thermoplasmata-related methanogens, archaeobiotics, choline, L-carnitine, vaginosis, *Methanomassiliicoccus* spp

\*Corresponding author: Jean-François Brugère; Email: jf.brugere@udamail.fr.

Submitted: 04/15/2013; Revised: 10/01/2013;

Accepted: 10/08/2013;

Published Online: 10/31/2013

<http://dx.doi.org/10.4161/gmic.26749>

causes clinical consequences such as non-alcoholic fatty-liver disease (NAFLD) and muscle damage.<sup>5,6</sup> Dietary lecithin (phosphatidylcholine, PC) also feeds into plasma TMAO levels by gut conversion into choline (and then to TMA), as shown by mouse studies.<sup>7</sup> Thus, limiting intake of choline or its precursors to reduce TMA production is not feasible. However such a reduction of TMA levels is highly desirable because TMA is related to at least two disorders.

### TMA is Implicated in Disease

Trimethylaminuria (TMAU) is caused by a metabolic anomaly whereby sufferers emit a pervasive fishy odor caused by the excretion of TMA in their breath, sweat and urine. As TMAU is still under-recognized and often goes undiagnosed, those affected often suffer from psychological problems and social stress.<sup>8</sup> Although no large prevalence studies are currently available, people with compromised ability to N-oxidize trimethylamine into the odorless TMAO are probably common.<sup>9</sup> TMAU can be classified into a primary genetic form and an acquired (or secondary) form. The genetic form is now well characterized with approximately 15% of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *FMO3* gene (encoding a flavin-containing monooxygenase) associated with either lack of or diminished enzymatic oxidation in the liver of TMA into TMAO.<sup>9</sup> In the healthy individual, more than 95% of TMA is oxidized into TMAO in this way, while genetic defects in *FMO3* result in accumulation of TMA in blood, and then in breath, sweat and urine (Fig. 1, pathway A). Acquired TMAU, sometimes transient, includes conditions featuring elevated urinary levels of TMA due to dietary and hormonal factors in combination with enzymatic activity and metabolism in the gut. Important examples include transient menstrual TMAU, overload of dietary precursors of TMA (see above), and impaired hepatic function.<sup>10</sup> Treatment relies mainly on an empirical dietary approach, or several complementary therapeutic adjuncts, including soaps which limit the volatility of TMA from the skin, together with brief courses of antimicrobials (neomycin, metronidazole)

which are not always effective.<sup>10</sup> This last approach limits the bacterial load, and in extenso, gut conversion of TMAO, choline and derivatives into TMA.

Gut microbiota metabolism of phosphatidylcholine (PC) and L-carnitine can promote atherosclerosis.<sup>2,7,11</sup> This is because their plasma metabolites (choline, betaine and TMAO) are risk factors for cardiovascular disease (CVD) in humans. Experimentally, dietary choline supplementation has been shown in a seminal paper to significantly enhance aortic lesion area in mice genetically prone to atherosclerosis, as did supplementation of the diet with TMAO.<sup>7</sup> Furthermore, gut microbiota depletion by antibiotics led to inhibition of the dietary choline-induced cardiovascular effects. Mice with depleted gut microbiota did not experience increased TMAO plasma levels<sup>7</sup> (Fig. 1, pathway B) nor did humans.<sup>11</sup> Human gut microbiota is also required to form TMAO from L-carnitine, and plasma TMAO is likely the primary driver of cardiovascular risks rather than L-carnitine itself.<sup>2</sup>

A fishy odor frequently occurs in bacterial vaginosis.<sup>12</sup> It is important to stress that, in this instance, TMA does not originate from urine, but rather from in situ production of TMA by the vaginal microbiota through a process similar to that which occurs in the gut.

