



HAL
open science

Réévaluation de la biodiversité du microbiote méthanogène intestinal humain et influence de l'âge sur sa constitution

Agnès Mihajlovski

► **To cite this version:**

Agnès Mihajlovski. Réévaluation de la biodiversité du microbiote méthanogène intestinal humain et influence de l'âge sur sa constitution. Microbiologie et Parasitologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009. Français. NNT : 2009CLF1PP07 . tel-00726349

HAL Id: tel-00726349

<https://theses.hal.science/tel-00726349>

Submitted on 29 Aug 2012

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

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

Année 2009

N° d'ordre

*ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Écologie Microbienne Humaine

Soutenue le 27 Novembre 2009

Agnès Mihajlovski

**Réévaluation de la biodiversité du microbiote méthanogène intestinal humain
et influence de l'âge sur sa constitution**

JURY

Purificación LOPEZ-GARCIA	Directrice de Recherche, CNRS Paris	Rapportrice
Philippe POCHART	Professeur, CNAM Paris	Rapporteur
Annick BERNALIER-DONADILLE	Directrice de Recherche, INRA Clermont-Theix	Examinatrice
Gérard FONTY	Directeur de Recherche, CNRS Clermont 2	Examineur
Simonetta GRIBALDO	Chargée de Recherche, Institut Pasteur Paris	Examinatrice
Jean-François BRUGERE	Maitre de Conférences, Université Clermont 1	Dr de thèse

Equipe de Recherche Technologique
"Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament" (ERT CIDAM)
CRNH Auvergne – IFR Santé – Université d'Auvergne

Année 2009

N° d'ordre

*ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Écologie Microbienne Humaine

Soutenue le 27 Novembre 2009

Agnès Mihajlovski

**Réévaluation de la biodiversité du microbiote méthanogène intestinal humain
et influence de l'âge sur sa constitution**

JURY

Purificación LOPEZ-GARCIA	Directrice de Recherche, CNRS Paris	Rapportrice
Philippe POCHART	Professeur, CNAM Paris	Rapporteur
Annick BERNALIER-DONADILLE	Directrice de Recherche, INRA Clermont-Theix	Examinatrice
Gérard FONTY	Directeur de Recherche, CNRS Clermont 2	Examineur
Simonetta GRIBALDO	Chargée de Recherche, Institut Pasteur Paris	Examinatrice
Jean-François BRUGERE	Maitre de Conférences, Université Clermont 1	Dr de thèse

Equipe de Recherche Technologique
"Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament" (ERT CIDAM)
CRNH Auvergne – IFR Santé – Université d'Auvergne

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Purificación Lopez-Garcia et Philippe Pochard, pour avoir accepté la tâche laborieuse d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je remercie également Annick Bernalier-Donadille, Gérard Fonty et Simonetta Gribaldo d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, Jean-François Brugère et ceci pour de nombreuses raisons. Tout d'abord pour avoir encadré mes travaux de thèse et m'avoir aidé à acquérir un raisonnement scientifique durant ces trois années. Mais également pour les nombreux échanges de points de vue, échanges qui m'ont beaucoup apporté. Le chemin d'une thèse est tortueux, semé d'embuches et saupoudré de quelques coups de calgon. Mais en cette fin de thèse, je ne retiens que les points positifs de notre collaboration.

Je tiens également à remercier Monique Alric, Erick Beyssac et Jean-Michel Cardot, nos trois co-directeurs. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'ERT-CIDAM et de m'avoir promulgué des conseils scientifiques tout au long de ces travaux de thèse.

Je remercie également tous les membres du LMGE pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et aidé dans la réalisation de mon projet de thèse. Je tiens spécialement à remercier, Pierre Peyret et Gérard Fonty pour leur accueil chaleureux et pour m'avoir permis d'utiliser leurs équipements à de nombreuses reprises. Un spécial merci à Sébastien Terrat pour n'avoir jamais hésité à passer du temps avec moi dans le but de faire avancer mon projet, pour son grand sens de l'humour, son soutien et sa sympathie.

Et un grand... énorme.... gigantesque MERCI à tous les habitants du 5^{ème} !!! Ce ne sont pas des fossés mais d'énormes gouffres qui séparent les personnalités des membres de cette petite communauté ! Et pourtant c'est un vrai bonheur au quotidien !

Pour aller un peu plus dans le détail de ces remerciements, je commencerais par Pascale. Je ne sais même pas par quel bout commencer. Est-ce que je dois commencer par te remercier pour toute les conversations qui m'ont permis de ne pas péter les plombs trop trop souvent ?? Ou alors, pour toutes les attentions que tu as eu envers moi : les cadeaux d'anniversaires reflétant toute l'attention que tu portes à autrui, les gâteaux « spécial Agnès ! » et les cartes postales des quatre coins du monde ??? Ou dois-je te remercier pour la grande disponibilité dont tu as fait preuve durant ces derniers mois pour dénicher les fautes d'orthographe de mon manuscrit ??? Non franchement je ne sais pas par quoi commencer ! Donc merci pour tout !

Un spécial merci à toi Sylvain ! En écrivant cette phrase je rigole toute seule ! Pour un petit être aussi organisé et maniaque que toi il a dû être très difficile de voir débarquer la bordélique Agnès ! Donc merci de ne jamais m'avoir tapé ☺ ! Et promis je vais laver mes tubes d'ici peu de temps ! Merci aussi pour tes nombreux conseils scientifiques, ta disponibilité, ta bonne humeur et ta gentillesse.

Monsieur Jarrige... Monsieur Jarrige... Notre sex-symbol à nous ! Ça a été un très grand bonheur pour moi de partager de ces quelques années avec vous. Votre sourire perpétuel et votre sens de l'humour décalé font plaisir à voir et donnent du baume au cœur. Ce n'est pas étonnant de voir autant de jeunes filles se bousculer dans votre bureau à longueur de journée !

Un grand merci également à Aymeric et Guillaume, mes deux compagnons de cloppes. Merci pour toutes les cloppes offertes... tous les cafés aussi d'ailleurs... Merci pour votre folie et vos divers pétages de plombs et craquages ! Surtout ne changeaient rien !!

Et bien sûr un grand merci à toutes les autres personnes faisant par cette communauté ! Erick, merci pour l'énergie et la bonne humeur que tu insuffles à l'heure du déjeuner ! Hervé, merci de ramener un peu de normalité dans ce monde de fou ! Lucie et l'art de manger des fruits ! Grâce à toi j'ai retenu quelques astuces qui me permettront de passer pour une maniaque ☺ Merci !! Merci au deux Sébastien, avec vous j'ai compris qu'il y avait plus fou que moi ! Merci ! Et merci également à tous les membres de Soluscience.

Ghislain et Marie. Vous avez fini avant moi. Mais j'ai passé et je continue à passer de bons moments avec vous. Ghislain, ça a toujours été un plaisir de bosser en ta compagnie ! Ton humour est comment dire... détonnant ! Non... franchement on a bien rigolé et même si maintenant trois étages nous séparent... j'espère qu'on continuera sur cette lancée ! Et toi mon

ti bout de choux, ma tite Marie... j'ai adoré les moments passés en ta compagnie durant ces quatre dernière années (Quatre ans ! Punaise !). Du voisinage de bureau, aux pauses cloppes, aux apéros-dinatoires version pizza cramée et fraise tagada jusqu'aux soirées toutouyoutou : rien à jeter !!! On a bien rigolé et je suis sûre que ce n'est pas prêt de s'arrêter ! et en passant... un grand merci à Yann aussi !

Merci à mes meilleurs amis : Emilie, Sandrine, Caro et Marco. Vous faites partie des être les plus importants de ma vie. Merci de votre soutien tout au long de cette thèse. Vos conseils m'ont permis d'avancer dans ma vie personnelle et professionnelle (ouais ouais... tout est relatif !). Sans vous je n'en serais certainement pas là à l'heure actuelle. J'espère sincèrement pouvoir passer plus de temps avec chacun de vous un de ces quatre.

Et enfin, un très sincère merci à ma famille et surtout à mes parents. Vous avez toujours été là pour moi dès que j'en avais besoin et votre soutien tout au long de cette thèse m'a vraiment aidé à avancer. Merci à mon frère et à sa future femme pour avoir procréé durant ces années de thèse... et deux fois en plus ! Les naissances de mes deux petits neveux ont été les plus beaux petits miracles de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	i
ABSTRACT	i
LISTE DES ABREVIATIONS	ii
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	iii
AVANT-PROPOS.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	3

Etude Bibliographique

Chapitre 1 : Les Archaea méthanogènes.....	5
1.1. Place des Archaea méthanogènes dans le monde du vivant	5
1.1.1. Emergence du domaine des Archaea	5
1.1.2. Phylogénie et classification des Archaea méthanogènes.....	6
1.1.3. Apports moléculaires aux données culturelles	7
1.2. Particularités morphologiques, cellulaires et métaboliques des Archaea méthanogènes.....	8
1.2.1. Morphologie.....	8
1.2.2. Constitution des enveloppes cellulaires.....	9
1.2.3. Métabolisme	9
1.2.3.1. Voie hydrogénéotrophe.....	10
1.2.3.2. Voie méthylotrophe.....	11
1.2.3.3. Voie acétotrophe (ou acétoclastique).....	11
1.3. Ecologie des Archaea méthanogènes	12
1.3.1. Distribution des Archaea méthanogènes dans l'environnement	12
1.3.2. Microbiote méthanogène et écosystèmes digestifs	13
1.3.2.1. Ruminants	14
1.3.2.2. Animaux monogastriques.....	15
1.3.2.3. Cas particulier des termites	16

Chapitre 2 : Microbiote intestinal humain et rôle des Archaea méthanogènes.....	18
2.1. Microbiote intestinal humain	18
2.1.1. Installation du microbiote intestinal.....	18
2.1.2. Diversité et distribution du microbiote gastro-intestinal de l'adulte	19
2.1.2.1. <i>Diversité et distribution longitudinale du microbiote gastro-intestinal.....</i>	19
2.1.2.2. <i>Distribution transversale du microbiote colique</i>	20
2.1.2.3. <i>Particularités mises en évidence dans la composition du microbiote colique</i>	21
2.2. Installation et diversité des Archaea méthanogènes dans le microbiote colique humain ..	22
2.2.1. Diversité et abondance chez l'adulte	22
2.2.2. Installation et maintien du microbiote méthanogène	23
2.2.3. Localisation	24
2.3. Facteurs influençant le microbiote méthanogène intestinal humain	25
2.3.1. La disponibilité en sulfate.....	25
2.3.2. Les acides biliaires.....	26
2.3.3. Le temps de transit.....	27
2.3.4. l'âge.....	27
2.3.5. Le sexe	28
Chapitre 3 : Pathologies, microbiote intestinal et Archaea méthanogènes.....	30
3.1. Aperçu de l'influence du microbiote sur la physiologie de l'hôte	30
3.1.1. Rôle nutritionnel bénéfique	30
3.1.2. Développement et maturation du système immunitaire intestinal	32
3.1.3. Effet du microbiote sur la fonction des cellules épithéliales, leur croissance et leur survie	33
3.2. Implication du microbiote dans des pathologies d'origine digestive	34
3.2.1. Obésité.....	34
3.2.2. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....	36
3.2.3. Syndrome de l'intestin irritable (SII).....	37
3.2.4. Cancer colorectal (CCR).....	38
3.3. Hypothèse d'une participation ou d'une implication des Archaea méthanogènes	39

Résultats

Chapitre 1 : Le challenge d'un test de diagnostic <i>in vitro</i> (DIV) moléculaire permettant d'évaluer le microbiote intestinal humain (Article 1).....	43
Chapitre 2 : Mise en évidence d'un potentiel nouvel ordre d'Archaea méthanogènes colonisant le tractus intestinal humain par analyse du marqueur moléculaire <i>mcrA</i> (Article 2).....	51
Chapitre 3 : Evaluation moléculaire du microbiote méthanogène intestinal humain révélant une augmentation de la diversité associée à l'âge de l'hôte (Article 3).....	56
Discussion	76
Conclusions – Perspectives	86
Références Bibliographiques	88
Annexes	108

RESUME

Le microbiote intestinal constitue un réservoir d'activités enzymatiques riche et varié dont l'expression fait partie intégrante de la physiologie de l'organisme et influe sur sa santé. La mise en évidence par méthodes culturales classiques des Archaea méthanogènes est difficile et n'a permis à ce jour que la mise en évidence de deux Methanobacterales hydrogénéotrophes au sein de ce microbiote : *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae*. Les travaux de cette thèse ont eu pour but d'apporter une vision moléculaire nouvelle de la diversité des Archaea méthanogènes du microbiote et de rechercher l'influence de l'âge sur ces communautés. Ces travaux ont été menés par analyse d'une partie du cistron *mcrA*, marqueur moléculaire spécifique de la méthanogenèse, et du gène codant pour l'ARNr 16S. Ces études ont révélé une plus grande diversité des Archaea colonisant cet écosystème et ont mis en évidence de nouveaux phylotypes ne pouvant être rattachés à aucun des 5 ordres méthanogènes précédemment décrits. Ils correspondent probablement à d'autres espèces méthanogènes affiliées aux Thermoplasmatales ou cohabitent avec des membres encore inconnus des Thermoplasmatales. Une étude réalisée sur 63 individus répartis en nouveau-nés, adultes et seniors a montré que la fréquence de ces nouveaux phylotypes augmente avec le vieillissement. Ces résultats interrogent à la fois sur l'origine de ces divers organismes et leur présence au sein du microbiote intestinal du sujet âgé et soulignent notre relative méconnaissance d'un des trois domaines du vivant.

ABSTRACT

The intestinal microbiota constitutes a rich and varied enzymatic activities tank. Its expression is an integral part of the organism's physiology and has an influence on its health. The methanogenic Archaea, whose detection by classic cultural methods is difficult, are so far represented only by two hydrogenotrophic Methanobacterales in this microbiota: *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae*. The purpose of this thesis was to bring a molecular vision of the diversity of the methanogenic Archaea of the microbiota and to look for the influence of age on this community. The research has been led by the analysis of the *mcrA* cistron, a specific molecular marker of methanogenesis, and of the 16S rRNA gene. It has revealed that the archaeal diversity colonizing this ecosystem is increased by new phylotypes which cannot be attached to any of the 5 previously described methanogenic orders, and may correspond to other methanogens affiliated to Thermoplasmatales or cohabiting with unknown Thermoplasmatales. Their frequency appears to be associated with their host's age, according to a study carried out on 63 individuals of different age-groups: 23 newborns (3 weeks to 10 months), 20 adults (from 25 to 45 years) and 20 elderly (from 70 to 90 years). A relation with the host's ageing is therefore possible. Finally, the potentiality of a 6th order of methanogenic Archaea distantly related to a group of Archaea which anaerobically oxidized methane, the ANME 1, and its surprising association recovered with unknown Archaea affiliated with Thermoplasmatales, raises the question on the phylogenetic origin of these various microorganisms and underlines our current relative ignorance of one of the three domain of life.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIEC	Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i>
AMO	Anaerobic methane oxidizer
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
CCR	Cancer colorectal
CH ₄	Méthane
CO	Monoxyde de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
Fiaf	Fasting-Induced Adipose Factor
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
H ₂	Dihydrogène
MCR	Méthyle coenzyme-M réductase
Mcr	Opéron codant pour la méthyle coenzyme-M réductase isoforme I
<i>mcrA</i>	Cistron codant pour la sous unité α de MCR I
MCR I	Méthyle coenzyme-M réductase isoforme I
MCR II	Méthyle coenzyme-M réductase isoforme II
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
<i>mrt</i>	Opéron codant pour la méthyle coenzyme-M réductase isoforme II
<i>mrtA</i>	Cistron codant pour la sous unité α de MCR II
N ₂	Azote
OTU	Operational taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pgc 1 α	Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SII	Syndrome de l'intestin irritable

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1	Arbre phylogénétique représentant le domaine des Archaea basé sur l'analyse de la concaténation des séquences de 53 protéines ribosomales	5
Figure 2	Phylogénie des Archaea méthanogènes déduite de l'analyse de 53 protéines ribosomales	7
Figure 3	Différences dans la structure des glycérolipides constituant la membrane des Archaea et celles des bactéries et des Eucaryotes	9
Figure 4	Les différentes voies de la méthanogénèse	11
Figure 5	Diagramme schématique des trois chaînes trophiques conduisant à la méthanogénèse rencontrées dans la nature	13
Figure 6	Répartition des différents ordres d'Archaea méthanogènes et des Thermoplasmatales dans le tractus digestif de <i>Cubitermes orthognathus</i>	16
Figure 7	Anatomie du tractus gastro-intestinal de l'homme	19
Figure 8	Distribution phylogénétique du microbiote intestinal	20
Figure 9	Observation microscopique de <i>Methanobrevibacter smithii</i>	22
Figure 10	Observation microscopique de <i>Methanosphaera stadtmanae</i>	22
Figure 11	Impact de l'âge sur le microbiote intestinal humain	28
Figure 12	Chaîne trophique de dégradation et de fermentation des polysides au sein du côlon humain	31
Tableau 1	Propriétés des groupes taxonomiques majeurs de méthanogènes	6
Tableau 2	Energie libre et organismes typiques des réactions de méthanogénèse	10
Tableau 3	Sources d'émission de méthane	12
Tableau 4	Dimension approximatives du tractus gastro-intestinal, temps de transit, pH et abondance du microbiote	19

PARTIE RÉSULTATS

Chapitre I

Figure 1	Different strategies for intestinal microbial identification	46
-----------------	--	-----------

Chapitre II

Figure 1	Phylogenetic relationships within the methanogenic/methane-oxidizing Archaea, derived from MCR-A partial amino acids sequences of some taxa and of Archaea retrieved from the human gut	54
Figure 2	Phylogenetic tree of archaeal SSU rRNA partial gene sequence from stools of volunteer 06.	55
Tableau 1	PCR primer sequences, amplicon lengths and targets	54
Tableau 2	Quantity, origin and nearest identified taxon of each phylotype deduced from the analyses of 398 <i>mcrA</i> clones	55

Chapitre III

Figure 1	Phylogenetic relationships within the methanogenic/methane-oxidizing archaea, derived from McrA partial aminoacid sequences for some taxa and methanogenic archaea retrieved from the human gut.	60
Figure 2	Phylogenetic relationships within methanogenic and non-methanogenic lineages derived from 16S rRNA partial gene sequences of some taxa and of sequences recovered from the human gut .	61
Tableau 1	Presence and proportion of <i>M. smithii</i> , <i>M. stadtmanae</i> , <i>Mx</i> -phylotypes and non-Methanobacteriales archaea among the <i>mcrA</i> positive stools	59
Tableau 2	PCR primer sequences, amplicon lengths and targets	59
Tableau 3	Quantity, origin, nearest identified taxon and OTU-affiliation of the <i>mcrA</i> clones	60

PARTIE DISCUSSION

Figure 1	Principe du clonage utilisant le système StabyCloning	65
Figure 2	Phylogénie des méthanogènes déduite de l'analyse de 53 protéines ribosomales (Modifié à partir de Baptiste <i>et al.</i> 2005)	69
Tableau 1	Séquence des amorces dégénérées ciblant le cistron <i>mcrA</i> des Archaea méthanogènes et méthanotrophes	65
Tableau 2	Identité entre séquences McrA de <i>Mx-01</i> , <i>Mx-02</i> , <i>Mx-03</i> , <i>Mx-04</i> et <i>Mx-05</i>	67

AVANT-PROPOS

La microbiologie du tube digestif

La microbiologie est née au XVII^e siècle du développement de la microscopie par Antonie Van Leeuwenhoek, et a pris son essor avec la mise au point des techniques de culture et d'isolement des micro-organismes par Robert Koch et Louis Pasteur au XIX^e siècle. L'écologie, apparue plus récemment en tant que science, se définit comme « l'étude des interactions entre les organismes vivants et le milieu, et des organismes vivants entre eux dans les conditions naturelles » (Frontier & Pichot-Viale, 1998). L'écologie microbienne a donc pour but de déterminer quels sont les micro-organismes présents dans un environnement donné, et leurs fonctions dans cet environnement.

Comme pour tous les écosystèmes microbiens, les premières avancées dans l'étude du microbiote intestinal ont été réalisées par des approches culturelles. La caractérisation du microbiote intestinal a débuté en 1885 avec l'isolement par Teodor Escherich de *Bacterium coli*, micro-organisme renommé par la suite *Escherichia coli* (Anonymous, 1981). Il a cependant fallu attendre 1931 pour que les chercheurs se rendent compte que le tractus intestinal était en fait colonisé par un ensemble de micro-organismes dont la majorité était anaérobie (Sanborn, 1931). L'application des techniques de culture en anaérobiose par Hungate (Hungate, 1969) a alors permis de grandes avancées dans la connaissance de cet écosystème. Cependant, comme l'ont montré les techniques basées sur l'analyse des séquences d'ARNr 16S à partir des années 80, ces techniques classiques, quel que soit le biotope considéré, ne donnent qu'une vision partielle des micro-organismes présents dans un écosystème. La proportion de micro-organismes non-cultivés colonisant le tractus digestif de l'homme varierait entre 54 % (Hayashi *et al.*, 2003) et 80 % (Eckburg *et al.*, 2005). L'utilisation d'outils d'écologie moléculaire de plus en plus pertinents pour l'étude du microbiote intestinal a permis d'améliorer notre connaissance de cet écosystème, à la fois au niveau de sa composition et de sa dynamique. Utilisées en association avec les approches culturelles, ces techniques permettent d'appréhender la fonction des micro-

INTRODUCTION GENERALE

Le microbiote intestinal humain est composé d'un nombre et d'une diversité considérable de micro-organismes. Son abondance est 10 fois supérieure à celle des cellules constituant le corps humain (Savage, 1977) et d'après des estimations récentes il serait constitué de plus de 15 000 phylotypes différents (Frank *et al.*, 2007). Ce microbiote est en constante interaction avec l'hôte et possède des activités métaboliques propres. De ce fait, il est considéré comme un véritable organe au sein de l'organisme (Nicholson *et al.*, 2005). Il assure notamment des fonctions nécessaires au maintien de la santé de l'hôte, avec des rôles en particulier dans sa nutrition, dans le développement et la maturation du système immunitaire intestinal et dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal.

La densité et la diversité du microbiote intestinal humain atteint son maximum dans le côlon et notamment le côlon distal, où sont retrouvés approximativement 10^{12} micro-organismes par gramme de contenu, majoritairement des bactéries. Chez un individu sur 2 ou 3, des Archaea méthanogènes sont retrouvées à des concentrations supérieures à 10^8 cellules par gramme de contenu (Conway de Macario & Macario, 2008). Seules deux Archaea méthanogènes ont été identifiées comme colonisant le côlon: *Methanobrevibacter smithii* (Miller & Wolin, 1982, Miller *et al.*, 1982) et *Methanosphaera stadtmanae* (Miller & Wolin, 1985), principalement par approches culturales. Cependant, les Archaea méthanogènes sont connues pour avoir une croissance lente et dépendante de nombreux cofacteurs. Elles sont donc difficilement cultivables et isolables. Une approche moléculaire, indépendante des techniques de culture classiques, apparaît donc comme indispensable à l'étude de la diversité de cette microflore. Le développement d'une telle approche a fait l'objet des travaux de ce doctorat.

La première partie de ce mémoire présente une étude bibliographique visant à décrire l'état des connaissances concernant i) la place des Archaea méthanogènes dans le monde du vivant, leurs particularités morphologiques, métaboliques et cellulaires ainsi que leur écologie (Chapitre I), ii) la composition du microbiote intestinal humain et la place des Archaea méthanogènes au sein de ce dernier (Chapitre II), et enfin iii) les pathologies associées au microbiote intestinal humain et plus spécifiquement celles pour lesquelles le microbiote méthanogène serait impliqué (Chapitre III).

La seconde partie présente dans un premier chapitre l'intérêt potentiel d'un test moléculaire de diagnostic *in vitro* (biopuce – métagénome) du microbiote intestinal humain, avec pour but la prévention, le diagnostic et/ou le suivi thérapeutique de pathologies, notamment digestives. Ce chapitre fait notamment un récapitulatif de l'ensemble des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'écologie microbienne, raison pour laquelle cet aspect n'a pas fait l'objet d'un chapitre de la partie « Etude Bibliographique ». Le deuxième chapitre porte sur la mise en évidence, par analyse moléculaire du marqueur moléculaire *mcrA*, d'une espèce appartenant à un potentiel nouvel ordre d'Archaea méthanogènes colonisant le tractus digestif de l'homme. Enfin, un troisième chapitre vient compléter les données concernant la diversité des Archaea et notamment des Archaea méthanogènes colonisant le tractus digestif, notamment *via* l'étude de l'impact de l'âge sur la diversité et la distribution de ces micro-organismes au sein de cet écosystème.

Après avoir discuté de l'ensemble des résultats obtenus à la lumière des connaissances actuelles et des limites des techniques utilisées, ce mémoire conclura sur les perspectives qu'ouvrent ces travaux de doctorat.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

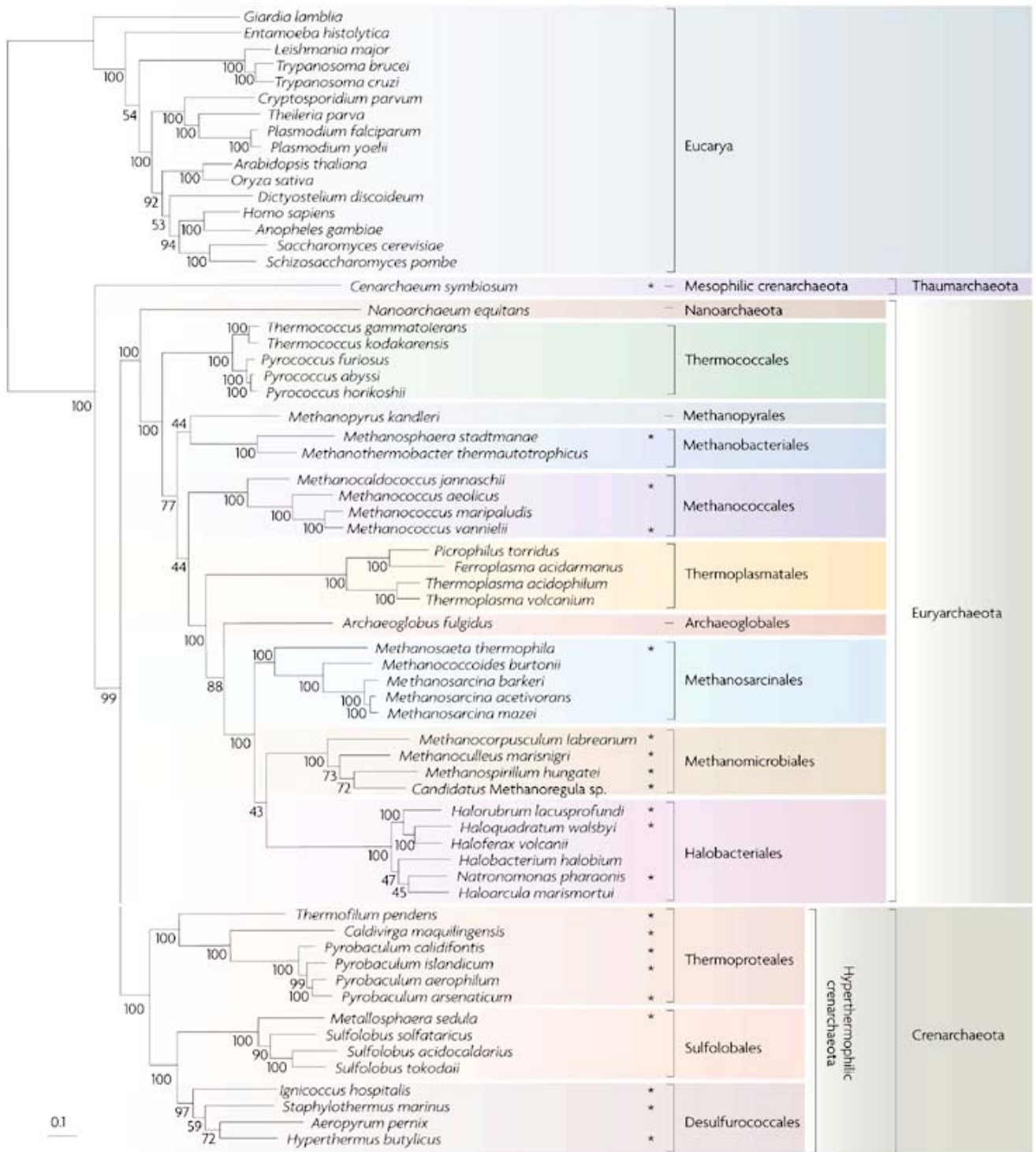


Figure 1. Arbre phylogénétique représentant le domaine des Archaea basé sur l'analyse de la concaténation des séquences de 53 protéines ribosomales (Brochier-Armanet *et al.*, 2008)

Chapitre 1 : Les Archaea méthanogènes

1.1. Place des Archaea méthanogènes dans le monde du vivant

1.1.1. Emergence du domaine des Archaea

Près de dix ans après les travaux de Zuckerkandl (1965), premiers à avoir considéré les molécules comme marqueurs de l'histoire évolutive, Woese et ses collaborateurs (Fox *et al.*, 1977, Woese & Fox, 1977) appliquèrent cette théorie à l'étude de la phylogénie bactérienne en utilisant comme marqueurs de l'évolution les ARN ribosomiques (ARNr), et notamment l'ARNr 16S (pour les Procaryotes) et l'ARNr 18S (pour les Eucaryotes). Ces travaux ont conduit à une division du monde du vivant en trois domaines : *Eucarya*, *Bacteria* et *Archaea* (Fox *et al.*, 1977, Woese & Fox, 1977, Woese, 1987, Woese *et al.*, 1990). Les études menées par la suite (caractérisations cellulaires, biochimiques, génétiques et génomiques) ont confirmé ces résultats, établissant ainsi un troisième domaine, le domaine des Archaea (à titre d'exemple : Forterre & Philippe, 1999, Makarova *et al.*, 1999, Wolf *et al.*, 2001). D'après les données recueillies et compilées au sein du *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Boone & Castenholz, 2001), deux phyla majoritaires composent ce domaine : les Crenarchaeota et les Euryarchaeota. Actuellement, les Crenarchaeota renferment essentiellement des micro-organismes thermophiles et thermoacidophiles alors que les Euryarchaeota sont représentés par une plus grande variété de micro-organismes, incluant l'ensemble des méthanogènes, des halophiles extrêmes, des thermophiles et des thermoacidophiles (Boone & Castenholz, 2001). Un troisième phylum a récemment été proposé : les Thaumarchaeota. Ce nouveau phylum est constitué d'un groupe d'Archaea mésophiles précédemment rattaché aux Crenarchaeota. L'analyse récente du génome de *Cenarchaeum symbiosum*, premier membre à avoir été séquencé, a montré que ce groupe de micro-organismes formait en fait un troisième phylum au sein des Archaea (Brochier-Armanet *et al.*, 2008)(Figure 1).

Tableau 1. Propriétés des groupes taxonomiques majeurs de méthanogènes (Adapté de Liu & Whitman 2008)

Ordre	Famille	Genre	Substrat de méthanogenèse	Température optimale (°C)	Habitat typique	
Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	H ₂ , (formate)	37-45	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce, sols marécageux, rumen	
		<i>Methanobrevibacter</i>	H ₂ , formate	37-40	Tractus gastro-intestinal des animaux, fermenteurs anaérobies	
		<i>Methanosphaera^b</i>	H ₂ + méthanol	37	Tractus gastro-intestinal des animaux	
		<i>Methanothermobacter</i>	H ₂ , (formate)	55-65	Fermenteurs anaérobies	
Methanococcales	Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i>	H ₂	80-88	Sources d'eaux chaudes	
	Methanococcaceae	<i>Methanococcus</i>	H ₂ , formate	35-40	Sédiments marins	
		<i>Methanothermococcus</i>	H ₂ , formate	60-65	Sédiments marins de zones géothermales	
	Methanocaldococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i>	H ₂	80-85	Sédiments marins de zones géothermales	
<i>Methanotorris</i>		H ₂	88	Sédiments marins de zones géothermales		
Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i>	H ₂ , formate	40	Fermenteurs anaérobies, nappes phréatiques, rumen	
		<i>Methanoculleus</i>	H ₂ , formate	20-55	Fermenteurs anaérobies, sédiments marins, sédiments d'eau douce, gisements de pétrole, sources d'eau chaude	
		<i>Methanofollis</i>	H ₂ , formate	37-40	Fermenteurs anaérobies	
		<i>Methanogenium</i>	H ₂ , formate	15-57	Sédiments marins, sédiments d'eau douce, riz non décortiqué, tractus gastro-intestinal des animaux	
		<i>Methanolacinia</i>	H ₂	40	Sédiments marins	
		<i>Methanoplanus</i>	H ₂ , formate	32-40	Gisements de pétrole	
	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	H ₂ , formate	30-37	Fermenteurs anaérobies, sédiments marins	
	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	H ₂ , formate	30-40	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce	
		<i>Methanocalculus</i>	H ₂ , formate	30-40	Gisements de pétrole	
	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>	(H ₂), MeNH ₂ , Acetate	35-60	Fermenteurs anaérobies, sédiments marins, sédiments d'eau douce, rumen
<i>Methanococcoides</i>			MeNH ₂	23-35	Sédiment marins	
<i>Methanohalobium</i>			MeNH ₂	40-55	Sédiments de systèmes Hypersalins	
<i>Methanohalophilus</i>			MeNH ₂	35-40	Sédiments de systèmes Hypersalins	
<i>Methanolobus</i>			MeNH ₂	37	Sédiments de systèmes Hypersalins	
<i>Methanomethylovorans</i>			MeNH ₂	20-50	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce	
<i>Methanimicrococcus</i>			H ₂ + MeNH ₂	39	Tractus gastro-intestinales des animaux	
<i>Methanosalsum</i>			MeNH ₂	35-45	Sédiments de systèmes Hypersalins	
Methanosaeataceae			<i>methanosaeta</i>	Acetate	35-60	Fermenteurs anaérobies, sédiments d'eau douce
Methanopyrales			Methanopyraceae	<i>Methanopyrus</i>	H ₂	98

1.1.2. Phylogénie et classification des Archaea méthanogènes

A ce jour les micro-organismes capables de réaliser la méthanogénèse font exclusivement partie du règne des Archaea et plus précisément des Euryarchaeota (Figure 1 p. 5). Ils sont représentés par cinq ordres distincts, respectivement les Methanobacterales, les Methanococcales, les Methanomicrobiales, les Methanosarcinales et les Methanopyrales, et sont sous-divisés en 10 familles et 31 genres (Boone & Castenholz, 2001, Whitman, 2001). Le Tableau 1 répertorie certaines caractéristiques des principaux taxons méthanogènes.

En se basant sur les analyses phylogénétiques de 53 protéines ribosomales, Baptiste *et al.* (2005) ont montré que les méthanogènes peuvent être divisés en deux groupes monophylétiques. Le premier groupe, ou Classe I des méthanogènes, renferme les Methanobacterales, les Methanococcales, et les Methanopyrales. Le deuxième groupe, ou Classe II des méthanogènes, inclut les Methanomicrobiales et les Methanosarcinales bien que d'un point de vue métabolique, les Methanomicrobiales soient plus proches de la Classe I des méthanogènes que des Methanosarcinales (Baptiste *et al.*, 2005, Cf 1.2.3. p. 9). Un autre type de classification a été proposé par Thauer *et al.* (2008) en fonction de la présence ou non de cytochrome : les Methanosarcinales étant les seules à présenter ces coenzymes, les Methanomicrobiales peuvent de ce fait être rattachées d'un point de vue physiologique aux méthanogènes de Classe I. Récemment, Anderson et ses collaborateurs (2009) ont, quant à eux, proposé une reclassification des méthanogènes en trois classes distinctes : la Classe I (Methanobacterales, Methanococcales et Methanopyrales), la Classe II (Methanomicrobiales) et la Classe III (Methanosarcinales). Cette classification, qui repose sur l'analyse phylogénétique de sept protéines retrouvées chez tous les méthanogènes et impliquées dans la méthanogénèse et la synthèse de cofacteurs, indique que les Methanomicrobiales sont équidistants de la Classe I et de la Classe III des méthanogènes (Anderson *et al.*, 2009).

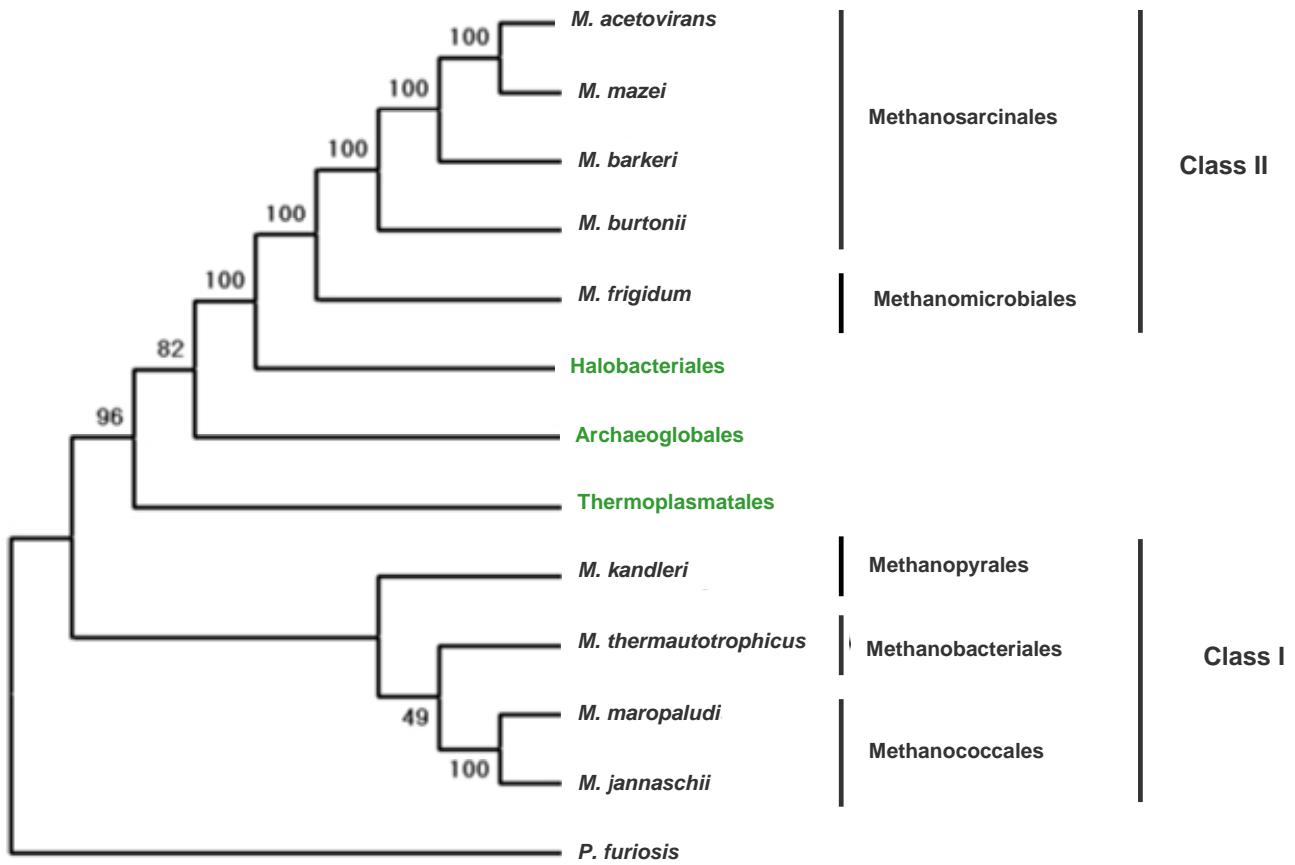


Figure 2. Phylogénie des Archaea méthanogènes déduite de l'analyse de 53 protéines ribosomales (Adaptée de Bapteste *et al.*, 2005)

1.1.3. Apports moléculaires aux données culturelles

L'émergence des techniques de biologie moléculaire pour l'étude des écosystèmes microbiens a mis en évidence une diversité bien plus élevée que celle mise en évidence par les techniques culturelles. Comme évoqué en avant-propos, plusieurs auteurs s'accordent à dire que seuls 1 à 10 % des cellules observées au microscope, à partir d'un échantillon microbien complexe, seraient cultivables par les méthodes de culture traditionnelle. Ceci est d'autant plus vrai pour les Archaea méthanogènes en raison de leur nature strictement anaérobie et de leur croissance lente.

La cible moléculaire la plus souvent utilisée pour l'étude de la diversité microbienne est l'ARNr 16S et son gène (souvent noté *ssu rDNA* ou *16S rDNA*). Le choix s'est porté sur ce marqueur pour plusieurs raisons (Pace *et al.*, 1985, Ludwig & Schleifer, 1994, Ludwig *et al.*, 1998) :

- Sa présence est universelle et sa fonction est la même chez tous les organismes.
- Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés.
- Il est relativement facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules.
- Il est préféré au 5S et au 23S en raison de sa taille moyenne et de sa structure secondaire moins marquée. Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.

Cependant, l'identification de méthanogènes sur la base de l'ARNr 16S (ou de son gène) est limitée car les méthanogènes ne sont pas monophylétiques (Baptiste *et al.*, 2005) ; au contraire, des groupes de micro-organismes non-méthanogènes tels que les Archaeoglobales, les Thermoplasmatales et les Halobacteriales viennent s'intercaler entre les différents groupes de méthanogènes (Figure 2). De ce fait, les analyses de l'ARNr 16S (ou de son gène) visant l'étude de la diversité des Archaea méthanogènes sont souvent associées à celles d'autres marqueurs : le marqueur le plus souvent utilisé est le marqueur moléculaire métabolique *mcrA*, cistron codant pour la sous-unité α de la méthyle-coenzyme M reductase (MCR, EC 2.8.4.1). Ce marqueur présente plusieurs intérêts. Tout d'abord, MCR est l'enzyme qui catalyse la dernière étape de la

méthanogénèse et en est spécifique. Cet enzyme se présente sous deux isoformes distinctes, MCR I (codée par l'opéron *mcr*) et MCR II (codée par l'opéron *mrt*). Alors que l'opéron *mcr* est retrouvé chez l'ensemble des méthanogènes, à l'exception de *Methanosphaera stadtmanae* (Fricke *et al.*, 2006), *mrt* n'est retrouvé que chez les Methanococcales et les Methanobacteriales (Lueders *et al.*, 2001). Notons cependant que les Archaea réalisant l'oxydation anaérobie du méthane (AMO), et soupçonnées d'inverser plusieurs étapes de la méthanogénèse au cours de leur métabolisme, présentent également l'opéron *mcr* au sein de leur génome (Hallam *et al.*, 2003). Enfin, les phylogénies *mcrA* sont similaires aux phylogénies d'ADNr 16S. Ceci sous-entend que le cistron *mcrA* n'est pas sujet à transfert latéral et peut donc être utilisé comme marqueur phylogénétique des Archaea méthanogènes (Luton *et al.*, 2002).

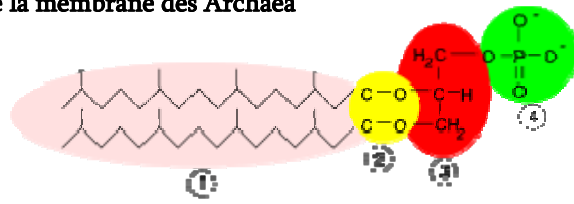
Suite à l'isolement et à la caractérisation de micro-organismes au sein de chacun d'entre eux, cinq ordres méthanogènes sont actuellement reconnus (Cf 1.1.2. p. 6). Chacun de ces ordres s'est agrémenté d'un nombre important de nouveaux phylotypes, issus des données moléculaires obtenues lors d'études de diversité microbienne ; parfois même, ces apports permettent de suspecter de potentiels nouveaux ordres méthanogènes s'intercalant entre les différents ordres décrits. C'est le cas par exemple du « FEN cluster », mis en évidence dans les tourbières de Finlande (Galand *et al.*, 2002), et du « Rice Cluster I ». Dans ce dernier cas, un membre a été récemment isolé et caractérisé (Sakai *et al.*, 2007).

1.2. Particularités morphologiques, cellulaires et métaboliques des Archaea méthanogènes

1.2.1. Morphologie

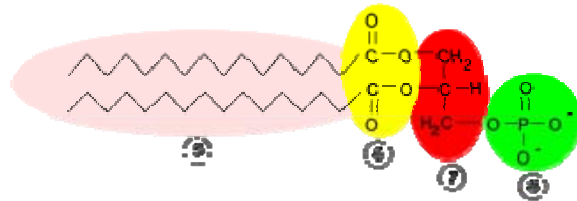
Tout comme les bactéries, les Archaea méthanogènes sont des procaryotes unicellulaires qui se présentent sous une grande diversité de formes : coques réguliers, irréguliers, spirilles, bacilles plus ou moins allongés. Leurs cellules présentent également les modes de regroupement classiquement retrouvés en microbiologie : isolées, par paire, regroupées en chaînettes plus ou moins longues ou regroupées sous forme d'agrégats. La mobilité est parfois présente. De plus,

Glycérophospholipides de la membrane des Archaea



- 1 : Isoprénols
- 2 : Liaison éther
- 3 : L-glycérol
- 4 : Groupement phosphate

Glycérophospholipides de la membrane des bactéries et des Eucaryotes



- 5 : Acides gras
- 6 : Liaison ester
- 7 : D-glycérol
- 8 : Groupement phosphate

Figure 3. Différences dans la structure des glycérolipides constituant la membrane des Archaea et celles des bactéries et des Eucaryotes (Adaptée de [1])

plusieurs espèces de Methanosarcinales et de *Methanosaeta* contiennent des vacuoles de gaz. Enfin, la coloration de Gram peut être positive ou négative, même au sein d'un même genre (Garcia *et al.*, 2000).

1.2.2. Constitution des enveloppes cellulaires

La caractéristique majeure des Archaea est la nature de leur membrane cellulaire (Figure 3, Koga *et al.*, 1993). Les glycérolipides de la membrane cellulaire des Eucaryotes et des Bactéries sont constitués d'esters de glycérol et d'acide gras. Chez les Archaea, la membrane est constituée d'une association de glycérol et d'alcools à longues chaînes carbonées branchées (un groupement méthyle tous les 5 atomes de carbone) : des isoprénols. L'association des groupements alcools du glycérol avec ceux de l'isoprénol s'établit grâce à des liaisons éther qui sont plus stables à haute température que les liaisons ester (Forterre, 2007). De plus, alors que la membrane cellulaire des bactéries et des Eucaryotes est constituée de D-glycérol, celle des Archaea est formée de L-glycérol (Forterre *et al.*, 2002). Au-delà d'une simple différence de conformation, ceci implique un appareillage enzymatique spécifique.