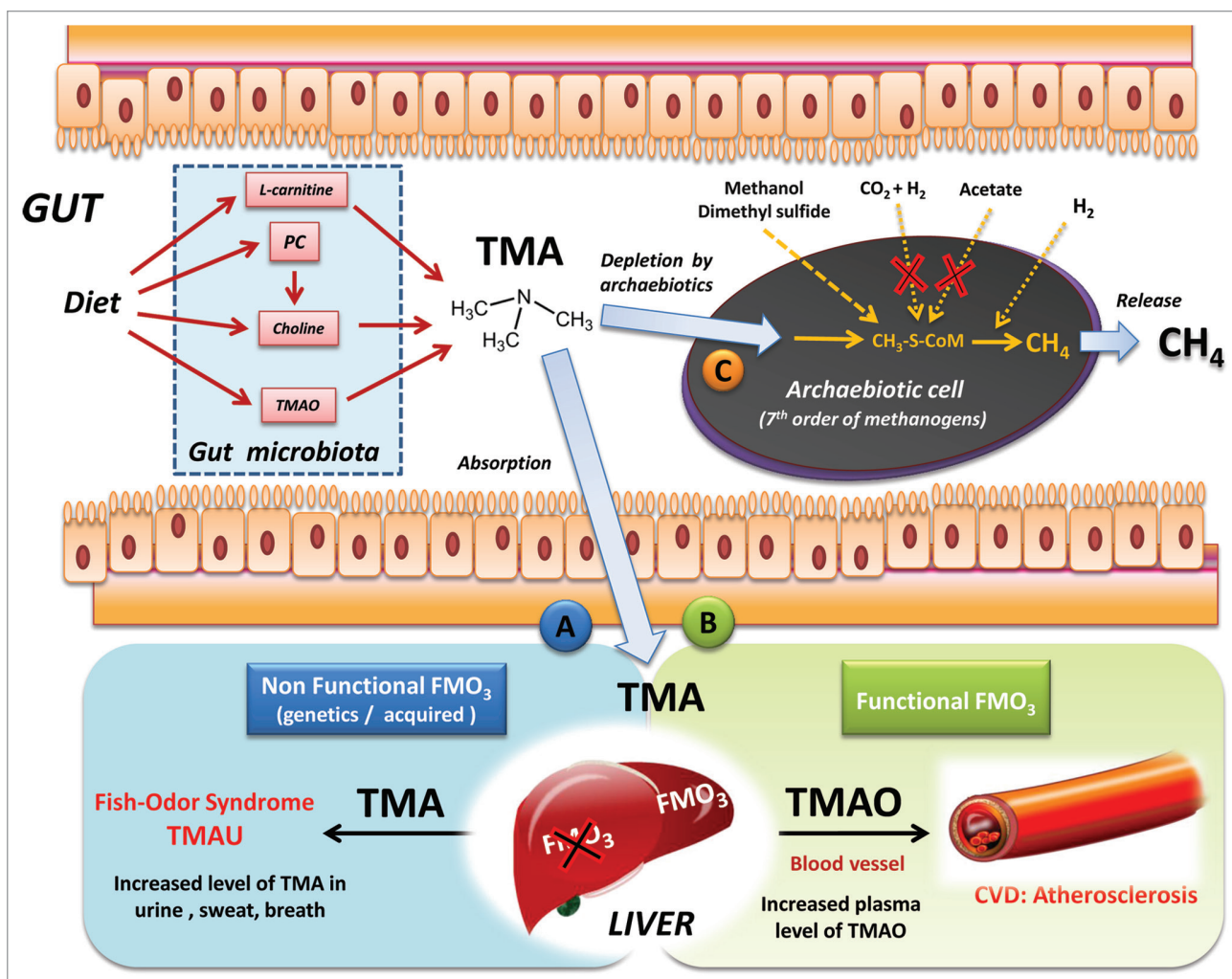
### Hypothesis: That TMA Could Be Depleted as it is Synthesized

We were prompted by recent microbiology studies to ask if TMA could be depleted in vivo by bioconversion into a molecule with no undesirable properties. The underlying biochemistry was described more than 35 y ago in the rumen of cows, where choline is metabolized via TMA and onwards into methane.<sup>13</sup> Rumen microbes like the methanogenic archaea *Methanosarcina barkeri* metabolize methyl compounds, including TMA, to methane for growth.<sup>14</sup> A distinct archaeal group (the Rumen Cluster C; RCC) was subsequently identified as being putatively able to convert methyl compounds including TMA and methylamines into methane. Half the human subjects examined to date also produce methane, usually by harboring the methanogen *Methanobrevibacter*

*smithii*, or less frequently, *Methanosphaera stadtmanae* (reviewed in ref. 15). It is also noteworthy that *M. smithii* has been identified in vaginal samples.<sup>15</sup> We thus asked if methylophilic methanogens would be able to survive and deplete TMA in the human gut (or in the vagina), a notion that would be greatly supported if methanogens that naturally occur in the human gut could metabolize TMA.