Les Archaea se caractérisent également par l'absence de muréine (ou peptidoglycane) au sein de leur paroi cellulaire. Elles présentent de la pseudo-muréine ou des sous-unités protéiques selon l'ordre considéré, ce qui leur confère une résistance aux antibiotiques interférant dans la synthèse du peptidoglycane comme notamment la pénicilline, la cyclosérine et la valinomycine. Ces propriétés de résistance aux antibiotiques sont souvent utilisées pour l'isolement de ces micro-organismes (Garcia *et al.*, 2000).

1.2.3. Métabolisme

Tous les méthanogènes sont des Archaea anaérobies strictes qui obtiennent la totalité ou la majorité de leur énergie à partir de la méthanogenèse et qui produisent donc du méthane

Tableau 2. Energie libre et organismes typiques des réactions de méthanogène (Adapté de Liu & Whitman 2008)

Réaction	ΔG° ^a (kJ/mol CH ₄)	Organismes
I. Type CO₂		
4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O	-135	La plupart des méthanogènes
4 HCOOH → CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O	-130	Plusieurs hydrogénotrophes
CO ₂ + 4 isopropanol → CH ₄ + 4 acétone + 2 H ₂ O	-37	Quelques hydrogénotrophes
4 CO + 2 H ₂ O → CH ₄ + 3 CO ₂	-196	<i>Methanothermobacter</i> et <i>Methanosarcina</i>
II. Composés méthylés en C1		
4 CH ₃ OH → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O	-105	<i>Methanosarcina</i> et autres méthylophes
CH ₃ OH + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O	-113	<i>Methanomicrococcus blatticola</i> et <i>Methanosphaera</i>
2 (CH ₃) ₂ S + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ S	-49	Quelques méthylophes
4 CH ₃ NH ₂ + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₃	-75	Quelques méthylophes
2 (CH ₃) ₂ NH + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 NH ₃	-73	Quelques méthylophes
4 (CH ₃) ₃ N + 6 H ₂ O → 9 CH ₄ + 3 CO ₂ + 4 NH ₃	-74	Quelques méthylophes
4 CH ₃ NH ₃ Cl + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ Cl	-74	Quelques méthylophes
III. Acétate		
CH ₃ COOH → CH ₄ + CO ₂	-33	<i>Methanosarcina</i> et <i>Methanosaeta</i>

comme produit terminal de leur respiration anaérobie

Les substrats carbonés utilisés sont limités à trois types : le dioxyde de carbone (CO₂), les composés méthylés et l'acétate (Tableau 2), ce qui permet de distinguer 3 voies métaboliques de méthanogénèse (Figure 4 p. 11). Il est donc à noter que les Archaea méthanogènes sont incapables d'utiliser directement les substrats naturellement les plus abondants dans l'environnement tels que les hydrates de carbone, les acides gras à longue chaîne et les alcools et se retrouvent donc dépendants de l'activité métabolique d'autres organismes.

1.2.3.1. Voie hydrogénotrophe

La majorité des Archaea méthanogènes sont des hydrogénotrophes (Tableau 2, type I). Sur les cinq ordres méthanogènes décrits, quatre renferment exclusivement des micro-organismes hydrogénotrophes : les Methanobacterales, les Methanococcales, les Methanomicrobiales et les Methanopyrales (respectivement les ordres 1, 2, 3 et 5). Ces derniers réduisent le CO₂ en méthane en utilisant le H₂ comme donneur d'électrons. Cette voie est composée de sept étapes biochimiques centrales (Figure 4 p. 11) faisant intervenir plusieurs coenzymes spécifiques : méthanofurane, tetrahydrométhanoptérine et coenzyme M.

Le formate peut également être converti en méthane au travers de cette voie. Dans ce cas, quatre molécules de formate sont oxydées pour donner une molécule de CO₂ par le biais de la formate déshydrogénase. De plus, quelques Archaea méthanogènes hydrogénotrophes peuvent utiliser des alcools secondaires, tels que le 2-propanol, le 2-butanol et le cyclopentanol comme donneur d'électrons. Un petit nombre peut également utiliser l'éthanol (Widdel, 1986, Bleicher *et al.*, 1989). L'utilisation directe de ces substrats carbonés constitue l'exception à la règle stipulant que ces micro-organismes ne peuvent pas métaboliser directement les composés organiques. Enfin, deux espèces, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Ordre 1) et *Methanosarcina barkeri* (Ordre 4), ont montré qu'elles pouvaient utiliser le CO comme agent réducteur (O'Brien *et al.*, 1984, Daniels *et al.*, 1977).

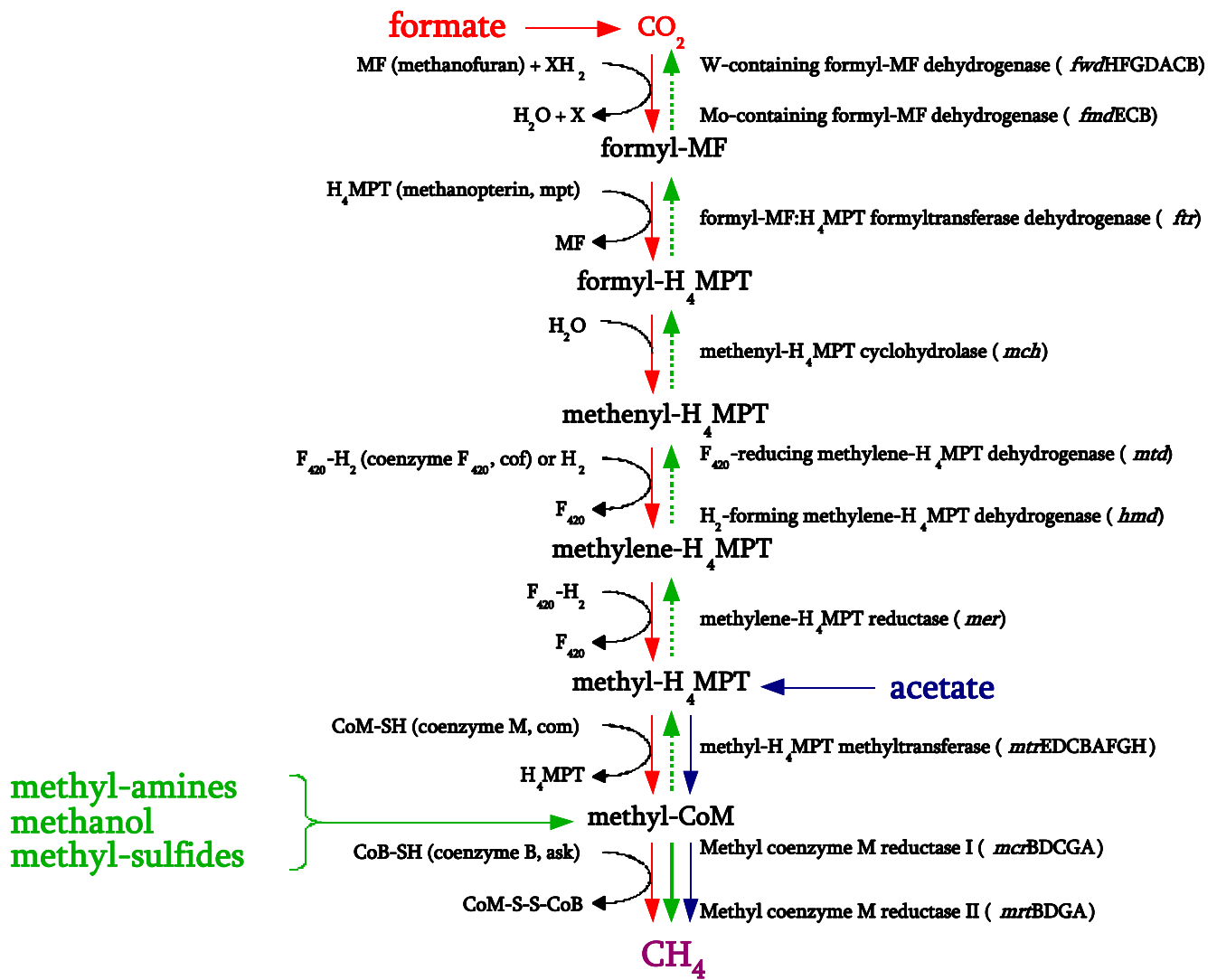


Figure 4. Les différentes voies de la méthanogénèse (Adaptée de Bapteste *et al.*, 2005)

1.2.3.2. Voie méthylotrophe

Les méthanogènes capables d'utiliser les composés méthylés, ou méthylotrophes (Tableau 2 p. 10, type II), font exclusivement partie de l'ordre des Methanosarcinales (Ordre 4), à l'exception néanmoins des Methanobacterales hydrogénotrophes du genre *Methanosphaera* (Ordre 1). On peut également noter que la croissance de *Methanomicrococcus blatticola* et des *Methanosphaera* (Ordre 1) est décrite comme dépendante de l'H₂ (Sprenger *et al.*, 2007, Miller & Wolin, 1985), ce qui en fait des micro-organismes méthylotrophes et hydrogénotrophes obligatoires spécialisés dans la réduction des groupements méthyles par l'H₂.

Cette voie peut être réalisée à partir de composés porteurs d'un ou de plusieurs groupement(s) méthyle(s) : le méthanol, les méthylamines (monométhylamine, diméthylamine, triméthylamine et tetraméthylammonium) et les sulfures de méthyle (méthanethiol et diméthylsulfure) (Figure 4). Parmi les différentes variantes de cette voie, la plus étudiée est celle réalisée à partir de composés à un carbone, tels que les monométhylamines et le méthanol. Un composé à un carbone est oxydé (en remontant la voie hydrogénotrophe à partir du methyl-CoM jusqu'au CO₂) de manière à fournir les électrons nécessaires à la réduction en méthane de trois autres groupements méthylés (Liu & Whitman, 2008).

1.2.3.3. Voie acétotrophe (ou acétoclastique)

Deux tiers du méthane produit dans les environnements aquatiques et les sols l'est à partir d'acétate, et paradoxalement, seuls deux genres (Ordre 4) sont connus comme utilisant l'acétate pour la méthanogenèse : *Methanosarcina* et *Methanosaeta*. Dans cette voie métabolique, l'acétate est scindé en un groupement méthyle et un CO, ce dernier étant par la suite oxydé en CO₂. Le groupement méthyle est, quant à lui, lié à la méthanoptérine avant d'être réduit en CH₄ suivant des réactions homologues à celles des deux dernières étapes de la voie hydrogénotrophe (Figure 4).

En règle générale, les Methanosarcinales utilisent préférentiellement le méthanol et les méthylamines par rapport à l'acétate. De nombreuses espèces utilisent également l'H₂. Les

Tableau 3. Sources d'émission de méthane (Adapté de Liu & Whitman 2008)

Sources	Emission de méthane (Tonnes de CH ₄ par an)	Pourcentage (%) ^a
Sources naturelles		
Marécages	92-237	15-40
Termites	20	3
Océan	10-15	2-3
Hydrates de méthane	5-10	1-2
Sous-total	127-282	21-47
Sources anthropogéniques		
Ruminants	80-115	13-19
Production d'énergie ^b	75-110	13-18
Agriculture du riz	25-100	7-17
Décharges	35-73	6-12
Combustion de biomasse	23-55	4-9
Traitement des déchets	14-25	2-4
Sous-total	267-478	45-80
Total des sources	500-600	

^a Estimation de la contribution relative de chaque source d'émission de méthane comparativement à l'émission globale de 600 tonnes de CH₄ par an.

^b Méthane issu de l'exploitation minière, des forages pétroliers et de la production pétrochimique.

Methanosaeta n'utilisent que l'acétate, et ce jusqu'à des concentrations très basses allant de 5 à 20 μM . Les espèces du genre *Methanosarcina*, quant à elles, ont besoin d'une concentration minimale de 1 mM (Jetten *et al.*, 1992). Cette affinité particulière pour l'acétate est certainement due à des différences dans les premières étapes du métabolisme de l'acétate : les *Methanosarcina* ont un acétate kinase-phosphotransacetylase (activation de l'acétate en acétyl CoA) présentant une faible affinité pour l'acétate, alors que les *Methanosaeta* utilisent une adénosine monophosphate synthetase (AMP-synthétase) présentant une affinité élevée pour l'acétate (Jetten *et al.*, 1992, Smith & Ingram-Smith, 2007).

1.3. Ecologie des Archaea méthanogènes

On estime que le méthane atmosphérique a augmenté de 160 % des années 1850 à nos jours (Megonigal & Guenther, 2008). Si l'on se réfère aux données publiées par Liu & Whitman (2008), 45 à 80 % des émissions de méthane au niveau mondial seraient liées à l'activité humaine contre 21 à 47 % liées aux sources naturelles (Tableau 3). Le méthane étant un gaz à effet de serre plus puissant que le CO_2 et un composé à valeur énergétique élevée (816 kJ/mol libérable par combustion), l'intérêt pour l'écologie des Archaea méthanogènes a grandi tout au long de ces dernières années (Megonigal & Guenther, 2008).

1.3.1. Distribution des Archaea méthanogènes dans l'environnement

Les Archaea méthanogènes sont largement distribuées dans la nature, mais leur croissance n'étant possible qu'à des potentiels d'oxydoréductions très bas, de l'ordre de $-0,3\text{ V}$ (Zinder, 1993), elles restent confinées à des environnements strictement anaérobies. Tout comme les Archaea de manière générale, elles colonisent une variété considérable d'environnements. On les retrouve à des températures allant de 0 à plus de 100°C et les organismes varient donc de psychrophiles à hyperthermophiles. Les Archaea méthanogènes sont également retrouvées à des concentrations de NaCl et à des valeurs de pH allant de classique à extrême (Chaban *et al.*, 2006).

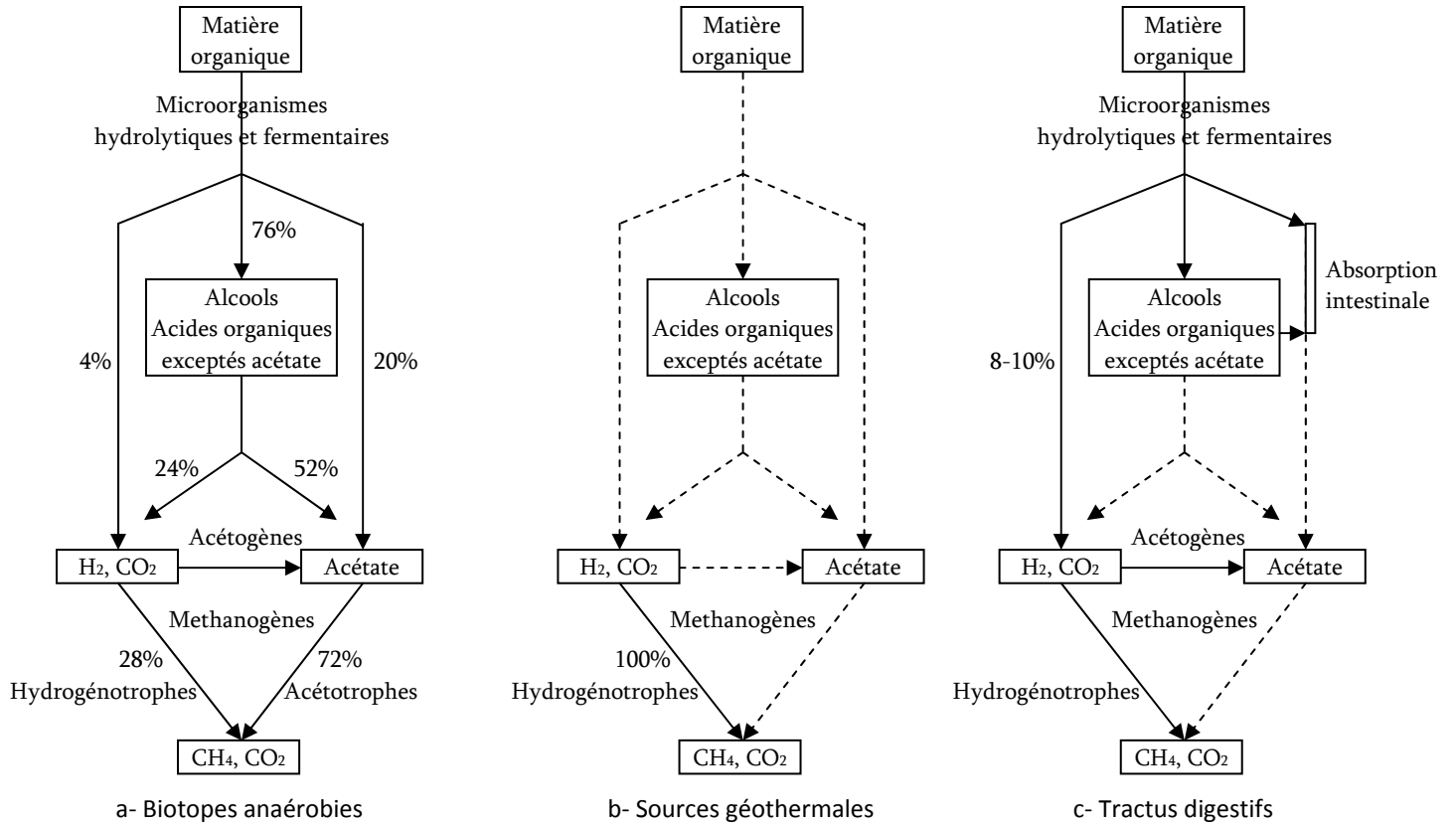


Figure 5. Diagramme schématique des trois chaînes trophiques conduisant à la méthanogénèse rencontrées dans la nature (Adaptée de Garcia *et al.*, 2000)

D'après Garcia *et al.* (2000), on retrouve les méthanogènes dans trois types d'environnements et les chaînes trophiques menant à la production de méthane sont différentes selon chaque type (Figure 5). Ces trois types d'environnements sont les suivants :

- Les environnements aquatiques et les sols de type marécages, tourbières et rizières. Dans ces habitats, environ un tiers du méthane est produit par le biais de la voie hydrogénotrophe et les deux tiers restant le sont par la voie acétoclastique (Zinder, 1993, Liesack *et al.*, 2000, Figure 5a).
- Les environnements tels que les zones géothermales terrestres ou marines (comme par exemple les sources hydrothermales de la dorsale médio-océanique du pacifique). Dans ces environnements, le méthane est produit en l'absence de matière organique, à partir de l'hydrogène issu de procédés géologiques (Figure 5b). Les Archaea méthanogènes que l'on y retrouve sont des espèces hydrogénotrophes thermophiles et hyperthermophiles. A titre d'exemple, on peut citer *Methanopyrus kandleri* dont la température optimale de croissance est de 98°C et qui vit à 2000 m de profondeur à la base des « fumeurs noirs » présents au niveau de la dorsale sous-marine du golf de Californie (Huber *et al.*, 1989).
- Le tractus digestif de nombreux animaux et insectes. Dans ces environnements, la méthanogenèse se fait majoritairement à partir d'H₂ et de CO₂. Les prochains paragraphes seront consacrés de manière plus détaillée à ce type d'environnement, et plus particulièrement au tube digestif de l'homme (Figure 5c).

1.3.2. Microbiote méthanogène et écosystèmes digestifs

Dans la plupart des environnements digestifs, les espèces d'Archaea méthanogènes majoritairement retrouvées appartiennent au genre *Methanobrevibacter* (Ordre 1, hydrogénotrophe (Garcia *et al.*, 2000). Un petit nombre d'espèces appartenant aux genres *Methanobacterium* (ordre 1), *Methanosphaera* (ordre 1), *Methanomicrobium* (ordre 3),

Methanogenium (ordre 3) et *Methanosarcina* (ordre 4) ont également été isolées (Chaban *et al.*, 2006). Les ruminants et les termites, représentant respectivement 13-18 % et 3 % des émissions terrestres de méthane, sont les principales sources animales d'émission de méthane.

1.3.2.1. Ruminants

Les ruminants incluent les Bovidés, les Ovidés, les Cervidés, les Giraffidés et les Antilocarpidés. L'essentiel des connaissances provient cependant d'études menées sur les bovins et les ovins. Dans le rumen, la taille de la communauté des Archaea atteint généralement de 10^8 à 10^{10} cellules par gramme de contenu ruminal. Les Archaea occupent différentes localisations de cet environnement : on les retrouve dans la phase liquide du contenu digestif (beaucoup sont fixées sur les protozoaires ciliés ou sur les particules alimentaires) ainsi que sur l'épithélium ruminal (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007).

Dans ces écosystèmes, l'acétate est rapidement absorbé par l'hôte. De ce fait, bien que des Archaea méthanogènes capables d'utiliser l'acétate soient présentes, le méthane est principalement produit à partir d' H_2 et de CO_2 , voire de formate (Garcia *et al.*, 2000).

Sur la base de la fréquence de son isolement et des analyses moléculaires, *Methanobacterium ruminantium* (Ordre 1, hydrogénotrophe) a longtemps été considérée comme la principale Archaea méthanogène colonisant le rumen des bovins (Sharp *et al.*, 1998, Whitford *et al.*, 2001, Shin *et al.*, 2004). Cependant, *Methanomicrobium mobile* (Ordre 3, hydrogénotrophe) est parfois retrouvée à des concentrations similaires à celle de *M. ruminantium* (Paynter & Hungate, 1968, Jarvis *et al.*, 2000). *Methanobacterium formicicum*, *Methanogenium oleantangyi* (Ordre 1, hydrogénotrophes) et *Methanosarcina barkeri* (Ordre 4, acétotrophe et méthylotrophe) ont également été décrites comme colonisant le rumen des bovins en pâturage (Jarvis *et al.*, 2000). *Methanobrevibacter milleriae* et *Methanobrevibacter olleyae* ont aussi été plus récemment isolées à partir du rumen à la fois de bovins et d'ovins (Rea *et al.*, 2007). Chez ces derniers, les espèces des genres *Methanobrevibacter* et *Methanomicrobium* sont les espèces les plus abondantes (Lin *et al.*, 1997, Yanagita *et al.*, 2000,

Skillman *et al.*, 2004). Les études précédentes ont montré que *Methanomicrobium mobile* est l'Archaea méthanogène prédominants dans le rumen des ovins (Lin *et al.*, 1997, Yanagita *et al.*, 2000). Les données de FISH obtenues par Yanagita *et al.* (2000) ont montré que la flore méthanogène représentait 3,6 % du microbiote ruminal total chez les ovins, et qu'environ 54 % des méthanogènes correspondaient à *Methanomicrobium mobile*. De plus, d'autres espèces sont également trouvées de façon plus aléatoire : ainsi, une souche de *Methanosarcina* a été isolée à partir des fèces de chèvre (Mukhopadhyay *et al.*, 1991).