The trigger for proposing this hypothesis now is that, until recently, only the methanogens *M. smithii* and *M. stadtmanae* were recognized as residents of the human gut. They belong to the order Methanobacteriales, one of the six known orders of methanogens. However in 2008, the existence of a seventh order inhabiting the human gut (hereafter referred to as the Mx-lineage) was proposed,<sup>16</sup> particularly common in older subjects,<sup>17</sup> and *Methanomassiliicoccus luminyensis*, the first and unique isolated member of this order metabolizes methanol with hydrogen for methane production.<sup>18</sup> Genomic sequences of three of these unusual methanogens are currently available, that of *M. luminyensis*,<sup>19</sup> and genome sequences that we recently determined for “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*”<sup>20</sup> and “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*”<sup>21</sup> grown in an enrichment culture from human stool. “*Ca. Methanomethylophilus alvus*” belongs to the RCC cluster that was recently highlighted for its putative involvement in TMA consumption in the rumen,<sup>23</sup> while *M. luminyensis* and “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” are phylogenetically closely related to the RCC cluster.<sup>24</sup> These three genomes have all of the genes necessary for reduction of methanol using hydrogen, but also for the reduction of tri- di- and monomethylamine with hydrogen (Fig. 2), while the two other possible pathways for methanogenesis (CO<sub>2</sub> reduction with H<sub>2</sub> and acetoclastic methanogenesis) are genetically incomplete. Whereas the capacity of these strains to reduce methanol with hydrogen was previously demonstrated, their ability to grow on TMA with hydrogen has not been investigated. We therefore tested this hypothesis on the sole strain of this group available in pure culture, *M. luminyensis* B10, and thus confirmed for the first time





**Figure 1.** Origin and fate of TMA in the human gut, and the Archaeobiotics concept. Gut microbiota synthesis of TMA is realized from TMAO, choline, PC and L-carnitine. The TMA is then absorbed and goes to the liver, routes (A) or (B). In the case of route (A), a partial or total defect in FMO3-oxidation into TMAO leads to increased level and diffusion of TMA in breath, urine and sweat. When FMO3 liver oxidation is functional (B), the increase of TMAO in blood is associated with atherosclerosis.<sup>2,711</sup> Therefore, converting TMA directly in the gut using Archaeobiotics belonging to the seventh methanogenic order, naturally-occurring in the gut, route (C) should be envisaged. Interestingly, these archaea are only able to perform methanogenesis using methyl compounds (see Fig. 2), because the two other pathways are absent (CO<sub>2</sub> reduction with H<sub>2</sub> and aceticlastic pathway): this would increase the efficiency of TMA conversion.

that this strain is able to grow on TMA with hydrogen (Fig. 3). *M. luminyensis* B10 was also able to grow on the by-products of TMA catabolism, dimethylamine and then monomethylamine, both being used with hydrogen for methanogenesis (data not shown). These results are in agreement with the annotated genetic complement of this strain and strongly suggest the same metabolic capacity in “*Ca. M. alvus*” and “*Ca. M. intestinalis*” because they harbor orthologs of all the relevant *M. luminyensis* genes involved in these pathways. Collectively this suggests to us that natural methanogenic inhabitants of

the human gut will be able to metabolize TMA, and could deplete this metabolite as it is formed by bacterial elements of the microbiota.