Enfin, une étude menée par Tajima *et al.* (2001) a mis en évidence la présence de séquences d'ADNr 16S ne pouvant être rattachées phylogénétiquement à aucun des cinq ordres d'Archaea méthanogènes. Ces séquences s'affilient au groupe des Thermoplasmatales, l'un des phylum s'intercalant entre les différents groupes de méthanogènes (Cf 1.1.3. p. 7 - Figure 2). Des résultats identiques ont été obtenus chez différents bovins et ovins dans plusieurs études, notamment chez le mouton (Wright *et al.*, 2004, Wright *et al.*, 2006) et chez la vache (Wright *et al.*, 2007). Shin *et al.* (2004) ont aussi mis en évidence la présence de séquences ADNr 16S s'affilient au Crenarchaeota dans le rumen bovin.

1.3.2.2. Animaux monogastriques

A la différence des ruminants, la fermentation chez les animaux monogastriques est essentiellement localisée au niveau du cæcum et/ou du côlon. Ces parties du tractus gastro-intestinal reçoivent les composants alimentaires n'ayant été ni digérés ni absorbés dans les parties hautes du tractus. Chez le poulet, les équidés et les rongeurs, la fermentation se produit majoritairement au niveau du cæcum, très développé chez ces animaux. Chez les autres monogastriques où cet appendice est beaucoup plus petit (tel le porc), la fermentation a lieu majoritairement au niveau du côlon (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007).

La diversité des méthanogènes chez les non-ruminants est apparemment plus faible que celle observée chez les ruminants. Les espèces retrouvées font majoritairement partie du genre *Methanobrevibacter* (ordre 1), aussi bien chez le cheval (Morvan *et al.*, 1996, Lin & Miller,

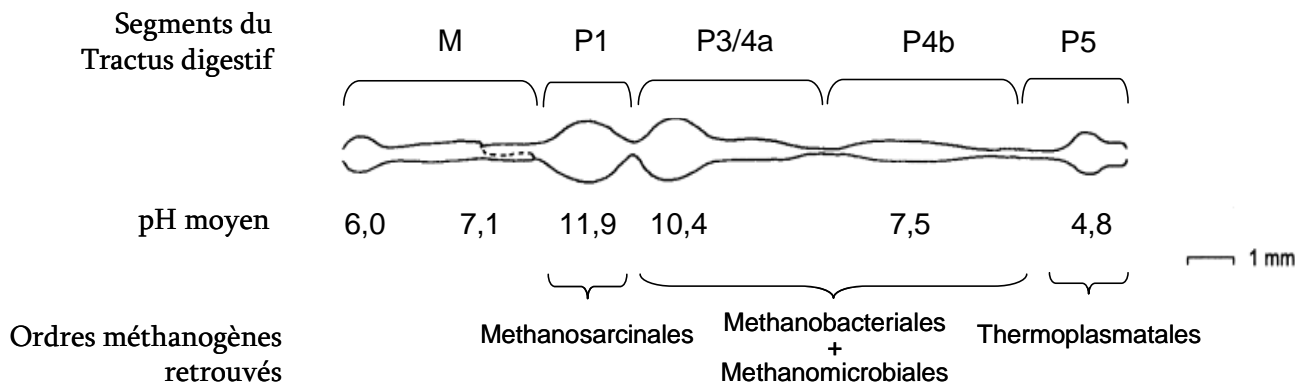


Figure 6. Répartition des différents ordres d'Archaea méthanogènes et des Thermoplasmatales dans le tractus digestif de *Cubitermes orthognathus* (Adaptée de Frieditch *et al.*, 2001)

1998), le porc (Miller & Wolin, 1986), le rat (Maczulac 1989), l'oie (Lin & Miller, 1998) que chez l'homme (Miller *et al.*, 1982). Par contre chez le lapin, la seule espèce ayant été décrite à ce jour est *Methanosphaera cuniculi* (ordre 1, Biavati *et al.*, 1988).

1.3.2.3. Cas particulier des termites

Des Archaea méthanogènes ont été retrouvées dans le tractus digestif de divers arthropodes telles des espèces de millepattes, blattes, scarabées et termites (Hackstein & Stumm, 1994, Sprenger *et al.*, 2000). Les termites, très abondants dans la nature, en particulier dans les régions tropicales, représentent à eux seuls 3 % de l'émission terrestre de méthane et revêtent donc un intérêt écologique particulier. Les Archaea méthanogènes leur sont associées *via* l'épithélium intestinal ou *via* des Protozoaires flagellés avec lesquels elles vivent en symbiose à l'intérieur du tube digestif (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). Les deux ordres dominants sont d'une part celui des Methanobacterales, avec comme principales espèces *Methanobrevibacter filiformis*, *Methanobrevibacter curvatus*, *Methanobrevibacter cuticularis*, *Methanobrevibacter arboriphilicus*, et *Methanobacterium bryantii*, et d'autre part, celui des Methanosarcinales (Leadbetter & Breznak, 1996, Brauman *et al.*, 2001).

Les termites se distinguent entre eux par la nature de leur régime alimentaire et par la structure de leur appareil digestif. Il est intéressant de noter que les termites xylophages (consommateurs de bois) sont pourvus d'un intestin relativement simple et sont donc considérés comme primitifs (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). Les termites humivores (consommateurs d'humus) sont pourvus d'un intestin plus complexe, séparé en plusieurs compartiments (Figure 6) : ils sont les plus abondants et constituent un groupe de macro-invertébrés écologiquement très important.

La structure et la diversité des conditions physicochimiques retrouvées au sein de l'intestin complexe des termites humivores en font un modèle d'étude intéressant. Une étude menée sur *Cubitermes orthognathus* a mis en évidence la distribution axiale des Archaea méthanogènes en fonction des conditions physicochimiques retrouvées tout au long du tractus digestif de cette espèce (Figure 6). Ainsi, alors que la partie antérieure du tractus (P1) est colonisée par des Methanosarcinales, les sections suivantes hébergent des Methanobacterales

(majoritairement du genre *Methanobrevibacter*) et des Methanomicrobiales (sections P3 et 4a et 4b) (Figure 6 p. 16). Des séquences s'affilient aux Thermoplasmatales ont également été retrouvées au niveau de la section la plus distale, section P5 (Friedrich *et al.*, 2001). Une nouvelle espèce d'Archaea haloalcaliphile appartenant aux Halobacteriales, *Natronococcus amylocticus*, a également été isolée à partir du termite *Cubitermes fungibacter* (Donovan *et al.*, 2004).

Les micro-organismes méthanogènes sont des procaryotes anaérobies stricts faisant exclusivement partie du domaine des Archaea. Leur métabolisme énergétique passe par l'utilisation de trois types de composés carbonés simples : le CO₂, les composés méthylés et l'acétate. Ils sont donc, pour la plupart, incapables d'utiliser directement les substrats énergétiques présents dans leur environnement (hydrates de carbone, acides gras à longue chaîne et alcools) et sont donc dépendants de l'activité d'autres micro-organismes.

Tout comme les bactéries, ils sont très divers morphologiquement et sont largement distribués dans la nature. Outre leur particularité à coloniser les environnements les plus extrêmes, ils sont également retrouvés dans le tractus digestif de nombreux animaux, où ce sont majoritairement des méthanogènes hydrogénotrophes. Du fait de leur importance écologique, les Archaea méthanogènes des ruminants et des termites font l'objet de nombreuses études. Celles qui colonisent le tractus digestif de l'homme seront décrites dans le prochain chapitre.

Chapitre 2 : Microbiote intestinal humain et rôle des Archaea méthanogènes

2.1. Microbiote intestinal humain

2.1.1. Installation du microbiote intestinal

Le tractus gastro-intestinal du fœtus est stérile. Celui du nouveau-né est rapidement colonisé dès les premiers instants de vie extra-utérine. Il s'agit d'un environnement particulièrement permissif en l'absence des mécanismes immunitaires sophistiqués de l'adulte : une succession d'espèces prend alors possession de l'intestin, avec en premier lieu, lors d'une naissance par voie basse, les bactéries anaérobies. Néanmoins, ces dernières ne pourront s'implanter définitivement que lorsque les bactéries anaérobies facultatives auront consommé l'oxygène présent. Cette colonisation est fonction de plusieurs facteurs exogènes, tels que l'exposition aux micro-organismes d'origine maternelle (fécaux, vaginaux, cutanés et issus de la lactation) et environnementale, l'alimentation, les antibiothérapies éventuelles et le mode d'alimentation (allaitement au sein ou au biberon). Différents facteurs endogènes, sécrétions du tube digestif et produits des premiers micro-organismes colonisateurs du biotope, interfèrent également dans le processus de colonisation (Corthier, 2007). L'importance des variations inter- et intra-individuelles au cours de la première année de vie a été soulignée par Palmer *et al.* (2007) lors d'une étude moléculaire du microbiote réalisé sur 14 nouveau-nés. Dès la fin de la première année de vie, le microbiote de chaque bébé, bien que toujours distinct, converge vers le profil caractéristique du microbiote des adultes à savoir majoritairement composé de *Bacteroides* et de Firmicutes (Palmer *et al.*, 2007). Cette même étude montre que la colonisation du microbiote des bébés par des micro-organismes issus du lait maternel ou des sécrétions vaginales de la mère ne se fait que de manière occasionnelle et ponctuelle durant les premiers mois de vie. Ceci souligne le caractère opportuniste de cette colonisation qui ne serait possible que grâce au caractère permissif du tractus digestif des nouveau-nés. En résumé, la première année de vie se caractériserait par une variabilité très importante du microbiote, non seulement d'un individu à un autre mais aussi au cours du temps chez le même individu. Puis, après cette

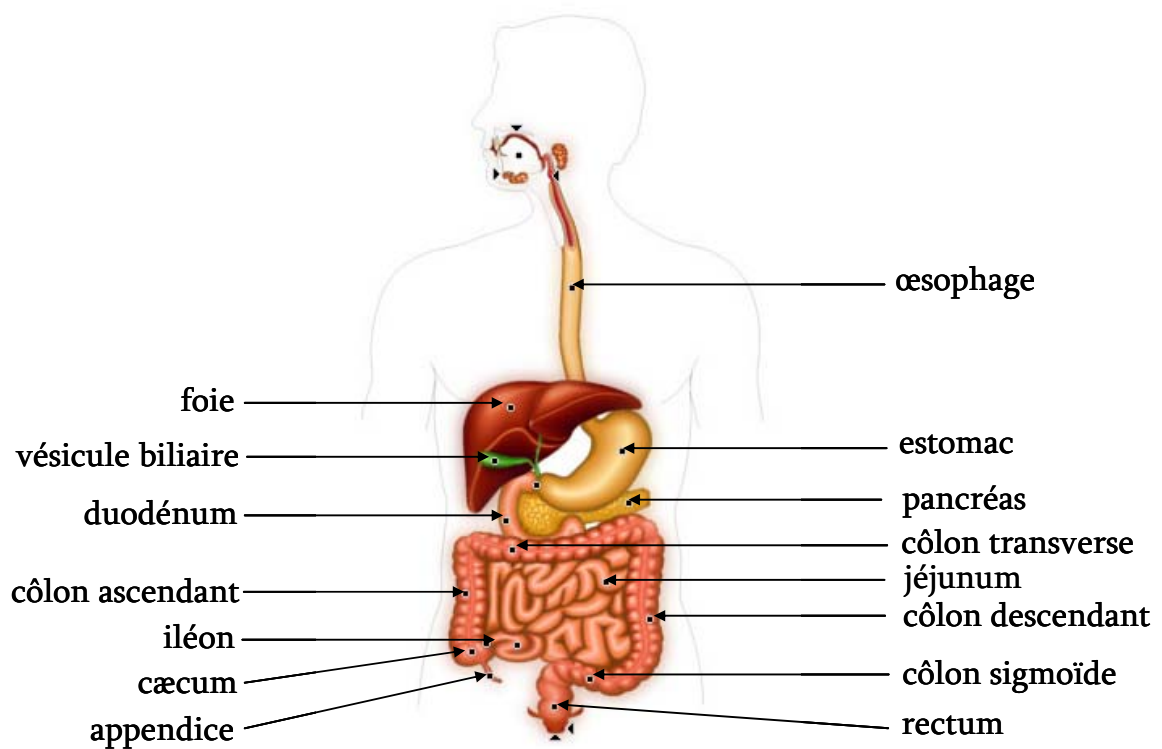


Figure 7. Anatomie du tractus gastro-intestinal de l'homme

Tableau 4. Dimension approximatives du tractus gastro-intestinal, temps de transit, pH et abondance du microbiote (D'après Justesen *et al.*, 1984 ; Moore et Holdman 1974 ; Fonty et Chaucheyras 2007 et Savage 1977)

Segment gastro-intestinal	Longueur cm	Temps de transit, h	pH	Abondance du microbiote (cellules/g)
Estomac	12	2-6	≈ 2	10 ⁰ -10 ⁴
Duodénum	25			10 ⁴ -10 ⁵
Jéjunum	160	3-5	6,5 à 7,5	10 ⁵ -10 ⁷
Iléon	215			10 ⁷ -10 ⁸
Cæcum	6		-	
Colon ascendant	10 - 15		5,4 à 5,9	
Colon transverse	50	60-70	6,2	10 ¹⁰ -10 ¹¹
Colon descendant	25		6,6 à 6,9	
Colon sigmoïde	40 -80		-	
rectum	18	1	-	10 ¹⁰ -10 ¹²

période de « chaos » il y aura une certaine stabilisation du microbiote (Palmer *et al.*, 2007). Il a notamment été montré, *via* la mesure de la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) chez 30 bébés, que le microbiote est stable dès l'âge de deux ans (Midtvedt & Midtvedt, 1992).

2.1.2. Diversité et distribution du microbiote gastro-intestinal de l'adulte

Chez l'adulte, la masse microbienne totale du tractus gastro-intestinal (GI) de l'homme est estimée à 1,5 kg (Xu & Gordon, 2003), ce qui représente à peu près 30 % du volume total du contenu intestinal (Moore & Holdman, 1974). Ce tube digestif est divisé en plusieurs segments présentant des conditions physicochimiques différentes qui conditionnent la diversité et l'abondance des micro-organismes le colonisant (Figure 7 et Tableau 4).

2.1.2.1. *Diversité et distribution longitudinale du microbiote gastro-intestinal*

L'estomac héberge très peu de bactéries endogènes car la plupart des micro-organismes ingérés ne résistent pas à l'acidité extrême (pH \approx 2) régnant au sein de l'estomac et sont détruits avant même d'atteindre le duodénum. Une étude sur la base de l'analyse des séquences d'ARNr 16S de 23 biopsies gastriques endoscopiques a cependant révélé la présence de 128 phylotypes bactériens différents (Bik *et al.*, 2006). Environ 70 % des phylotypes étaient constitués de séquences retrouvées dans la cavité orale. Des séquences correspondant à des phylotypes s'affiliant au phylum Deinococcobacteria, jusqu'alors uniquement connu pour coloniser des environnements extrêmes, ont également été retrouvées. *Helicobacter pylori* a été retrouvé chez 19 des 23 sujets.

Bien que les conditions soient moins extrêmes au sein de l'intestin grêle (pH variant de 6,5 à 7,5), ses premiers segments (duodénum et jéjunum) sont pauvres en bactéries. Le péristaltisme intestinal est particulièrement important à ce niveau puis diminue tout au long de l'intestin grêle. Ceci semble empêcher le maintien des bactéries en grand nombre. Ainsi, 10⁴ bactéries par mL sont retrouvées au niveau de la lumière dans le duodénum contre 10 000 fois

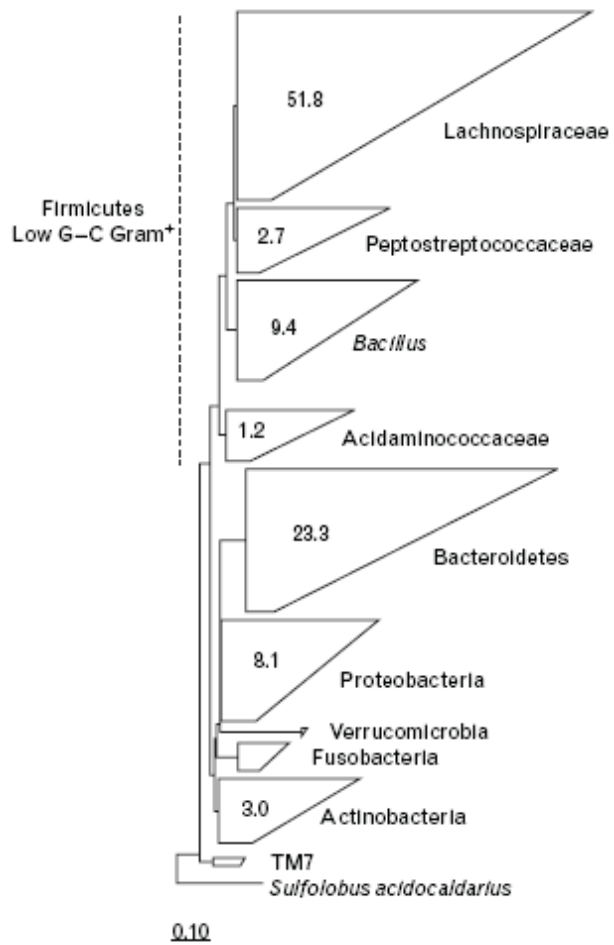


Figure 8. Distribution phylogénétique du microbiote intestinal (Frank *et al.*, 2008)

plus dans l'iléon ($\approx 10^8$ bactéries par mL, Tableau 4 p. 19). La plupart des micro-organismes retrouvés sont anaérobies facultatifs : entérobactéries et streptocoques. Enfin, au niveau de la partie terminale de l'intestin grêle, le potentiel d'oxydoréduction devient de plus en plus bas menant à une augmentation des populations anaérobies strictes (Hayashi *et al.*, 2005). La densité et la diversité du microbiote atteint son maximum dans le côlon et notamment le côlon distal où sont retrouvées approximativement 10^{12} bactéries par gramme de contenu (Savage, 1977). Ceci en fait l'écosystème le plus densément peuplé (Whitman *et al.*, 1998).

Si l'on considère le microbiote intestinal dans sa globalité, les approches par méthodes culturales ont mis en évidence de l'ordre de 400 à 500 espèces microbiennes et n'ont donné qu'une vision restreinte de la diversité du microbiote intestinal humain (Savage, 1977, Moore & Holdman, 1974). Ces dernières années, l'application des techniques moléculaires à l'analyse du microbiote intestinal, a modifié ces données. Trois études majeures utilisant un séquençage et une analyse de masse du gène codant pour l'ARNr 16S et réalisées à partir de biopsies prélevées au niveau de l'intestin grêle ou à partir de selles, ont permis l'analyse de la diversité du microbiote intestinal humain (Eckburg *et al.*, 2005, Ley *et al.*, 2005, Ley *et al.*, 2006, Frank *et al.*, 2007). Frank *et al.* (2007) ont réalisé l'analyse de l'ensemble des séquences bactériennes d'ARNr 16S, issues de ces trois études, à savoir plus de 45 000. Ceci leur a permis de montrer que le microbiote intestinal humain était constitué d'au moins 1 800 genres bactériens et d'environ 15 000 espèces, le tout en établissant les notions de genres et d'espèces bactériens à une identité de séquence supérieure ou égale à 90 % et à 97 % respectivement. Bien que le microbiote intestinal soit spécifique de chaque individu, il apparaît, d'après ces études que 98 % des phylotypes appartiennent à seulement quatre phyla bactériens : Firmicutes (64 %), Bacteroidetes (23 %), Proteobacteria (8 %) et Actinobacteria (3 %) (Figure 8, Frank *et al.*, 2007).

2.1.2.2. Distribution transversale du microbiote colique

Pour des raisons techniques, le microbiote colique a été majoritairement étudié à partir de selles. Or, même si une grande partie du microbiote est fixée aux particules alimentaires en transit, certaines espèces vivent à l'intérieur de la couche de mucus sécrétée par les cellules

épithéliales : des études moléculaires montrent que pour un individu donné, les profils bactériens de biopsies obtenus à différents niveaux coliques sont similaires entre eux, mais sont en revanche différents de ceux d'origine fécale (Zoetendal *et al.*, 2002, Lepage *et al.*, 2005). Ceci met en évidence une répartition transversale de la microflore colique. Le séquençage systématique du marqueur ribosomal 16S a été réalisé sur des banques d'ADN provenant de biopsies de différents sites coliques (cæcum, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde et rectum) de trois adultes sains (Eckburg *et al.*, 2005). Cette étude, réalisée sur un total de 13 355 séquences d'ADNr 16S, a révélé une remarquable constance dans les espèces microbiennes associées à la muqueuse colique, et ce, quelle que soit la localisation longitudinale. Ainsi, la paroi intestinale et la couche de mucus permettraient le maintien de conditions plus stables.

2.1.2.3. Particularités mises en évidence dans la composition du microbiote colique

Bien qu'il soit reconnu que le microbiote colique est majoritairement composé de bactéries, de l'ordre de 1 200 virus sont aussi retrouvés dans la matière fécale (Breitbart *et al.*, 2003). Ils n'ont aucune activité métabolique « *per se* », mais sont susceptibles d'altérer la composition du microbiote et, de ce fait, pourraient avoir une action indirecte sur cet écosystème. Les deux autres domaines du vivant sont également représentés par quelques espèces. Ainsi, le règne des Eucaryotes est de nature fongique, avec *Blastocystis* et d'autres levures telles que des *Candida* (Scanlan *et al.*, 2008). Celui des Archaea se limiterait à deux méthanogènes hydrogénotrophes, *Methanobrevibacter smithii* (Miller *et al.*, 1982, Miller & Wolin, 1982) et *Methanosphaera stadtmanae* (Miller & Wolin, 1985).



Figure 9. Observation microscopique de *Methanobrevibacter smithii* (Miller *et al.*, 1982)

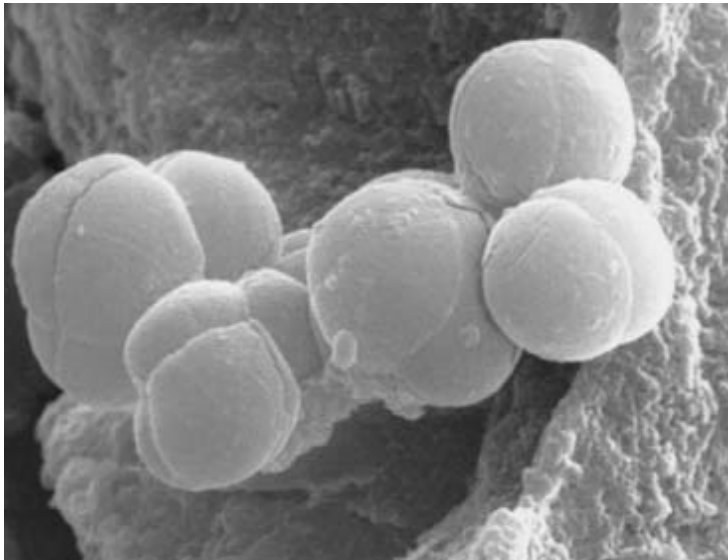


Figure 10. Observation microscopique de *Methanosphaera stadtmanae* (Miller & Wolin 1985)

2.2. Installation et diversité des Archaea méthanogènes dans le microbiote colique humain

2.2.1. Diversité et abondance chez l'adulte

Seules deux Archaea méthanogènes ont été caractérisées, par isolement et identification à partir d'échantillons de selles, comme colonisant le côlon humain : *Methanobrevibacter smithii* (Miller *et al.*, 1982, Miller & Wolin, 1982) et *Methanosphaera stadtmanae* (Miller & Wolin, 1985). Toutes deux sont hydrogénotrophes et font partie de l'ordre des *Methanobacteriales*.