### Proposal: The Archaeobiotics Concept

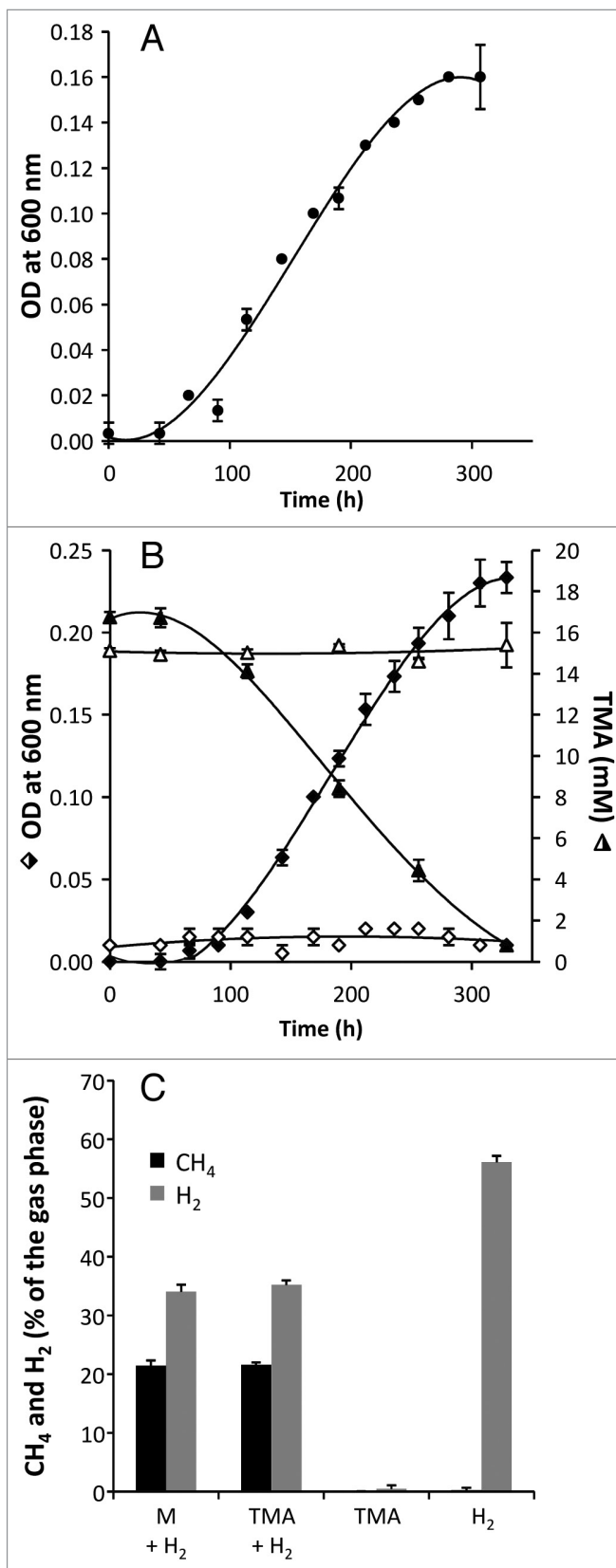
Drawing together these ecological and biochemical strands, we now propose the Archaeobiotics Concept viz. the intestinal application of specific archaeal strains for the treatment of human diseases including cardiovascular disease and TMAU (Fig. 1). The fishy-odor aspect of some

vaginal conditions could be addressed using pessary delivery. Focusing on CVD and TMAU, there are several advantages. Methane, the TMA-metabolite produced by these archaea is usually considered biologically inert in humans. The pathway and relevant coding sequences for catalyzing TMA conversion to methane by “*Ca. Methanomethylophilus alvus*” and “*Ca. Methanomassiliicoccus intestinalis*” based on annotation of the genomes we recently sequenced is shown in Figure 2; a similar pathway is inferred from the *M. luminyensis* genome. As for other methanogenic archaea, it includes a



**Figure 3.** Growth of *Methanomassiliicoccus luminyensis* strain B10 on trimethylamine (TMA) and hydrogen ( $H_2$ ). (A) The growth of *M. luminyensis* B10 on methanol (M, 50 mM) and  $H_2$  (previously described by Dridi et al.<sup>18</sup>) was used as a positive control for growth and maximal cell density. (B) We now show that *M. luminyensis* B10 also grows on TMA (15 mM) in the presence of  $H_2$  (filled diamonds) but not on TMA in the absence of  $H_2$  (open diamonds). Accordingly, TMA is depleted in presence of  $H_2$  (filled triangles) and not in the absence of  $H_2$  (open triangles). The composition of the gas phase was measured at the end of the experiment (C) and revealed the production of methane ( $CH_4$ ) and the depletion of  $H_2$  in presence of either M or TMA. No  $CH_4$  was produced in the absence of  $H_2$  and  $CH_4$  was not produced nor  $H_2$  depleted in the absence of the methylated compound substrate (M or TMA). *M. luminyensis* B10 was obtained from DSMZ (DSM No. 25720) and cultivated in DSMZ medium 119, with rumen fluid replacing the sludge fluid. When  $H_2$  was present, initial atmosphere composition was:  $N_2/H_2/CO_2$  (55:35:10), and in absence of  $H_2$ :  $N_2/CO_2$  (75:25). Growth in each condition was performed in triplicate. Trimethylamine concentration was measured as described by Krätzer et al.<sup>30</sup> OD, Optical Density.

native Africans than in African Americans, likely indicating dietary influences on the microbiota.<sup>27,28</sup> Diet could conceivably be controlled or modulated to promote methanogen levels in recipients of archaeobiotics. We cannot currently explain why the Mx-lineage of Archaea appears from the literature to be more abundant in older subjects, so we are determining fecal archaeal levels in the ELDERMET cohort subjects, that are well phenotyped for diet, health and bacterial microbiota.<sup>29</sup> A possible factor is the trophic interaction with other microbiota elements, and that a more favorable ecology emerges in some older subjects. This raises the provocative issue of what the effects of introducing a methanogenic archaea might be on the microbiota of the recipient. The Mx-methanogens are very likely not acetoclastic but would compete with other hydrogenotrophic archaea and bacteria, so the downstream effects on microbiome, metabolome and host physiology would need detailed exploration in vitro, in animal models, and ultimately in humans. Although the application of archaeobiotics as proposed here faces significant challenges, we contend that the anticipated benefit of their use to mitigate the life-time risk of CVD and to treat TMAU warrants a concerted research effort in this area by the scientific community.





## Disclosure of Potential Conflict of Interests

No potential conflict of interest was disclosed.

## Acknowledgments

This work was supported by two PhD. Scholarship supports, one from the French “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” to NG,

the other of the European Union (UE) and the Auvergne Council to WT (FEDER). PWOT was supported by Science Foundation Ireland through a Principal Investigator award and by an FHRI award to the ELDERMET project by the Dept. Agriculture, Fisheries and Marine of the Government of Ireland. We thank F Shanahan and EMM Quigley

for helpful critique of the manuscript. In Memoriam to Albert Jacquard (b. 12-23-1925, † 09-11-2013), geneticist and great humanist.