- *M. smithii* (Figure 9), est un petit coccobacille le plus souvent retrouvé par paire, mais également sous forme de petites chaînes de cellules (Miller *et al.*, 1982). Il tire son énergie de la production de CH₄ par réduction du CO₂ par l'H₂ et peut également utiliser le formate comme accepteur final d'électrons (Miller *et al.*, 1982).

- *M. stadtmanae* (Figure 10), se présente sous la forme de coques larges, le plus souvent regroupées par paire ou en tétrade. Il utilise l'H₂ et le méthanol comme substrats (réduction du méthanol en CH₄ en présence de H₂) (Cf 1.2.3.2. p. 11). Son développement est de ce fait totalement dépendant du méthanol issu de l'hydrolyse des pectines par des espèces des genres *Bacteroides* et d'autres bactéries anaérobies (Miller & Wolin, 1985).

Les études culturales (Miller *et al.*, 1982, Miller & Wolin, 1985, Miller & Wolin, 1982) ont montré que *M. smithii* prédominait sur *M. stadtmanae*. Ont ainsi été retrouvées jusqu'à 10¹⁰ cellules par gramme de poids sec de selles, soit 12,6 % des anaérobies totaux dénombrés (Miller & Wolin, 1983). Diverses analyses moléculaires, telle que l'analyse exhaustive des séquences d'ADNr 16S menée par Eckburg *et al.* (2005), ont confirmé cette prédominance de *M. smithii*. Cette inégalité dans la prévalence et l'abondance peut s'expliquer par la dépendance de *M. stadtmanae* vis-à-vis du méthanol. L'analyse du génome de *M. stadtmanae* a notamment montré que ce dernier ne présente pas l'information génétique nécessaire à la synthèse de molybdoptérine, essentielle à la catalyse de la première étape de la méthanogenèse, à partir de l'H₂ et du CO₂ (Fricke *et al.*, 2006).

Récemment, Scanlan *et al.* (2008), en étudiant l'incidence et la diversité des Archaea méthanogènes chez des patients atteints de différentes pathologies gastro-intestinales, ont retrouvé une séquence *mcrA* rattachée à l'ordre des Methanosarcinales d'après leur analyse phylogénétique. Ceci suggère qu'une nouvelle espèce d'Archaea méthanogène colonise le tractus intestinal de l'homme.

Enfin, des séquences d'ADNr 16S présentant des similarités élevées ($\geq 97\%$) avec des séquences s'affiliant au groupe des *Sulfolobus* ont également été mises en évidence au sein du microbiote intestinal, suggérant la présence d'espèces appartenant au phylum des Crenarchaeota dans cet écosystème (Rieu-Lesme *et al.*, 2005). A notre connaissance, seule cette étude révèle la présence de Crenarchaeota chez l'homme, ce qui suggère soit que ces micro-organismes s'implantent rarement au sein de cet écosystème, soit qu'ils ne sont qu'en transit.

Depuis les travaux de Miller & Wolin (1986), on sait que la production de CH₄ peut être détectée dans les gaz expirés à une valeur supérieure ou égale à 2 ppm par rapport à l'air ambiant dès qu'une concentration seuil de 10⁸ méthanogènes par gramme de selles est présente. Ce type d'analyse permet de diviser la population en deux groupes : les méthano-excréteurs et les non-méthano-excréteurs. De telles études montrent que 35 à 50 % de la population adulte serait méthano-excrétrice (Conway de Macario & Macario, 2008), c'est-à-dire abriterait au moins 10⁸ méthanogènes par gramme de selles.

2.2.2. Installation et maintien du microbiote méthanogène

D'après des travaux de Palmer *et al.* (2007), il semblerait que les Archaea méthanogènes n'apparaissent que transitoirement au cours de la première année de vie. En effet, l'analyse par PCR quantitative (ciblant l'ADNr 16S par des amorces spécifiques du domaine Archaea) a montré que seuls 7 nouveau-nés sur 14 présentaient des Archaea méthanogènes, à des concentrations variant de 10³ à 10⁶ copies d'ADNr 16S par gramme de selles. De plus, sur les 30 échantillons prélevés au cours de la première année de vie de chaque nouveau-né, les Archaea méthanogènes n'ont été détectées que sur un seul échantillon pour 4 individus (sur les 7

présentant des Archaea méthanogènes) et uniquement chez un individu après 5 semaines de vie (Palmer *et al.*, 2007).

Selon le même ordre d'idée, l'étude de Rutili *et al.* (1996), menée sur un groupe enfants âgés de 3 mois à 5 ans, montre que l'apparition de la flore méthanogène ne se fait pas avant l'âge de 27 mois. De plus, le nombre d'enfants porteurs de méthanogènes augmente avec l'âge, avec une incidence de 40 % à 3 ans et de 60 % à 5 ans. Ainsi, ces résultats suggèrent que la prévalence d'individus présentant des Archaea méthanogènes augmente au cours des premières années de vie.

Des résultats similaires sont observés avec le statut de méthano-excrétion. Une étude menée sur des Nigériens par Hudson *et al.* (1993) a montré que la prévalence d'individus méthano-excréteurs augmente de la naissance à l'âge adulte. Celle-ci passe de 6 % chez les enfants de moins de 2 ans (n=68), à 40 % chez les enfants de 2 à 6 ans (n=47) puis à 77 % chez les adultes (n=159). Enfin, une étude moléculaire menée par Steward *et al.* (2006) sur des volontaires Néo-Zélandais va également dans le même sens : l'analyse quantitative du marqueur ADN_r 16S par PCR en temps réel a révélé que 25 % des enfants (3 mois à 10 ans) et 42 % des adultes (25 à 59 ans) renfermaient des Archaea méthanogènes au sein de leur tractus digestif.

A l'âge adulte, plusieurs études indiquent que la prévalence des méthano-excréteurs reste stable (Bond *et al.*, 1971, Levitt *et al.*, 2006).

2.2.3. Localisation

Les Archaea méthanogènes semblent être localisées majoritairement au niveau du côlon distal. Ceci a été mis en évidence en 1993 par Pochart *et al.* par utilisation de la technique de pyxigraphie. Cette technique, précédemment développée par Perrenoud (1957), consiste à faire avaler une capsule à un sujet, et à la suivre par radiographie. Une fois dans le côlon, l'ouverture de la capsule permet le prélèvement de l'échantillon. Pochart *et al.* (1993) ont ainsi comparé (par énumération culturale) les concentrations en méthanogènes (et en micro-organismes

anaérobies) du côlon proximal et celles du côlon distal (représentées par les selles), de 6 individus méthano-excréteurs et de 4 individus non-méthano-excréteurs. Ceci a révélé que la proportion moyenne de méthanogènes retrouvée chez les méthano-excréteurs était de 12 % des anaérobies dans les selles et de 0,003 % dans le côlon proximal. Aucune différence n'a été observée chez les non-méthano-excréteurs, pour lesquels des concentrations inférieures à 0,003 % ont été retrouvées quelle que soit la localisation.

Bien que menée sur un nombre restreint d'individus, cette étude laisse à penser que les méthanogènes sont préférentiellement retrouvés dans les parties basses du côlon : les parties transversale et distale du côlon possèdent un pH proche de la neutralité, un potentiel d'oxydoréduction favorable et un temps de transit élevé, ce qui en fait un site favorable à leur croissance (Cf 2.1.2. p. 19, Tableau 4).

2.3. Facteurs influençant le microbiote méthanogène intestinal humain

Il semble que la présence et la quantité de méthanogènes dans le microbiote intestinal varie d'un individu à l'autre. Différents facteurs pourraient influencer leur présence et leur maintien. Ici nous verrons comment l'environnement interne du côlon et notamment la disponibilité en sulfate, la présence de sels biliaires ainsi que le temps de transit sont susceptibles d'affecter les Archaea méthanogènes colonisant le côlon humain. Seront également présentés l'impact de l'âge et du sexe.

2.3.1. La disponibilité en sulfate

La flore hydrogénotrophe colique est constituée de micro-organismes méthanogènes, acétogènes et sulfato-réducteurs (SRB) et il est concevable que les facteurs favorisant les uns inhibent les autres en retour. En 1988, Gibson *et al.* ont retrouvé des quantités élevées de SRB (jusqu'à 10^{10} / g de selles) dans les selles d'individus dont l'excrétion de méthane dans l'air expiré était faible ou indétectable. Ils ont conclu que la réduction dissimilatrice du sulfate et la

méthanogenèse n'avaient pas lieu en même temps dans le côlon et qu'une compétition pour l'hydrogène devait avoir lieu (Gibson *et al.*, 1988). Par la suite, une étude a été menée par Christl *et al.* (1992) sur six individus méthano-excréteurs, nourris avec une alimentation pauvre en sulfate durant 34 jours, additionnée de sulfate de sodium (en quantité dix fois supérieure au régime témoin) entre J11 et J20. Durant cette période, une augmentation du dénombrement des sulfato-réducteurs, une diminution du dénombrement des Archaea méthanogènes ainsi qu'une baisse de l'excrétion de méthane ont été observées chez 3 volontaires sur 6. Les SRB n'étaient pas détectées durant la période de régime témoin mais sont devenues détectables après addition de sulfate. L'arrêt du régime riche en sulfate a entraîné un retour de l'ensemble de ces valeurs à leur niveau initial. Chez les trois autres volontaires de l'étude, aucun de ces changements n'a été observé. Il a été conclu que les Archaea méthanogènes et la méthanogenèse sont régulés par le sulfate alimentaire lorsque les SRB sont présentes (Christl *et al.*, 1992). Cependant, d'après plusieurs études, les micro-organismes sulfato-réducteurs et méthanogènes peuvent coexister à des niveaux élevés au sein de l'écosystème colique et ceci serait dû à la versatilité métabolique des sulfato-réducteurs (Pochart *et al.*, 1992, Stewart *et al.*, 2006).

2.3.2. Les acides biliaires

Florin et Woods (1995), ont montré que l'addition de bile à des cultures de selles de quatre individus méthano-excréteurs inhibait de manière dose dépendante la méthanogenèse. Cette bile, issue de trois patients cholécystomisés, était utilisée à des concentrations de 0,3 – 3,0 – 10 et 30 %, ce qui correspond respectivement à des concentrations en acides biliaires de 0,04 – 0,43 – 1,4 et 4,3 mM. Une inhibition de la méthanogenèse a été observée pour l'ensemble de ces doses et a atteint son maximum dès 1,4 mM. Sachant que les concentrations *in vivo* des effluents iléaux en sels biliaires sont de l'ordre de 1 mM, ces résultats présument d'un impact *in vivo* des sels biliaires sur la méthanogenèse.

Dans cette même étude, un test de méthano-excrétion a été réalisé chez un quatrième patient choledochostomisé, immédiatement avant la réversion de la choledochostomie (qui a

duré 20 jours), et à 4, 24 et 40 semaines après la correction de la fistule biliaire. Les résultats de méthano-excrétion ont été respectivement de 79, 29, 1 et 1 ppm au dessus des valeurs atmosphériques. Après seulement trois mois, le patient est donc passé d'un statut d'individu hautement méthano-excréteur à un statut de non-méthano-excréteur (Florin & Woods, 1995). L'ensemble des données fournies par cette étude supporte l'hypothèse d'un effet inhibiteur des sels biliaires sur la méthanogenèse.

2.3.3. Le temps de transit

Les Archaea méthanogènes sont des micro-organismes ayant une croissance lente et un temps de transit long pourrait faciliter leur croissance (Mah *et al.*, 1977). Les données concernant le temps de transit et le statut de méthano-production sont conflictuelles. Stephen *et al.* (1986) ont observé un temps de transit plus long chez les méthano-excréteurs en comparaison avec les non-méthano-excréteurs. L'impact du temps de transit sur la flore méthanogène a été confirmé récemment par (Lewis & Cochrane, 2007). Cependant cette différence n'a pas été observée au cours d'autres études (McKay *et al.*, 1981, Melcher *et al.*, 1991). De plus, les noirs africains d'origine rurale ont des temps de transit plus court que les caucasiens et pourtant présentent une prévalence de méthano-excréteurs supérieure (Segal *et al.*, 1988), ce qui indique que le temps de transit n'est pas le seul facteur impliqué.

2.3.4. l'âge

Comme nous l'avons précédemment décrit, l'implantation et le maintien des méthanogènes s'opère graduellement dans les premières années de vie, pour atteindre une prévalence maximale chez les adultes.

Le vieillissement est associé à de nombreuses modifications physiologiques affectant plus ou moins directement le microbiote intestinal. Une diminution des perceptions olfactives et

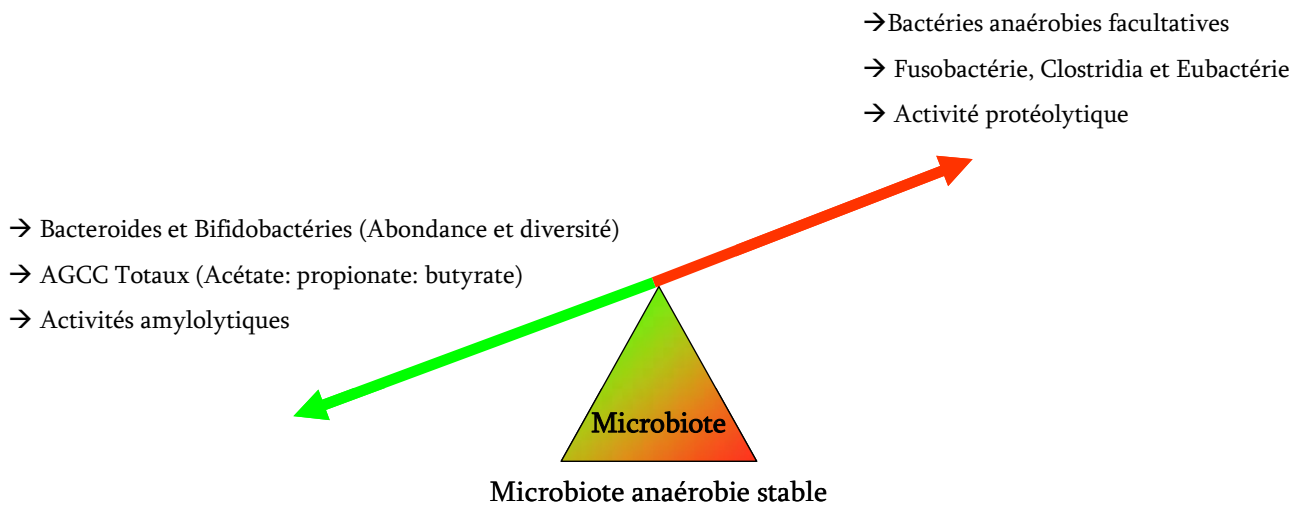


Figure 11. Impact de l'âge sur le microbiote intestinal humain (Adapté de Woodmansey 2007)

gustatives (Weiffenbach *et al.*, 1982, Doty *et al.*, 1984) ainsi que des problèmes de mastication (Karlsson *et al.*, 1991, Newton *et al.*, 1993) sont susceptibles d'entraîner une diminution et un déséquilibre de l'alimentation. Le vieillissement est également associé à une augmentation du temps de transit intestinal (Woodmansey *et al.*, 2004) ainsi qu'à des modifications du système immunitaire (Schiffrin *et al.*, 2009). Ces modifications du régime alimentaire, des fonctions du tractus digestif, des fonctions immunitaires, etc..., sont susceptibles d'entraîner des changements dans la composition du microbiote. Ce dernier pourrait en retour avoir un impact sur les différentes fonctions physiologiques de l'hôte.

Alors que plusieurs études se sont intéressées à l'impact de l'âge sur le microbiote bactérien humain (les résultats de ces études sont synthétisés dans la Figure 11), il n'y a à notre connaissance que deux études relatant l'impact de l'âge sur la microflore méthanogène. L'une d'entre elles, menée par Fernandes *et al.* (1998), a montré que les 66 méthano-excréteurs inclus dans l'étude étaient significativement plus âgés que les 63 non-méthano-excréteurs ($49,5 \pm 16,0$ versus $39,6 \pm 17,0$ ans, $p = 0,0009$). La deuxième, menée par Maczulak *et al.* (1989), montre que l'abondance en méthanogène augmente de plus d'un log entre le rat adulte (30 semaines) et le rat âgé (80 semaines). Ces résultats suggèrent que l'abondance des méthanogènes augmenterait au cours du vieillissement.

2.3.5. Le sexe

L'influence du sexe est controversée. Alors que de nombreuses études montrent qu'un pourcentage plus élevé de femmes seraient méthano-excrétrices (Pitt *et al.*, 1980, Hoff *et al.*, 1986, Segal *et al.*, 1988), d'autres n'indiquent aucune différence significative entre hommes et femmes (Pique *et al.*, 1984, Bond *et al.*, 1971, McKay *et al.*, 1985, Levitt *et al.*, 2006). Aucune conclusion définitive ne peut donc être donnée quant à une éventuelle relation entre le statut méthano-excréteur et le sexe des individus.

Le tractus digestif est colonisé par un ensemble de micro-organismes dont la densité et la diversité atteignent leur maximum au niveau du côlon. Dans ce dernier, de l'ordre de 10^{11} à 10^{12} micro-organismes très largement représentés par des bactéries, sont retrouvées par gramme de contenu. La diversité est supérieure à 15 000 phylotypes différents, sur une base de similarité de séquences ADN 16S inférieure à 97 %. On retrouve également des Archaea méthanogènes, représentées par deux Methanobacteriales : *M. smithii* et *M. stadtmanae*. Le statut méthano-excréteur scinde la population en deux groupes : les méthano-excréteurs et les non-méthano-excréteurs. De nombreuses études visant à déterminer les facteurs susceptibles d'affecter le microbiote méthanogène ont été menées et montrent de manière contrastée le rôle de l'origine ethnique des individus, de leur sexe, de leur âge, de leur alimentation, ou bien encore des sels biliaires, dans la prévalence et la quantité de méthanogènes au sein des populations. Il semble légitime de s'interroger sur le rôle des Archaea méthanogènes au sein du côlon, et leur implication potentielle dans la physiologie et la santé de leur hôte, objet du prochain chapitre.

Chapitre 3 : Pathologies, microbiote intestinal et Archaea méthanogènes

3.1. Aperçu de l'influence du microbiote sur la physiologie de l'hôte

Le microbiote intestinal est en interaction constante avec l'hôte et exerce de nombreuses fonctions physiologiques, pour la plupart bénéfiques à l'hôte. Le dialogue permanent entre les micro-organismes colonisant le tractus intestinal et les cellules de l'hôte met en jeu des systèmes de communications complexes, certains impliquant des récepteurs transmembranaires (tels que les récepteurs « Toll-like », TLR) et intracellulaires (tels que les récepteurs « NOD-like », NLR) auxquels se lient différentes macromolécules provenant du microbiote (lipopolysaccharides, flagelline, peptidoglycane, acides gras à chaîne courte (AGCC)...). Ci-dessous seront traités les principaux impacts positifs du microbiote sur la physiologie de l'hôte, sans analyser le mécanisme de ces réactions ; ceci concerne notamment la nutrition de l'hôte, le développement et la maturation du système immunitaire intestinal ainsi que la croissance et la survie des cellules épithéliales.

3.1.1. Rôle nutritionnel bénéfique

Environ 100 g de substrats exogènes, provenant de l'alimentation mais n'ayant pas été digérés/absorbés sont disponibles à la conversion microbienne chaque jour (Cummings & Macfarlane, 1997) : il s'agit de polysaccharides complexes, de protéines, de lipides, d'acides nucléiques et d'autres polymères. A ceux-ci s'ajoutent des sécrétions endogènes telles que les mucopolysaccharides (glycoprotéines retrouvées dans le mucus), les enzymes digestives et les débris cellulaires, eux-mêmes également utilisés par le microbiote. Au total, la conversion de ces résidus alimentaires et de ces substrats endogènes aboutit à une centaine de composés volatiles, issus du métabolisme microbien (Geypens *et al.*, 1997), mais seule une fraction de ces conversions a été étudiée en détail.

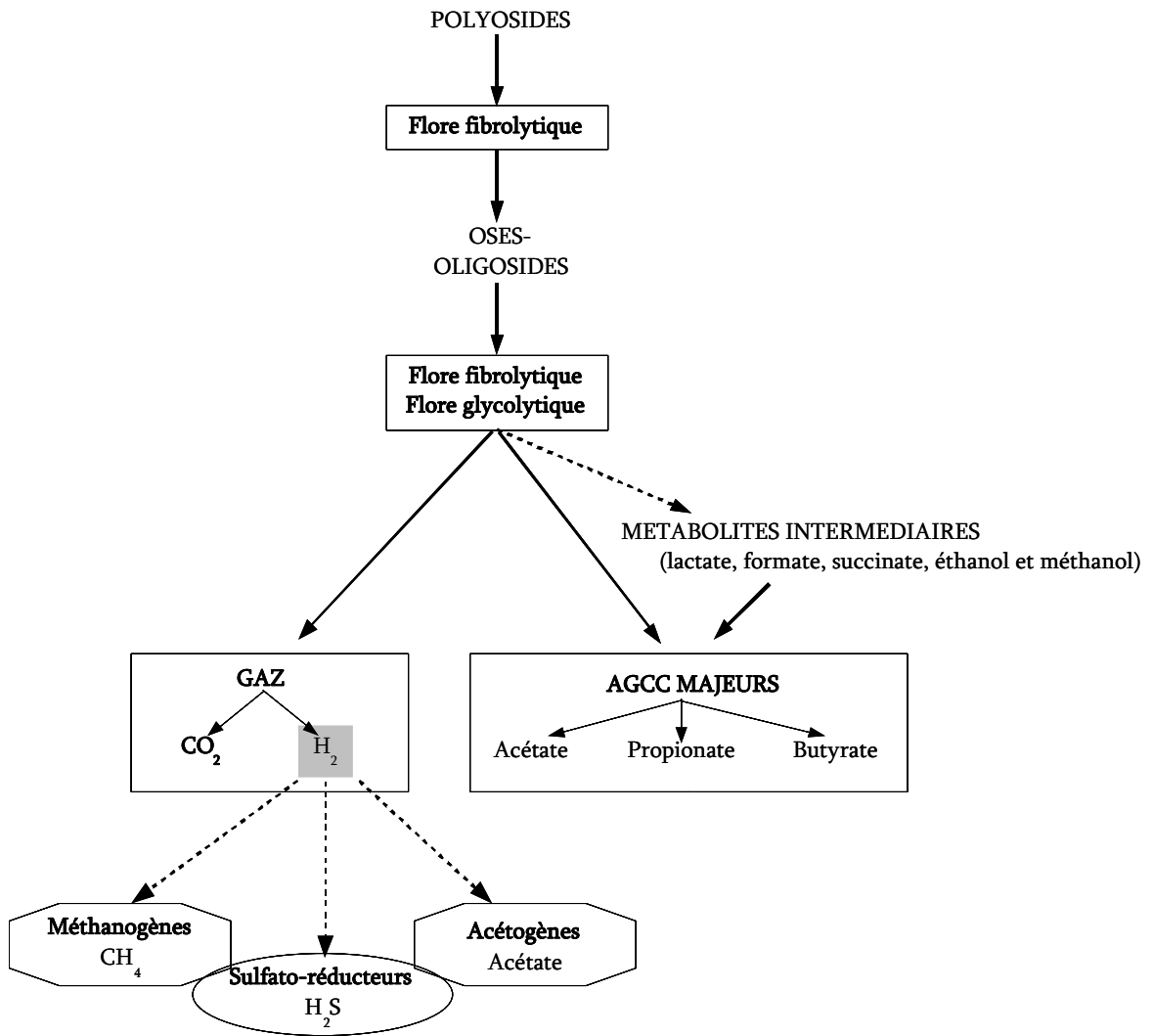


Figure 12. Chaîne trophique de dégradation et de fermentation des polysaccharides au sein du côlon humain (Adaptée de Gérard et Bernalier-Donadille, 2007)

Parmi les produits du métabolisme microbien, les AGCC sont à l'origine d'effets globalement bénéfiques à l'hôte et forment les métabolites microbiens fermentaires principaux. Les AGCC sont pour l'essentiel issus de la digestion des polysaccharides complexes, dits glucides fermentescibles, dont la quantité totale qui parvient au côlon varie de 10 g à 60 g par jour en fonction du régime alimentaire (Cummings & Macfarlane, 1991). Le génome humain ne possède pas le répertoire de gènes codant les activités enzymatiques nécessaires à la digestion de ces polysaccharides (Gérard & Bernalier-Donadille, 2007). Dans le côlon, la dégradation de ces polysaccharides n'est rendue possible que par la contribution de différents groupes microbiens, possédant des activités métaboliques complémentaires et formant ainsi une chaîne trophique de dégradation et de fermentation des polysaccharides (Figure 12) : dans un premier temps, la dégradation des polymères en oses et oligosides est effectuée par des bactéries hydrolytiques, avant que ces composés ne soient utilisés par la flore fermentaire, amenant à la production de métabolites tels que des AGCC (principalement de l'acétate, du propionate et du butyrate, dans un rapport 3/1/1), d'autres acides organiques tels que le lactate, le formate et le succinate, des alcools (éthanol et méthanol principalement) et des gaz (H₂ et CO₂). Le maintien d'une pression partielle basse en H₂ est nécessaire au bon déroulement des fermentations, ce qui est rendu possible grâce à l'activité de trois groupes fonctionnels du microbiote intestinal, les hydrogénotrophes méthanogènes, sulfato-réducteurs et acétogènes (Rambaud *et al.*, 2004).

Les AGCC sont une source d'énergie importante pour l'épithélium colique ainsi que pour l'hôte. Le butyrate est considéré comme le plus important en raison de son rôle bénéfique pour l'hôte. En effet, bien que produit dans la proportion de 1 pour 3 acétates, il est considéré comme le plus important d'un point de vue qualitatif, car il fournit environ 60 % de l'énergie nécessaire aux cellules épithéliales coliques (Cummings & Macfarlane, 1997). Il possède également un impact fonctionnel positif pour l'hôte, puisqu'il inhiberait l'inflammation et la carcinogénèse, renforcerait l'effet barrière et diminuerait le stress oxydatif (Hamer *et al.*, 2008).

Le microbiote est connu comme source d'acides aminés pour l'hôte. Il possède également un rôle dans l'homéostasie de certains acides aminés essentiels pour l'hôte, *via* leur synthèse *de novo* : ainsi, l'administration d'azote marqué (¹⁵N) entraîne l'augmentation de lysine et de

thréonine marquées dans les fluides corporels ainsi que dans les protéines corporelles de l'homme (Metges *et al.*, 1999). Il peut également réaliser la synthèse d'acides aminés à partir de différents précurseurs, tels que l'azote de source alimentaire, l'urée synthétisée par le foie et d'autres acides aminés de sources endogène et exogène. De ce fait, la contribution quantitative de la synthèse d'acides aminés essentiels par le microbiote à l'homéostasie de l'hôte reste inconnue.

3.1.2. Développement et maturation du système immunitaire intestinal

La muqueuse intestinale, avec une surface de plus de 300 m², est en permanence exposée à une quantité très importante de corps exogènes étrangers (d'origine alimentaire et bactérienne) qu'elle doit tolérer (Madara *et al.*, 1990). En parallèle, la muqueuse doit lutter contre les entéropathogènes viraux, bactériens ou parasitaires. Ainsi, le système immunitaire intestinal (SII) tient deux rôles paradoxaux, d'une part élaborer une réponse cellulaire et humorale adaptée lorsqu'il y a danger, et d'autre part, élaborer des réponses suppressives à même d'empêcher l'induction de réponses immunitaires envers les antigènes alimentaires ou du microbiote commensal.

Ainsi, face à un pathogène, la réponse humorale s'effectue *via* la sécrétion dans la lumière intestinale d'IgA sécrétoires (spécifiques de la muqueuse intestinale), formant des complexes-immuns avec l'antigène, et ainsi inactivant des mécanismes de pathogénicité (adhésion des bactéries pathogènes, multiplication virale dans l'entérocyte, activités biologiques des entérotoxines,...). Quant à la réponse cellulaire, elle ferait essentiellement intervenir les lymphocytes intra-épithéliaux, essentiels au maintien de l'intégrité épithéliale par leur rôle de destruction des cellules infectées et anormales (Rambaud *et al.*, 2004). Au contraire, pour l'acceptation des corps exogènes, microbes et aliments, une « tolérance orale » fait que l'ingestion d'une protéine conduit à la suppression des réponses immunes cellulaires et humorales spécifiques de la protéine ingérée, au niveau intestinal et périphérique, lors d'une réexposition à celle-ci (Rambaud *et al.*, 2004).

Les études comparant les animaux dépourvus de microbiote (animaux axéniques) et leurs homologues élevés classiquement en animalerie (animaux conventionnels) révèlent que le microbiote joue un rôle primordial dans le développement et la maturation du SII. Chez les animaux axéniques, on observe un large déficit de développement du tissu lymphoïde associé au tube digestif (Macpherson & Harris, 2004, Falk *et al.*, 1998). Celui-ci se caractérise par une baisse de la production d'anticorps, et notamment d'IgA (Moreau *et al.*, 1978), et par une hypoplasie des Plaques de Peyer (Macpherson & Harris, 2004). Une étude récente a également mis en évidence une baisse du développement et de la maturation des follicules lymphoïdes isolés (Bouskra *et al.*, 2008). Les anomalies observées chez les animaux axéniques ne sont pas réduites à l'épithélium intestinal puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées (Macpherson & Harris, 2004). Notons que le simple fait de ré-inoculer un microbiote permet le rétablissement de l'ensemble de ces anomalies en quelques semaines.

3.1.3. Effet du microbiote sur la fonction des cellules épithéliales, leur croissance et leur survie

L'épithélium intestinal constitue l'interface majeure entre l'hôte et son environnement. Des études menées à l'aide de souris gnotobiotiques (souris axéniques auxquelles ont été inoculés un ou plusieurs micro-organismes) ont montré que le microbiote influence le métabolisme, la prolifération et la survie des cellules épithéliales ainsi que la fonction de barrière (Hooper *et al.*, 2001, Ismail & Hooper, 2005). Les souris axéniques présentent à l'inverse une atrophie des cryptes, ce qui met en évidence un ralentissement du renouvellement cellulaire de l'épithélium colique en l'absence de microbiote (Alam *et al.*, 1994). Elles présentent également des réseaux sanguins deux fois moins denses au niveau des villosités intestinales par rapport aux souris conventionnelles, ce qui souligne l'impact positif du microbiote sur l'angiogenèse (Stappenbeck *et al.*, 2002). Notons également que l'angiogenèse peut être restaurée chez les souris axéniques par l'inoculation d'une seule espèce de micro-organisme, une bactérie commensale prédominante du tube digestif : *Bacteroides thetaiotaomicron* (Hooper *et al.*, 2001).

3.2. Implication du microbiote dans des pathologies d'origine digestive

Bien que majoritairement bénéfique à l'hôte, le microbiote est également impliqué dans la genèse, le maintien et parfois l'aggravation de certaines pathologies. Certaines d'entre elles impliquent véritablement ou potentiellement le microbiote méthanogène, comme l'obésité, les atteintes digestives tels que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), le syndrome de l'intestin irritable (SII) et le cancer du côlon. Ceci ne signifie pas que le microbiote méthanogène soit la cause de la pathologie observée, ce qui à notre connaissance n'a été démontré dans aucune pathologie humaine. Néanmoins, la présence de méthanogènes du genre *Methanobrevibacter* (ordre 1 – hydrogénotrophe) a été associée aux pathologies périodontiques et parodontiques (Kulik *et al.*, 2001, Belay *et al.*, 1988, Lepp *et al.*, 2004), ainsi qu'avec les vaginoses (Belay *et al.*, 1990).

3.2.1. Obésité

L'obésité a vu son incidence augmenter de manière considérable durant ces dernières années. Sa genèse et son développement est un processus complexe dans lequel interviennent des facteurs génétiques et environnementaux et dans lequel le rôle du microbiote a fait l'objet de plusieurs travaux. Ainsi, des études menées chez des souris axéniques *versus* des souris conventionnelles, nourries *ad libitum*, a permis de caractériser l'impact du microbiote sur l'adiposité de l'hôte : les souris axéniques présentent en effet 42 % de masse grasse en moins que les souris conventionnelles (Backhed *et al.*, 2004). Une colonisation de ces mêmes souris axéniques par un microbiote intestinal (issu des souris conventionnalisées) aboutit à une augmentation de 60 % de la masse grasse et à l'émergence d'une insulino-résistance en deux semaines, même en réduisant la prise alimentaire de 30 % (Backhed *et al.*, 2004).

Très récemment, le rôle du microbiote a été caractérisé plus en détail, notamment en utilisant des modèles animaux d'obésité, tel celui induit par manipulation génétique (souris *ob/ob*, déficiente en leptine). Dans ce cas, une altération de la composition du microbiote intestinal est mise en évidence chez ces animaux, avec une baisse de 50 % de la quantité de

Bacteroidetes et une augmentation proportionnelle des Firmicutes (Ley *et al.*, 2005), à la fois par rapport au microbiote des souris *ob/+* et *+/+* (Ley *et al.*, 2005). En mettant en parallèle des approches métagénomiques et biochimiques, il a été montré que cette variation relative des Bacteroidetes et des Firmicutes était associée à une augmentation de la capacité du microbiome à soutirer de l'énergie à partir de l'alimentation (Turnbaugh *et al.*, 2006).

Les interrelations entre l'alimentation, l'écologie microbienne intestinale et l'homéostasie énergétique ont récemment été étudiées sur des modèles de souris dont l'obésité avait été induite par un régime riche en sucre et en graisse (Turnbaugh *et al.*, 2008). Une abondance relative inférieure en Bacteroidetes et supérieure en Firmicutes a également été observée chez ces animaux en comparaison avec des animaux minces recevant une alimentation riche en sucre et pauvre en graisse. Cependant, à la différence des souris génétiquement obèses *ob/ob*, la diversité du microbiote des animaux dont l'obésité est induite par l'alimentation est réduite de manière considérable, du fait de la progression dans l'abondance d'une seule et unique classe de Firmicutes (les Mollicutes) qui possèdent une capacité supérieure pour la libération d'énergie à partir de l'alimentation (Turnbaugh *et al.*, 2008).

On peut également noter que la transplantation du microbiote d'une souris dont l'obésité a été induite par une alimentation riche en sucre et en graisse, ou également la transplantation du microbiote d'une souris *ob/ob* à une souris axénique, induisent une prise de poids équivalente ou supérieure à celle de la transplantation du microbiote d'une souris mince. (Turnbaugh *et al.*, 2008).

La variation dans la nature du microbiote permet ainsi d'établir une relation de cause à effet avec l'obésité par son impact sur l'extraction d'énergie et des mécanismes complémentaires ont également été décrits. L'un d'entre eux implique le facteur Fiaf (Fasting-Induced Adipose Factor), un inhibiteur des lipoprotéines lipases produit par l'intestin, le foie et le tissu adipeux. Des souris axéniques rendues conventionnelles perdent l'expression intestinale de ce facteur, conduisant à une augmentation de l'activité lipoprotéine lipase, et par la suite une augmentation du stockage des triglycérides dans les adipocytes (Backhed *et al.*, 2004). Plus récemment, Backed *et al.* (2007) ont décrit un mécanisme complémentaire : le maintien du phénotype mince chez

les souris axéniques soumises à un régime alimentaire riche en graisse et en sucre implique un taux élevé du facteur Fiaf induisant le Pgc-1 α (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α), et une activité élevée de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), qui conduisent tous deux à l'augmentation de l'oxydation des acides gras (Backhed *et al.*, 2007).

Des résultats similaires concernant la composition du microbiote, notamment concernant le rapport Bacteroidetes / Firmicutes, ont été retrouvés chez l'homme (Ley *et al.*, 2006). Bien que cela ne soit pas démontré pour l'heure actuelle, il est probable que les mécanismes décrits ci-dessus soient potentiellement à l'œuvre également. Il faut toutefois noter qu'une étude récente montre l'absence de différence dans la proportion de Bacteroidetes entre sujets obèses et sujets non-obèses, et l'absence de changement dans le pourcentage de Bacteroidetes chez les obèses soumis à un régime hypocalorique (Duncan *et al.*, 2008).

3.2.2. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

Le terme de MICI est une appellation générale désignant un ensemble de lésions inflammatoires chroniques, d'étiologie inconnue, atteignant le tractus digestif. Ces affections sont récidivantes, se cantonnent à certains segments du tube digestif avec des manifestations cliniques variées et souvent une évolution chronique peu prévisible. Ce terme recouvre notamment les colites ulcéreuses et la maladie de Crohn. Ces lésions inflammatoires sont la conséquence d'une activation du système immunitaire intestinal, pour laquelle les facteurs environnementaux (mode de vie, micro-organismes intestinaux, virus) et génétiques (prédisposition) commencent à être mieux connus (Macfarlane *et al.*, 2009).

Comme nous l'avons vu précédemment (Cf 3.1.2. p. 32 et 3.1.3. p. 33), le microbiote intestinal possède un rôle dans la promotion de l'homéostasie immune et dans la modulation du développement intestinal. Une altération de la composition du microbiote, conduisant à une modification des antigènes dominants ou de ses fonctions métaboliques est depuis longtemps suspectée dans l'étiologie des MICI. Une étude récente a notamment montré que le microbiote intestinal des patients atteints de ces maladies diffère de celui des témoins en bonne santé. En

effet, les Firmicutes et les Bacteroidetes sont moins représentés chez les patients atteints de MICI par comparaison avec les contrôles (n=129, Frank *et al.*, 2007). De plus il a été en évidence que des quantités plus faibles de micro-organismes appartenant au groupe des *Clostridium* (cluster IV et XIV) étaient présentes chez un sous groupe d'individus atteints de MICI. Cette dysbiose a été corrélée avec une augmentation de l'occurrence des abcès et des chirurgies plus précoces. En tout état de cause, le microbiote pourrait donc être utilisé comme biomarqueur de certaines formes agressives de MICI (Frank *et al.*, 2007)

Concernant les bactéries pathogènes, des *Escherichia coli*, dénommées AIEC pour Adherent-Invasive *E. coli*, ont été identifiées comme facteur intervenant dans l'étiologie de la maladie de Crohn. Les AIEC sont retrouvées associées à la muqueuse iléale de manière spécifique chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004) et possèdent la capacité de survivre et de se répliquer au sein des macrophages sans induire la mort cellulaire des cellules de l'hôte (Glasser *et al.*, 2001).

3.2.3. Syndrome de l'intestin irritable (SII)

Le SII est un désordre gastro-intestinal chronique, caractérisé par des douleurs abdominales, des dysfonctionnements intestinaux (tels que la constipation) et des ballonnements (Agrawal & Whorwell, 2006). Dans les pays occidentaux, environ 15 % de la population est touchée par ce syndrome, avec une atteinte plus fréquente chez les femmes (Drossman *et al.*, 1997). Parmi de nombreuses études, une étude menée chez 6 patientes se plaignant de ballonnements a montré qu'elles présentaient une production de gaz supérieure à la normale avec un régime standardisé, et donc que ces symptômes pouvaient être reliés à une anomalie du microbiote aboutissant à une production anormale de gaz (King *et al.*, 1998).

3.2.4. Cancer colorectal (CCR)

Le côlon est le troisième site le plus fréquent de cancer dans les pays occidentaux et la deuxième cause de mortalité aux Etats-Unis (McGarr *et al.*, 2005) et en Europe (Boyle & Ferlay, 2005). En plus des facteurs génétiques, les habitudes alimentaires semblent jouer un rôle significatif dans la genèse du cancer du côlon : l'augmentation de la prévalence chez les afro-américains par rapport aux africains natifs (O'Keefe *et al.*, 1999) montre clairement l'impact délétère d'une alimentation de type occidentale, dans laquelle l'apport d'énergie et de matière grasse est excessif (Pan & DesMeules, 2009). Par exemple, une alimentation riche en graisse entraîne une augmentation de la production d'acides biliaires primaires, notamment d'acide cholique. Ce dernier est majoritairement réabsorbé mais une fraction atteint le côlon (Reddy, 1981). Il pourra alors y être transformé *via* une 7 α -hydroxylase bactérienne en acide déoxycholique, produit reconnu comme carcinogène (Nagengast *et al.*, 1995) et pour lequel des taux fécaux et plasmatiques élevés ont été retrouvés chez les patients atteints de cancer du côlon (Hori *et al.*, 1998).

De plus, certaines activités enzymatiques du microbiote (β -glucuronidase et nitroréductase) peuvent entraîner l'activation (Ball *et al.*, 1991) ou la synthèse (Van Tassel *et al.*, 1982) de molécules carcinogènes, telles que les fecapentènes (FP-12 et FP-14) dans les feces, qui résultent majoritairement de l'activité de *Bacteroides*. Ainsi, certaines activités enzymatiques du microbiote participent à l'étiologie du cancer du côlon.

Une alimentation riche en viande est également reconnue comme facteur de risque dans le cancer colorectal. Celle-ci peut notamment mener à une production importante d'hydrogène sulfuré (H₂S) par la flore sulfato-réductrice (Gibson *et al.*, 1993). Celui-ci active alors la synthèse de radicaux libres (Attene-Ramos *et al.*, 2006) et inhibe l'utilisation du butyrate par les colonocytes (Roediger *et al.*, 1993).

3.3. Hypothèse d'une participation ou d'une implication des Archaea méthanogènes

Si le microbiote est directement impliqué dans des pathologies d'origine digestive, il est légitime de s'interroger sur une participation éventuelle des Archaea méthanogènes, notamment parce que leur abondance est variable selon la population considérée. Un rôle plausible pourrait être dû au méthane lui-même : plusieurs études ont en effet montré que ce gaz inhibait le péristaltisme intestinal (Pimentel *et al.*, 2004). De telles observations suggèrent que le muscle colique posséderait des récepteurs spécifiques. Si cela était confirmé, le méthane rejoindrait l'oxyde nitrique (NO), le monoxyde de carbone (CO, Farrugia *et al.* 2003), et le sulfure d'hydrogène (H₂S, Patacchini *et al.*, 2005) comme composé volatil servant de neurotransmetteur. Il pourrait alors jouer un rôle dans le temps de transit, facteur couramment impliqué dans de nombreuses pathologies digestives.

Implication des Archaea méthanogènes dans l'obésité

Dans l'obésité, les Archaea méthanogènes sont retrouvées en plus grande abondance chez les souris *ob/ob* (Turnbaugh *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009). Rappelons que chez l'homme, *M. smithii* colonise le côlon humain, parfois à des concentrations substantielles (allant jusqu'à 10¹⁰ cellules par gramme de poids sec de selles) et utilise comme source de substrat l'H₂ et le CO₂ et dans une moindre mesure, le formate. Il est donc légitime de s'interroger sur le fait qu'elle facilite / active la croissance et/ou l'activité des bactéries responsables de la digestion des sucres complexes (génératrice de ses substrats H₂ et CO₂). Afin de répondre à cette question, Samuel et Gordon (2006) ont comparé des souris axéniques, colonisées selon différentes combinaisons avec une bactérie consommatrice de polysaccharides (*Bacteroides thetaiotaomicron*) en association avec une bactérie sulfato-réductrice reconnue comme prédominante dans le côlon humain (*Desulfovibrio piger*) (Eckburg *et al.*, 2005) ou *M. smithii*. Ces animaux ont été nourris *ad libitum* avec une alimentation riche en polysaccharides. La co-colonisation de *M. smithii* avec *B. thetaiotaomicron*, oriente le métabolisme de ce dernier vers la production d'acétate et de formate (ce dernier étant réutilisé par *M. smithii*) à partir des fructanes alimentaires. De plus, une augmentation de la lipogenèse et de l'adiposité est observée chez ces animaux co-colonisés

par ces deux micro-organismes. En comparaison, aucun de ces effets n'est observé lors d'une colonisation de ces souris par *B. thetaiotaomicron* et *D. piger*, ce qui met en évidence un rôle possible de *M. smithii* dans le développement de l'obésité.

Implication des Archaea méthanogènes dans les SII et les MICI

Des résultats plus nuancés ressortent d'une éventuelle participation des méthanogènes dans les MICI et les SII : ainsi, Pimentel *et al.* (2003) ont mesuré la prévalence des individus méthano-excréteurs chez un large groupe de patients atteints de SII et de MICI. Si, dans cette étude, la production de méthane est fortement corrélée avec les patient SII présentant une constipation, les patients atteints de la maladie de Crohn ou des colites ulcératives (deux MICI) présentent une prévalence de méthano-excréteurs très basse, confirmant une observation de McKay *et al.* (1985). L'étude menée par Scanlan *et al.* (2008) vient également confirmer ces données, avec une proportion d'individus *mcrA* positif de 30 % chez les patients atteints de la maladie de Crohn (n=27) et de 24 % chez ceux atteints de colites ulcéreuses (n=29), c'est-à-dire plus faible que dans la population témoin (48 %, n=44).

Implication des Archaea méthanogènes dans le CCR

Une association entre microbiote méthanogène et cancer du côlon a été étudiée avec beaucoup d'intérêt depuis l'étude de Haines *et al.* (1977) qui montrait que la prévalence des individus méthano-excréteurs était supérieure chez les personnes présentant un cancer du côlon (84 %) que chez les sujets contrôle (40 %). Cependant, alors que Pique *et al.* (1984) retrouvèrent des résultats similaires, les études qui suivirent, et notamment celles de Hoff *et al.* (1986), de Segal *et al.* (1988) et de Hudson *et al.* (1993) ne montrèrent pas cette relation entre prévalence de méthano-excrétion et cancer du côlon. Plus récemment, l'étude menée par Scanlan *et al.* (2008) montre que 45 % des patients de l'étude présentant un CCR (n=31 - 60.3 ± 6.6 ans) sont *mcrA* positif, mais que cette valeur n'est pas significativement différente de celle retrouvée chez les témoins ne présentant pas de pathologies digestives (48 %).

organismes dans l'écosystème. Cependant de nombreuses espèces restent encore difficilement cultivables, voire non-cultivées (Amann *et al.*, 1995) et la compréhension de l'écosystème est de ce fait toujours limitée d'un point de vue fonctionnel.