## References

- Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. Dietary precursors of trimethylamine in man: a pilot study. *Food Chem Toxicol* 1999; 37:515-20; PMID:10456680; [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00028-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00028-9)
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19:576-85; PMID:23563705; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3145>
- Craciun S, Balskus EP. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycol radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:21307-12; PMID:23151509; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1215689109>
- Institute of Medicine (U.S.). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes., Institute of Medicine (U.S.). Panel on Folate Other B Vitamins and Choline., Institute of Medicine (U.S.). Subcommittee on Upper Reference Levels of Nutrients. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B<sub>6</sub>, folate, vitamin B<sub>12</sub>, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, D.C.: National Academy Press, 1998.
- Buchman AL, Dubin MD, Moukartzel AA, Jenden DJ, Roch M, Rice KM, Gornbein J, Ament ME. Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology* 1995; 22:1399-403; PMID:7590654
- Spencer MD, Hamp TJ, Reid RW, Fischer LM, Zeisel SH, Fodor AA. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology* 2011; 140:976-86; PMID:21129376; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.049>
- Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 2011; 472:57-63; PMID:21475195; <http://dx.doi.org/10.1038/nature09922>
- Ayesh R, Mitchell SC, Zhang A, Smith RL. The fish odour syndrome: biochemical, familial, and clinical aspects. *BMJ* 1993; 307:655-7; PMID:8401051; <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.307.6905.655>
- D’Angelo R, Esposito T, Calabrò M, Rinaldi C, Robledo R, Varriale B, Sidoti A. FMO3 allelic variants in Sicilian and Sardinian populations: trimethylaminuria and absence of fish-like body odor. *Gene* 2013; 515:410-5; PMID:23266626; <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.047>
- Mackay RJ, McEntyre CJ, Henderson C, Lever M, George PM. Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. *Clin Biochem Rev* 2011; 32:33-43; PMID:21451776
- Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; 368:1575-84; PMID:23614584; <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1109400>
- Wolrath H, Ståhlbom B, Hallén A, Forsum U. Trimethylamine and trimethylamine oxide levels in normal women and women with bacterial vaginosis reflect a local metabolism in vaginal secretion as compared to urine. *APMIS* 2005; 113:513-6; PMID:16086821; [http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm\\_175.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_175.x)
- Neill AR, Grime DW, Dawson RM. Conversion of choline methyl groups through trimethylamine into methane in the rumen. *Biochem J* 1978; 170:529-35; PMID:646798
- Hippe H, Caspari D, Fiebig K, Gottschalk G. Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:494-8; PMID:284366; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.1.494>
- Conway de Macario E, Macario AJ. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* 2009; 299:99-108; PMID:18757236; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.06.011>
- Mihajlovski A, Alric M, Brugère JF. A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res Microbiol* 2008; 159:516-21; PMID:18644435; <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2008.06.007>
- Mihajlovski A, Doré J, Levenez F, Alric M, Brugère J-F. Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ Microbiol Rep* 2010; 2:272-80; PMID:23766078; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00116.x>
- Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62:1902-7; PMID:22859731; <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0>
- 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; PMID:22887657; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00956-12>
- Borrel G, Harris HM, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, Peyret P, Gribaldo S, O’Toole PW, Brugère JF. 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; PMID:23209209; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01867-12>
- Borrel G, Harris HM, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, et al. Genome Sequence of “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Issoire-Mx1, a Third Thermoplasmatales-Related Methanogenic Archaeon from Human Feces. *Genome Announc* 2013; 1.
- Krzycki JA. The direct genetic encoding of pyrrolysine. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:706-12; PMID:16256420; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.009>
- Poulsen M, Schwab C, Jensen BB, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fragner L, Schleper C, et al. Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun* 2013; 4:1428; PMID:23385573; <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2432>
- Borrel G, O’Toole PW, Harris HM, Peyret P, Brugère JF, Gribaldo S. Phylogenomic data support a seventh order of methylophilic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol Evol* 2013; 5:1769-80; PMID:23985970; <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evt128>
- Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. The antimicrobial resistance pattern of cultured human methanogens reflects the unique phylogenetic position of archaea. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2038-44; PMID:21680581; <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr251>
- Samuel BS, Gordon JL. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:10011-6; PMID:16782812; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602187103>
- O’Keefe SJ, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR, Manafe M, Arch J, Adada H, van der Merwe T. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr* 2007; 137(Suppl):175S-82S; PMID:17182822
- Nava GM, Carbonero F, Ou J, Benefiel AC, O’Keefe SJ, Gaskins HR. Hydrogenotrophic microbiota distinguish native Africans from African and European Americans. *Environ Microbiol Rep* 2012; 4:307-15; PMID:23760794; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00334.x>
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O’Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O’Sullivan O, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; 488:178-84; PMID:22797518; <http://dx.doi.org/10.1038/nature11319>
- Krätzer C, Carini P, Hovey R, Deppenmeier U. Transcriptional profiling of methyltransferase genes during growth of *Methanosarcina mazei* on trimethylamine. *J Bacteriol* 2009; 191:5108-15; PMID:19525341; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00420-09>