De manière à avoir une perception nouvelle du potentiel génétique et fonctionnel du microbiote intestinal, les chercheurs se tournent à l'heure actuelle vers une nouvelle approche : la métagénomique (Handelsman, 2004). Cette dernière considère l'ensemble des génomes d'une communauté microbienne ou d'un écosystème entier comme une seule et même donnée, le métagénome. Plusieurs métagénomes ont d'ores et déjà été caractérisés et ont été ou sont en cours d'analyse (Singh *et al.*, 2009). Plusieurs études consacrées au microbiote intestinal humain ont déjà utilisé cette méthodologie (Gill *et al.*, 2006, Kurokawa *et al.*, 2007). D'autres approches recouvrent maintenant la caractérisation des protéines (Métagénomique), des ARN (Métagénomique) ou des métabolites (Métabolome) de cet environnement. L'intégration de l'ensemble de ces données devrait apporter un éclairage nouveau de cette « boîte noire » que restent le tube digestif humain et son microbiote.

Les travaux de cette thèse ont été menés au sein de l'Equipe de Recherche Technologique « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament » (ERT CIDAM) de l'Université d'Auvergne. Cette équipe, co-dirigée par Monique Alric, Eric Beyssac et Jean-Michel Cardot, est rattachée au Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) d'Auvergne ainsi qu'à l'Institut Fédératif de Recherche (IFR 79) Santé-Auvergne. Dans le cadre de la mise en place de son plateau technologique de digestion artificielle, l'ERT-CIDAM a entrepris de développer des outils moléculaires d'analyse de la flore intestinale humaine dont le suivi est indispensable dans des études de digestion artificielle. Dans ce contexte, l'équipe dirigée par Jean-François Brugère s'intéresse à la diversité de certains grands groupes métaboliques, et notamment à celle des Archaea méthanogènes, objet de ces travaux de thèse.

Le microbiote joue un rôle essentiel dans la physiologie de l'hôte. Ce rôle recouvre le développement et la maturation du système immunitaire intestinal, la croissance et la survie des cellules épithéliales, et la nutrition de l'hôte ; cet aspect passe notamment *via* la production par fermentation d'AGCC, en particulier le butyrate qui couvre à lui seul 60 % des besoins énergétiques des cellules épithéliales coliques de l'hôte. Le microbiote méthanogène permet, avec les autres micro-organismes hydrogénotrophes (acétogènes et sulfato-réducteurs), le maintien d'une pression partielle basse en H₂, nécessaire au maintien de l'activité de fermentation et donc au bon déroulement des processus de digestion.

Le microbiote reste néanmoins également impliqué dans plusieurs pathologies digestives. Dans ce cadre, selon certains auteurs, le microbiote méthanogène est significativement plus abondant chez les individus obèses et sa présence est positivement corrélée à la prévalence des SII. Néanmoins, il est impossible à l'heure actuelle d'affirmer si les disproportions entre populations et quantité de méthanogènes sont des facteurs associés, des conséquences de la pathologie ou inversement des causes.

Les Archaea méthanogènes colonisent le tractus digestif de nombreux animaux et notamment celui de l'homme. Elles sont retrouvées au sein du microbiote colique humain à des concentrations supérieures à 10^8 cellules par gramme de contenu, chez 30 à 50 % de la population. Jusqu'à très récemment, l'étude de leur diversité chez l'homme s'est cantonnée aux approches culturelles. Ceci a permis la mise en évidence de deux Archaea méthanogènes hydrogénotrophes : *M. smithii* et *M. stadtmanae* qui permettent le maintien d'une pression partielle en hydrogène basse nécessaire à l'activité de la flore fermentaire. Strictement anaérobies et de croissance lente et dépendante de nombreux cofacteurs, elles sont difficilement cultivables et isolables. Du fait de potentielles implications des Archaea méthanogènes dans diverses pathologies et notamment dans l'obésité et le SII, une description plus précise de la diversité du microbiote méthanogène *via* l'utilisation d'approches moléculaires, semble indispensable. De plus, parmi les nombreux facteurs susceptibles d'influencer la colonisation par le microbiote méthanogène (origine ethnique, sexe, alimentation...), le vieillissement est un facteur pour lequel très peu de données sont disponibles.

La partie qui va suivre est consacrée aux résultats. Dans un premier temps, il sera présenté en quoi l'évaluation du microbiote intestinal humain par un test de diagnostic *in vitro* moléculaire présenterait un intérêt majeur. Ensuite, les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse, et concernant l'étude de la diversité des Archaea méthanogènes colonisant le tractus digestif de l'homme, ainsi que l'impact de l'âge sur cette diversité et sa distribution seront présentés dans un deuxième et un troisième chapitres.

RÉSULTATS

Chapitre 1 : Le challenge d'un test de diagnostic *in vitro* (DIV) moléculaire permettant d'évaluer le microbiote intestinal humain (Article 1)

Cette revue a pour objectif d'exposer l'hypothèse que le diagnostic *in vitro* (DIV) du microbiote intestinal humain pourra être, dans un futur proche, un moyen non invasif de diagnostic et de suivi de diverses pathologies du tractus gastro-intestinal.

L'utilisation d'approches moléculaires nouvellement développées, telles que la métagénomique et les biopuces à ADN, sont au cœur de cette hypothèse. Sachant que le tractus digestif de l'homme est colonisé par un microbiote dont la diversité et l'abondance sont tellement importantes qu'elles en font l'un des écosystèmes les plus complexes qui soit, l'application de tels outils au diagnostic du microbiote s'avère nécessaire. En effet, bien que les fonctions du microbiote soient pour la plupart bénéfiques à l'hôte, il n'en demeure pas moins que le microbiote est aussi impliqué dans des pathologies telles que l'obésité, le cancer du côlon ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. D'autres associations entre composants du microbiote et pathologies, sont à attendre de futures études cliniques et épidémiologiques ; tout ceci est rendu possible par l'évolution des techniques d'analyse moléculaire d'écologie microbienne (métagénomique et biopuces).

De ce fait, cette revue fait l'état des connaissances concernant :

- le microbiote intestinal humain et notamment sa diversité, son abondance, ses implications dans la physiologie de l'hôte et dans différentes pathologies,
- l'évolution des techniques d'écologie moléculaire permettant l'analyse de ce microbiote
- l'importance des étapes préanalytiques lors de l'étude du microbiote intestinal humain : localisation des prélèvements et techniques d'extraction d'ADN et d'ARN.

For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

EXPERT
REVIEWS

Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics

Expert Rev. Mol. Diagn. 9(4), 353–365 (2009)

Jean-François Brugère[†],
Agnès Mihajlovski,
Mohieddine Missaoui
and Pierre Peyret

[†]Author for correspondence
ERT CIDAM – CBRV, Université
d'Auvergne – PRES Auvergne,
Place Henri Dunant,
63000 Clermont-Ferrand,
France

Tel.: +33 473 178 391

Fax: +33 473 178 392

j-francois.brugere@u-clermont1.fr

The human GI tract is inhabited by an incredibly complex and abundant microbiota, whose composition is dependent on a variety of factors. The gut microbiota has an influence in the morphological, immunological and nutritional functions of the digestive tract and may be involved in many diseases. This article proposes the rationale behind conducting *in vitro* diagnostics (IVDs) of the human microbiota, as well as outlining the conceptual and technical difficulties involved in IVD testing. The molecular methods that can be used according to whether the IVD tools are employed to study one individual constituent species or to determine the microbiota as a whole will also be described. In the latter case, these technologies include high-throughput sequencing for metagenomics and DNA microarrays, which can now be efficiently used to study gut ecology and are believed to represent the future of standardized diagnostics.

KEYWORDS: colorectal cancer • DNA microarray • GI tract • gut microbiota • *in vitro* diagnostic • inflammatory bowel disease • metagenomic

Microorganisms are physically, intimately and densely associated with our body. Although present on the skin, in the respiratory tract and in the vagina, the majority are located in the digestive tract, between the mouth and the rectum, where they form different microbiotas with qualitative and quantitative variations among organs. The most intensively colonized part of the digestive tract is the colon, where microbiota account for 1.5 kg of biomass (i.e., approximately 2% of the body mass) [1]. Numerically, every individual has ten-times more bacterial cells than human cells, conferring a different metabolic potential than the one encoded by the human genome. Therefore, from a metabolic point of view, it would be more correct to describe humans as 'superorganisms', that is, a human/microbes hybrid [2].

These microorganisms are as diverse as they are abundant, and recent estimations suggest that there are approximately 15,000–36,000 different bacterial species forming the microbiota according to the molecular criteria used [3]. The gut microbiota is individual specific and remains relatively stable over the course of life [4], apart

from the flora acquisition/implantation period in newborns [5]. One of its key features is resilience (i.e., the capacity to regenerate itself) as the same dominant populations are obtained before and after a crisis episode (e.g., antibiotic therapy) [6], although this view may change when more-accurate methods are employed. Nevertheless, intestinal microorganisms constitute a real fingerprint of each individual [7,8], as they result from a personal developmental history with specific environmental, nutritional and genetic components.

The microbiota acts on gut physiology and, more broadly, on health. Microbiota composition can be influenced by drugs and/or pre- or probiotics and plays either a direct or indirect role in the development of several pathologies, as outlined in this article. Consequently, it would make sense to run *in vitro* diagnostic (IVD) tests to assess microbiota composition (mainly the microbiota of the large bowel) for preventive care or early diagnosis, but the complex nature of the microbiota poses conceptual and technical difficulties. However, solutions have been developed, as described later.

Rationale for analyzing the composition of the microbiota

There is a growing body of evidence that our microbiota is implicated in several metabolic or physiological functions, as well as certain pathologies. For example, *Helicobacter pylori* in the stomach is associated with the development of gastritis, peptic ulcer and adenocarcinoma [9]. Certain bacterial groups in the mouth are associated with the different steps of caries progression [10] and in polymicrobial anaerobic infections, such as endodontic infections [11,12] or periodontal disease [13]. These diseases are also associated with an increased risk of developing coronary heart disease [14]. Salivary microbiota has also been used as a diagnostic indicator of oral cancer, with sensitivity and specificity of approximately 80% [15].

Contribution of the microbiota to intestinal tract functions

The microbiota of the intestinal tract is very abundant but, paradoxically, is not essential to life, as we have learnt from germ-free mice. However, these mice, delivered by cesarean section and confined to sterile environments, present important modifications in the maturation, maintenance [16,17], morphology, immunology and nutritional functions of the mouse GI tract [18]. The main roles of the microbiota are to exclude pathogens by acting as a physical barrier, coating the mucosa and inducing the production of antimicrobial peptides by Paneth cells [19]. The microbiota also helps decrease the inflammatory response and the number of Peyer's patches, while promoting angiogenesis [20]. From a nutritional standpoint, and in addition to the production of available vitamins (especially vitamins B₉, B₁₂ and K) [21], the microflora is a source of energy for the host. It has been reported that germ-free mice implanted with a microbiota show a 60% increase in body fat [22] owing to an excess of energy-release from the fermentation of undigested food residues reaching the colon (e.g., dietary carbohydrates, such as resistant starches, plus other dietary fibers [23]). This metabolic activity varies according to microbiota composition [24]. It also involves the use of proteins/glycoproteins that have not been digested in the upper part of the intestine, and the recovery of secretions (mainly mucins) that would otherwise be lost for the host. At the end of this anaerobic metabolism, fermentations lead to the production of gases (H₂, CO₂, CH₄ and also H₂S) and of short-chain fatty acids. These anions of two to six carbon atoms are mainly formed by acetate, then propionate and butyrate, normally at a ratio of 3:1:1. They are used by the host, where butyrate constitutes the major energy source for colonocytes, and appear to be very beneficial to host physiology [25–27].

Implication in intestinal diseases

The colon is the third most frequent site of cancer in Western countries and the second cause of cancer mortality in the USA [28] and Europe [29]. In addition to genetic factors, dietary habits seem to play a significant role in the genesis of colon cancer: the increased incidence in African-American versus Native African populations [30] clearly indicates the deleterious effects of Western diets caused by excessive calorie intake or by dietary

macro- and micro-component composition [31,32]. As microbiota interacts with diet, microorganisms are, at least partly, implicated in carcinogenic potency. For example, microbiotic species (particularly from the genus *Clostridium*) can transform the 5% of the primary bile acids escaping the enterohepatic recirculation and reaching the colon. After 7 α -dehydroxylation, primary bile acids become secondary bile acids, which can promote tumorigenesis [28]. Larger quantities of these molecules are recovered in cases of high-fat diets [33]. Some enzymatic activities of the microbiota (β -glucuronidase and nitroreductase) can lead to the activation [34] or synthesis of carcinogenic molecules, such as fecapentenes (FP-12 and FP-14) in stool, which mainly result from the anaerobic metabolism of *Bacteroides* [35]. In parallel, a meat-rich and high-saturated-fat diet may lead to the overproduction of H₂S, a molecule produced by hydrogenotrophic sulfate-reducing microflora [36], which promotes free-radical synthesis [37] and inhibits the use of butyrate in the colonocyte [38]. Inversely, carcinogenic molecules, such as heterocyclic amines, mycotoxins (aflatoxin B1) and polycyclic aromatic hydrocarbons may also be supplied directly by diet [31,39] and inactivated by specific enzymatic activities of the microbiota.

Recently, microbiota has been proposed as a factor involved in the control of bodyweight, as it could be expected given the role of the gut microbiota in the extraction of calories from our food. In a first study, the Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio was found higher in obese people than in leaner people [40] but this result is no more supported by other recent works, for example, from Duncan *et al.* [41]. The microbiota is known to influence the expression of the human factor, fasting-induced adipocyte factor, a regulator of fat storage [22]. This suggests that the microbiota could be modified in order to limit weight gain, despite the existence of predisposing genetic factors.

The association diet/microbiota also modulates the quantity, nature and proportion of short-chain fatty acids and either beneficially or deleteriously influences numerous functions of the organism, with local effects (e.g., constipation and ulcerative colitis) and systemic effects (e.g., osteoporosis, coronary heart disease and diabetes) [26]. The microbiota of inflammatory bowel disease patients is also modified. Recent results from Crohn's disease and ulcerative colitis showed that some patients have a lower diversity [42] and a depletion of commensal bacteria, particularly *Bacteroidetes* and *Firmicutes* [43]. These chronic inflammations are also expected to promote carcinogenesis, as demonstrated for ulcerative colitis [44]. More surprisingly, microbiota is also suspected to be involved in atopic disorders, such as asthma and eczema [45]. Taken together, these elements argue for an immediate interest in determining gut microbiota composition for the assessment of its metabolic capacities in generating/detoxifying carcinogens and potentially for use as a diagnostic marker of colorectal cancer risk. An IVD microbiota test could also be used as a tool for monitoring the presence of microbial populations able to induce chronic inflammations or other bowel diseases and for monitoring the influence of medical drugs or pre- or probiotics that imbalance some bacterial populations by bringing or enforcing beneficial bacteria [46].

Microbial content of human digestive ecosystems

Since bacteria form the largest taxonomic, genetic and metabolic diversity of the gut microbiota, we will mainly focus on tools for studying this domain of life, some of which can be bacteria specific. Nevertheless, it should be kept in mind that the other two domains, the Eukarya and Archaea, are also present in the GI tract. Eukaryotic microorganisms (mainly *Blastocystis* spp. and yeast, for example, *Candida*) represent minor populations [47], whereas Archaea, which are metabolically active in more than one in three people, have long been considered limited to two hydrogenotrophic Methanobacteriales species, *Methanobrevibacter smithii* and *Methanospaera stadtmanae* [48]. However, recent findings show that a new methanogenic order inhabits the intestinal tract, suggesting that in-gut archaeal diversity may be higher than previously thought [49]. Moreover, since methanogenic archaea play a potentially pathogenic role [50] and the presence of several species belonging to this new order are frequently associated with elderly people (BRUGÈRE JF, MIHAJLOSKI A, PERS. COMM.), future diagnostic tools would also have to address the presence of nonbacterial organisms.

Fecal matter contains a large diversity of close to 1200 viral genotypes [51]. Phages directly affect bacterial composition but have no significant metabolic activity, *per se*. Thus, the identification of actors in gut physiology can be limited to prokaryote and eukaryote microorganisms. However, the role of these phages in the direct regulation of certain microbiotic components and the potential for future medical use to specifically control certain bacterial groups may be of particular interest.

Individual-, age- & organ-specific microbiota

The gastrointestinal microbiota is viewed as a fingerprint for every individual, highlighting the specificity of its composition to each individual. At birth, the GI tract of newborns is sterile and becomes rapidly colonized in the first few instants of life. Various microorganisms will then pass through the digestive tract due to environmental exposure (and possibly hygiene conditions surrounding the first months of life), and some of them, depending on the tolerance of the host and of the bacteria already present, will colonize the tract. Thus, this partly opportunistic colonization depends on delivery mode (vaginal or cesarean section), gestational age at birth, feeding mode (breast- vs formula-fed), the use of antibiotics [52–54], and probably also genetic factors. The impact of genetics remains controversial: the microbiota of monozygotic twins are as different as the microbiota of dizygotic twins [55], but the major histocompatibility complex seems to influence fecal flora composition in mice [56]. However, after the first chaotic months, the ecosystem seems to stabilize and, at 1–2 years of age, it reflects the adult ecosystem [5]. The adult digestive tract can be viewed as a succession of different ecosystems. Indeed, microbial populations are unevenly divided throughout the digestive tract due to a mosaic of ecological conditions (e.g., physicochemical and nutritional conditions and transit time), resulting in important between-organ differences. This makes it necessary to distinguish resident (i.e., nontransient) populations, also termed autochthonous (nonallochthonous) populations [16].

The oral cavity is extremely rich in microorganisms, with 10^9 bacteria per milliliter of saliva and 10^{11} bacteria per gram of dental plaque. This microflora is characterized by its ability to adhere to different surfaces (e.g., teeth and tongue) with biofilms formed of different species [57]. Molecular approaches have detected more than 700 species. Among these species, 50% are uncultured microorganisms, and some that belong to the *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* and *Veillonella* genera appear to be dominant and ubiquitous, whatever the oral sampling site. The distal part of the esophagus seems to represent an extension of the oral cavity, presenting similar species but with less microbial density and diversity (less than 100 species) [58].

The stomach represents a split in the microbial continuum of the digestive tract because of its extremely acidic pH, as most of the microorganisms ingested are destroyed before reaching the duodenum. This makes it difficult to distinguish the exact proportions of resident versus transient stomach bacteria [59]. However, a study on 23 gastric endoscopic biopsy samples revealed the presence of over 128 different bacterial phylotypes (on the basis of 16S rRNA sequence analysis). *Helicobacter pylori* was recovered in most of the subjects, and approximately 70% of recovered phylotypes were formed of sequences already described for the oral cavity [60]. Nevertheless, 10% corresponded to uncharacterized species, with some of them belonging to the phylum Deinococcus/Thermus, which includes species that have been described in extreme environments (e.g., hot springs and radioactive-waste-disposal sites).

Conditions are less extreme in the small intestine and large bowel, where the pH varies between approximately 6.5 and 7.5 in the small intestine [61] from the duodenum to the ileum, and between approximately 5.5 and 7.0 in the large intestine, from its proximal to its distal part [62]. The transit of the small intestine slows down between the duodenum and the ileum (decrease in peristalsis), consequently increasing microbial density, particularly in the lumen, from 10^4 bacteria per milliliter in the duodenum to 10^8 in the ileum [16]. Mainly facultative anaerobic bacteria, such as enterobacteria, streptococci and lactobacilli, are recovered there. Finally, further along this part of the digestive tract, redox potential gets lower, leading to a parallel increase in the proportion of strictly anaerobic microorganisms [63].

Human colonic microbiota

Up to 10^{11} – 10^{12} bacteria per gram of contents colonize the colon, where transit time is longer and content is increasingly solid; therefore, the luminal fraction of the microbiota (whether or not associated with fiber and other transient content matter) increases while the mucosal fraction (i.e., bacteria adherent to the mucous membrane) seems to be less subject to fluctuations [8]. The vast majority of these microorganisms are obligate anaerobes, making it difficult (if not impossible) to study, culture and isolate them. However, many of the predominant anaerobes from the human colon have been isolated and, for certain groups, there is evidence that most can be cultured (for example, see [64]). They are grouped according to occurrence in terms of residual populations ($<10^6$ /g, in part composed of transient microorganisms),

subdominant populations (10^6 – 10^8 /g) and dominant populations ($\geq 10^9$ /g). This abundance-based classification is not synonymous with the functional hierarchy of this ecosystem. To illustrate this point, the hydrogenotrophic prokaryotes (acetogenic bacteria, sulfate-reducing prokaryotes and the methanogenic Archaea) are subdominant but, as they consume H_2 formed during the fermentative processes, they maintain the low H_2 pressure essential to the smooth running of fermentation and colonocyte metabolism. Therefore, a test describing the composition of the microbiota would be useful if it can differentiate populations varying on a several-log scale.

Variation in the absolute abundance of populations is one feature of the human colonic microbiota. The other is the numerous different species. Culturing techniques have described the dominant flora as being composed of the obligate anaerobes *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* and *Ruminococcus* [65]. The use of culture-independent analyses has partially modified this vision [66,67]. Recently, advanced sequencing processes and metagenomics strategies have been coupled with powerful bioinformatics tools and molecular phylogeny to generate more detailed descriptions [3,68]. Hence, several studies have revealed the presence of two major bacterial phyla: the phylum Firmicutes accounts for half of the phylotypes recovered (mainly *Lachnospiraceae* with the clostridial IV and XIVa groups) while the phylum Bacteroidetes accounts for another quarter (i.e., *Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas*). Another phylum, *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*, *Atopobium*) is also highly represented, although to a lesser extent, as are the phyla Proteobacteria, Fusobacteria and Verrucomicrobia [8,40,43]. The first systematic studies suggested the presence of 1000 species [8]. This figure has been revised of up to more than 1800 genera, where there are 15,000–36,000 different bacterial species according to the criteria used, and that modelization predicts double the amount [3]. Therefore, defining the taxonomic depth of the diagnosis, or the bacterial groups to be analyzed, represents a key step in the study of intestinal microbiota, where systematic studies have so far proven impossible.

Analysis of the gut microbiota

Analyzing the composition of the human colonic microbiota has long been dependent on culturing methods, and the challenge to identify and characterize uncultured organisms was largely ignored. It is well known that conventional cultivation approaches access only a tiny subset of the broad diversity of microorganisms inferred as being present in any given environment, and the culturable portion of bacteria is not representative of total phylogenetic diversity, as evidenced in recent studies (for an example, see [8,43]). However, cultivation of microorganisms remains fundamental for understanding microbial physiology and metabolites [69]. FIGURE 1 illustrates an overview of the principal strategies that could be employed for analyzing the composition of the microbiota. Most of the microorganisms cultivated are those that grow quickly and are capable of growing in nutrient-rich media [70]. New approaches are based on high-throughput methods developed to grow encapsulated single cells under environmentally relevant conditions,

as recently used for marine microorganisms but employable in any environment [71,72]. Despite these advances, many cultivation attempts fail. We simply do not know how to provide the conditions necessary to enable growth in the laboratory. Furthermore, phenotypic properties can prove unstable, and expression can be dependent on changes in environmental conditions, such as growth substrate, temperature and pH. Therefore, molecular diagnoses are of interest to obtain a more accurate identification. Single-cell manipulation techniques, such as optical tweezers and laser microdissection also hold promise for the targeted isolation of microorganisms [73].

Molecular identification of species in the microbiota

Nucleic acid-based bacterial identification relies on different approaches (bottom of FIGURE 1), and some of the workable techniques will now be described. Ideally, any taxon should be identified through a polyphasic approach that includes a combination of phenotypic testing methods (e.g., biochemical testing, cellular fatty acid analysis and numerical analysis) and genotyping testing methods (e.g., DNA–DNA hybridizations, analysis of G+C content, pulsed-field gel electrophoresis and 16S rDNA gene sequencing). However, these methods are time-consuming, expensive and not easily adaptable to workflows in microbial laboratories.

The key molecular player in microbial classification has been the RNA component of the small subunit of ribosomes (SSU rRNA or 16S/18S rRNA), which Carl Woese picked up in the early 1970s as a convenient and reliable 'universal molecular chronometer'. SSU rRNA sequencing offers quick identification and the ability to define within-phylum phylogenetic relationships down to 'species' level in a uniform way. Since ribosomal genes are highly conserved, sequence variation between strains belonging to different species from distinct genera is less evident with rDNA gene sequencing than with DNA pairing studies, where DNA relatedness values are used to compare strains. The 16S rDNA gene reflects only a small fraction of genome complexity. It is now generally accepted that an unidentified isolate whose rDNA gene sequence has less than 99% similarity to the sequences of the isolate's closest phylogenetic neighbors constitutes a new taxon [74]. Diversity estimates frequently adopt the working definition of a species as a group that shares over 99% 16S rRNA gene-sequence identity and over 70% DNA–DNA hybridizations. However, it is becoming clear that this measure greatly underestimates species number [75].

Sequencing data is conserved in several databases that are growing exponentially due to increasingly simple sequencing possibilities; Ribosomal Database Project II (RDP II) contained 286,257 16S rRNAs in release 9.45, dated December 2006, but now contains 759,837 sequences (release 10.07, dated January 2009) [201]. Idem for the Greengenes database with 107,284 aligned 16S rDNA records with a length of more than 1250 nt in October 2006 and 298,922 sequences in January 2009 [202]. Several 'universal primers' have been identified based on conserved regions of 16S rRNA. Databases, such as probeBase [203], also provide a curated database of annotated rRNA-targeted oligonucleotide probes and

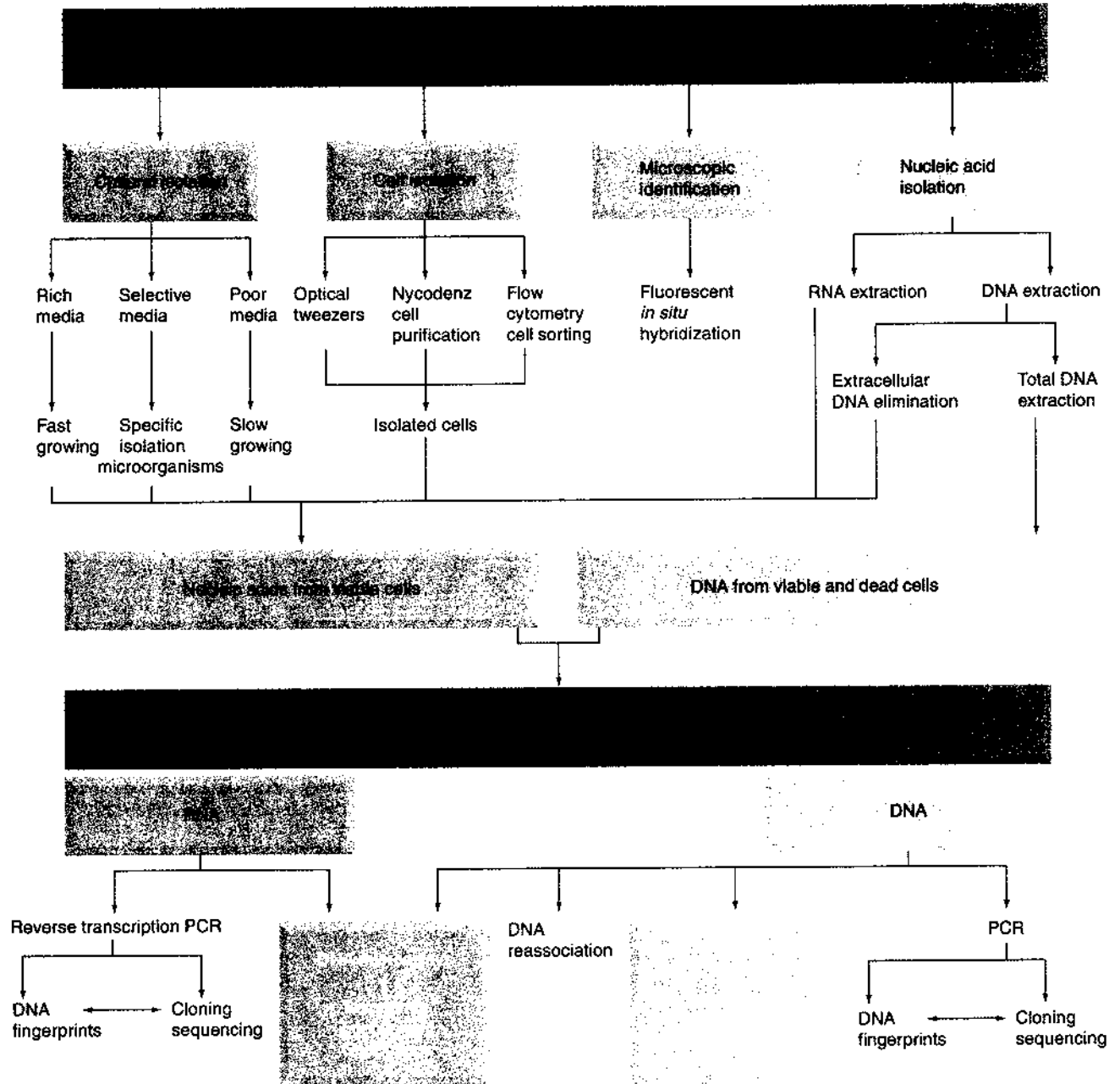


Figure 1. Different strategies for intestinal microbial identification. The terms in white are recently developed tools put forward as candidate human microbiota diagnostics tools for future *in vitro* diagnostic laboratories. Further details are provided in the text.

supporting information mostly targeting highly variable sequence regions (e.g., around *Escherichia coli* positions 450 and 650), while conserved regions (e.g., around positions 350 and 1400) are typically represented by just a handful of probes that are specific for higher taxa, such as the bacterial probe EUB338 or the universal probe UNIV1390.

FISH has become one of the most widely used tools in microbial ecology for the detection of individual cells in various environments [76], including the gut and stools (for example, see [77,78]).

The sensitivity of the standard FISH procedure has recently been improved by using catalyzed reporter deposition [79]. The relationship between specific substrate utilization and phylogeny has been investigated by combining probe hybridization and microautoradiography [80]. Alternatively, secondary ion mass spectrometry can be combined with *in situ* hybridization to reveal the relationship between phylogeny and naturally occurring variation in stable isotope ratios, which is indicative of particular metabolic processes [81].

PCR-based fingerprinting methods for microbial identification

Community fingerprints obtained from PCR-based techniques can produce some biases as PCR can cause relative under- or over-representation of a given taxon [82]. The actual limit of taxonomic resolution is often reduced to groups at higher than species level, and some methods are incompatible with the identification of microorganisms.

Denaturing-gradient gel electrophoresis and temperature-gradient gel electrophoresis are the most commonly used methods for visualizing the major members of a microbial community [83]. Terminal-restriction fragment-length polymorphism is a method adapted from the amplified rDNA-restriction analysis technique that uses fluorescent PCR primers and automated equipment to quantify DNA fragments. rDNA databases can be used to identify terminal restriction fragments predicted from all known sequences for a given set of PCR primers and restriction enzymes [84]. This technique is common in studies on the digestive environment [85].

Ribosomal intergenic spacer analysis and an automated variant ribosomal intergenic spacer analysis can be used to distinguish between different strains and closely related species when 16S and other rDNA-based analyses fail to do so [86]. However, the database is not as large or comprehensive as other ribosomal databases; the methods offer less species identification potential. The same is true for the single-strand conformation polymorphism method separating ssDNA from PCR-amplified ribosomal genes on the basis of variations in their 3D structure, which is sometimes employed for human intestinal tract studies [87,88]. While the main phylogenetic marker is SSU rRNA, it has, at times, been shown to have insufficient resolving power between closely related strains, species and even genera [83]. Alternative phylogeny markers to the 16S rRNA are still being used [89].

Randomly amplified polymorphic DNA is a sequence-independent PCR-based method that can create a community profile by generating a unique set of amplicons for each genome in the sample. Although simple (no sequence information is needed), cheap and fast, the application of randomly amplified polymorphic DNA to a complex sample is limited by resolution power and microorganism identification weaknesses [90]. High-throughput techniques have been developed to overcome these difficulties in the microbial identification of complex samples.

Metagenomics

Metagenomics is the study of collective genomes in an environmental community. The analysis of genome sequence data recovered from the environment is driven by many objectives, including the establishment of gene inventories [91], and can resolve the genetic and metabolic potential of communities, establish how functions are distributed in and among populations, reveal how genetic diversity is created and maintained and identify the primary drivers of genome evolution and speciation. Simple communities with low species diversity can be characterized thoroughly with moderate-effort sequencing. However, complex communities are more representative of most natural microbial assemblages, including the human microbiota, and their characterization presents numerous challenges that require special consideration. Once large scaffolds

are generated, they can be assigned to the correct organism based on various parameters: the phylogeny of conserved marker genes, such as 16S rRNA genes, *recA/radA*, *rpoB/C*, *Hsp60/70*, *EF-Tu* and *aIF2 β* ; percentage guanine-cytosine content, depth of sequence coverage (number of reads per unit length of DNA), codon usage and di-, tri-, tetra-nucleotide frequencies. Extensive shotgun sequencing of the Sargasso sea produced approximately 1.36 Gb of sequence data derived from over 1000 genomic species [92]. Over 1.2 million gene products have been identified to provide a basis for diversity estimates. Despite this massive effort, near-complete genome assembly was only possible for a few organisms, with the dominant organism sampled, *Burkholderia* spp., represented at approximately 21X coverage. The vast majority of DNA sequences has been obtained by using the Sanger sequencing method, which is based on the electrophoretic separation of deoxyribonucleotide triphosphate fragments with single-base resolution. However, the key limitations to sequencing remain cost and throughput. Therefore, novel technologies are being developed to generate massive amounts of sequence data [93,94].

High-throughput sequencing

Sequencing by hybridization using oligonucleotide arrays is the most widely used genotyping technique because the analysis excludes most repetitive sequences. On the other hand, approaches based on sequencing by synthesis on arrays appear highly efficient. These systems avoid bacterial cloning steps and can potentially generate sequence data from DNA that cannot be propagated in bacteria. The 454 system uses templates that are immobilized and amplified on beads in an aqueous-oil emulsion [204]. DNA-carrying beads are purified and placed in individual microfabricated picoliter wells for pyrosequencing (chemiluminescence signal). Typically, running 80 incorporation cycles yields reads of approximately 100 bases. The massively parallel DNA sequencing of the 454 system was first exploited to evaluate microbial diversity in the deep sea [95], sequencing 118,000 PCR amplicons spanning the V6 hypervariable region of rRNAs. New-generation sequencers can acquire up to 400 bases by pyrosequencing. This improvement will greatly facilitate the characterization of microbial organisms, not only for phylogenetic biomarkers sequence determination as described in this article, but also for metagenomics approaches. In the Solexa/Illumina system, known as the Genomic Analyzer [205], single molecules are covalently attached to a planar surface and amplified *in situ*. Sequencing by synthesis is carried out by adding a mixture of four fluorescently labeled reversible chain terminators. Read lengths are 30–50 bases. These sequence reads are inappropriate for genome reconstruction but will be helpful in genotyping.

DNA microarrays

DNA microarrays (or microchip, biochip and gene chip) are powerful, high-throughput experimental systems capable of analyzing thousands to hundreds of thousands of genes at the same time. Originally developed for monitoring whole-genome gene expressions, microarrays have been used for other purposes, such as genome-wide mutational screening for single-nucleotide polymorphisms and analyses on distributions of species or strains

in natural environments. The application of microarray technology for microbial diagnostics is passing through a dynamic development phase [96].

This is a very high-throughput technique in which a large number of taxonomically differentiated oligonucleotides or metabolic functional-gene oligonucleotides are immobilized on a solid surface and hybridized to labeled nucleic acids. Different microbial diagnostics microarray platforms have been developed [97], but planar glass microarrays have become the most widely used. Oligonucleotide microarray technology hinges on detailed attention to the design of specific probes spotted on the solid phase [98,99]. Factors affecting duplex formation on DNA microarrays include probe density, microarray surface composition and the stability of oligonucleotide-target duplexes, intra/intermolecular self-structures, and RNA secondary structures.

Several types of recently developed microarrays have been evaluated for bacterial detection and microbial community analysis [96,100]. The first proof-of-principle for the parallel detection of bacteria using a 16S rRNA-based DNA microarray was given by Guschin *et al.* [101]. The 16S rRNA gene is the most widely used marker, but it does not allow resolution below the species level. Alternative universal marker genes with higher resolution include *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *groEL*, *atpD* or the *tmRNA* gene. Arrays used in microbial evaluation can be divided into at least five categories based on the genes targeted by the array [100]:

- Phylogenetic oligonucleotide arrays (POAs) are designed based on a conserved marker such as the 16S rRNA gene, which is used to compare the relatedness of communities in different environments. The most comprehensive POAs developed so far are 31,179 perfectly matched hierarchical 20-mer probes (with a corresponding number of single mismatch probes as negative mismatch controls) targeting 1945 prokaryotic and 431 eukaryotic sequences from the Ribosomal Database Project (RDP) [102]. This high-density microarray of 297,851 probes, complementary to 842 prokaryotic subfamilies [103], was used comparatively to the 'clone-and-sequence' usual process in three different environments (urban aerosol, subsurface soil and subsurface water). The accuracy of the microarray was verified, and this strategy revealed bacterial families that were otherwise undetected by the clone-and-sequence method;
- Functional gene arrays are designed for key functional genes that encode for proteins involved in various metabolic processes. A comprehensive and fully validated microarray covering the entire known diversity of methanotrophs was produced using *pmoA* genes as functional markers [104]. The largest functional gene arrays published to date contain 1662 probes for genes involved in carbon, nitrogen and sulfur cycles, organic contaminant degradation and metals resistance and reduction [105], but this functional gene arrays has recently been expanded to over 24,000 probes [100];
- Community genome arrays containing the whole genomic DNA of cultured organisms can describe a community based on its relationship to these cultivated organisms. A prototype array has

been developed that contains the entire genomic DNA of 67 different bacteria (one species genome per spot), including α -, β -, δ -Proteobacteria and Gram-positive bacteria [106]. Community genome array was used to compare microbial populations in four marine sediments, three river sediments and three soils;

- Metagenomic arrays are a potentially powerful technique because, unlike the other arrays, they contain probes produced directly from environmental DNA itself and can be applied with no prior knowledge of the community. Sebat *et al.* generated a metagenomic array using a cosmid library from groundwater enrichment [107];
- Finally, although outside the scope of this article, whole-genome open reading frame arrays contain probes for all of the open reading frames in one or more genomes. Dong *et al.* used a whole-genome open reading frame array containing 96% of the annotated open reading frames in *E. coli* K-12 to comparatively investigate the genome of the closely related (97% based on 16S rRNA gene) *Klebsiella pneumoniae* 342, which is a maize endophyte [108].

The integration of isotope and microarray technologies produces one of the potentially most powerful combined approaches for microbial ecology research. Microarray analysis of isotope-labeled DNA or RNA can differentiate between active and inactive organisms in a sample. Adamczyk *et al.* used ^{14}C -labeled bicarbonate and a POA to study ammonia-oxidizing bacterial communities in two samples of nitrifying activated sludge [109].

Expert commentary

As described, techniques have been specifically developed for molecular microbial ecology. Some of these techniques have crossed over to medical sciences, at least in research laboratories [110]. Several studies have used metagenomics to determine the diversity of the gut microbiota at both taxon level and functional level (metabolism and metabolic interactions in the gut) and/or to reveal variations between health-associated and disease-related microbiota [40,43,55,111]. Other studies have used DNA microarrays, with different depths in the analysis (i.e., identifying different numbers of bacteria) [5,112]. To date, only rRNA target probes have been used so far. One of these microarrays was able to detect 40 different species [112], while another screened nearly all known SSU rDNA species [5], with 94% of the 16,437 species represented in the prokMSA database (specific detection for 1590 of these). Finally, Zoetendal *et al.* recently cited the existence of an 1140-different-species microarray targeted towards the detection of gut commensals [110]. It must also be mentioned that a specific DNA array has been developed for detecting 15 different intestinal pathogens [113].

Challenges in the preanalytical steps

The preanalytical steps (i.e., sample taken and sample preparation) require special attention. Ideally, the sampling step has to be safe, simple, rapid and cheap. Stool collection possesses all these features, and can be achieved at home by the patient. However, what is the significance of stool microbiota in the diagnosis of gastric, small intestine or even colic diseases? There are, in fact,

important differences in microbial composition between stools and the intestinal microbiota [114], mainly in terms of the fraction associated with mucosa [115]. This was confirmed in a larger-scale study showing that the populations recovered in the stools seem to combine bacteria derived from the mucous membrane and the luminal part of the intestine, either adherent or not adherent to transient organic matter [8]. In conclusion, depending on diagnostic format, stools may be sufficient and, if a localized sample has to be collected, biopsies can be performed during colonoscopies, which is a common medical act in developed countries for people over 50 years of age. An alternative to address the upper (proximal) part of the colon is the pyxigraphy capsule procedure, developed and used in the 1990s [116]. Improving this approach could give a new lease of life to this sampling technique.

Nucleic acids (either DNA or RNA) then have to be extracted from this sample. As the microbiota components are very diverse, the objective is to obtain and maintain a quantitatively accurate representation of all community members throughout extraction and subsequent analysis. Lysis of the microbial cells during DNA extraction represents a critical step in PCR-mediated approaches [117]. The stringent conditions needed to lyse Gram-positive cells may cause excessive shearing of the nucleic acids of Gram-negative cells, potentially biasing the reported diversity and possibly creating artefacts and chimeric PCR products. Coextracted components, for example, could also inhibit Taq polymerase and other modifying enzymes and, thus, interfere with the analysis of free DNA. Therefore, it is difficult to obtain identical nucleic acid (either DNA or RNA) extraction yields for every kind of microbe and at several logs of difference among bacterial populations (subdominant vs dominant flora). Several of the extraction protocols proposed can impact this yield [118–120], showing that any diagnostic method would probably have to standardize this preanalytical step as a prerequisite to getting the best quantitative analysis that is interlaboratory comparable. Moreover, the differentiation between live and dead cells presents an important challenge in many microbiological applications. The persistence of DNA in the environment after cells have lost viability means that DNA-based methods cannot differentiate whether positive signals originate from live or dead bacterial targets. Methods such as nuclease-based procedures eliminate extracellular DNA. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies has been recently developed [121]. Assessment of the metabolically active fraction of the community should be done by analyzing RNA rather than DNA [122]. However, RNA extraction from environmental ecosystems requires special attention, as RNAs are highly vulnerable to RNase degradation during the extraction process.

Challenges in the molecular analytical steps

Genetic differences and diversity must also be taken into account for the microbial community analysis. Both genome size and copy number differ from one organism to another, which could alter the number of 16S genes present in a single organism. In this context, PCR amplifications of 16S rRNA genes from a complex microbial community may not give an accurate quantification of the consortium [123], and the cycle numbers in exponential

amplifications introduce significant quantitative bias [82]. The varying percentages of guanine–cytosine content of the template DNA is suspected to cause differential amplification during the denaturation step of the PCR reaction. Sequences can also be less available for primer annealing due to selective priming or the formation of higher-order structures, such as hairpin loops. Another pitfall of PCR is the production of minute errors by certain Taq polymerases lacking the ability to proof-read. Another limitation to PCR technology is the contamination of DNA introduced by unintentional tube-to-tube contamination or contaminated reagents. Each physical, chemical and biological step involved in molecular analysis is a source of bias [117].

Five-year view

The first metagenomic studies of the digestive tract have deeply impacted our vision of the gut. In the next few years, discoveries concerning the link between the microbiota and the human health will probably depend on molecular techniques that are described in this article (i.e., metagenomics and DNA microarrays). They will be able to determine if a pathology is associated with (and potentially due to) the presence of one (or a few) kind(s) of bacteria or to a disequilibrium (or a pathological equilibrium) in the composition of the microbiota. In the first case, specific IVD tests will be developed, for example, quantitative PCR test. In the second case, however, specialized IVD laboratories will be exposed to the difficulties described in this review: a disease related to many different species or to a disequilibrium between broad functional groups (not necessarily synonymous with taxonomic groups) should be diagnosed using microarrays – the best-adapted diagnostic tools. The probes will be designed not only against SSU RNA targets, as is currently the case, but probably also against genes coding for functional markers, such as those used in molecular metabolic ecology. Moreover, rapid technological advances in sequencing and bioinformatics techniques make it reasonable to think that metagenomics could become a standard method for exploring the gut microbiota. Focusing on high-throughput sequencing (the Solexa/Illumina Genomic Analyzer or the Roche-454 systems), read numbers and read lengths are expected to increase, leading to an easier rebuild of genomes with bioinformatics tools and cheaper analyses. Bioinformatics has to improve calculation times and volumes, database accessibility and data collection, although these tasks should not present any insurmountable technological problems.

Colorectal cancer is a multifactorial disease (genetically and environmentally) in which microbiota is potentially associated. It can, therefore, be considered as a paradigm for the future of microbiota IVDs, and in the prevention and diagnostics of pathologies. As a first point, as mentioned previously, a microbiota IVD could identify microbial signatures associated with an early step in the disease, therefore permitting an early therapeutic intervention. It can also be imagined that some microbial signatures are associated with higher susceptibilities and, therefore, microbiota IVDs could represent an easy preventive test. In a more complex and integrative view, individual susceptibilities to colon cancer are also probably determined by hereditary and/or genetic

factors, such as those determining the efficiency and expression of human detoxifying enzymes and cytochromes expressed in the colon. International efforts in the single-nucleotide polymorphism description are of considerable interest in this context, and future molecular diagnostics will permit the identification of the genotype of an individual. Some of these susceptibilities are probably highly modulated by the metabolic activity in the gut, activity that is due to nutrition and to the microbiota composition. Therefore, IVD tests will be of considerable interest to determine the metabolic capacity of each individual, in order to understand their response to alimentation and drugs, for example. This will lead to an integrated preventive diagnostics, informing the patient about their individual risk and the impact of lifestyle (e.g., diet and alcohol intake) and the schedule of more-invasive diagnostics.

Consequently, our view of the future is that metagenomics and DNA microarrays will become standard tools used in IVD laboratories for running diagnostics of the human microbiota,

for preventive and other purposes; particular attention must be given to the preanalytical steps. This will lead back to new GI tract disease diagnostics tools, opening up prospects for diagnosing microbiota-induced illnesses or indirectly diagnosing illness-induced modifications of the microbiota.

Acknowledgements

The authors acknowledge the reviewers for their contributions with their expert comments.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- The human digestive tract is colonized by diverse bacterial populations that appear to be specific to ages, organs and individuals.
- This microbiota is implied in several GI tract functions and, possibly, in several diseases, including cancer and inflammatory bowel disease.
- The extreme bacterial diversity recovered from the GI tract (evaluated, to date, as comprising of more than 15,000 bacterial species) necessitates new strategies for *in vitro* diagnostics.
- Metagenomic studies and DNA microarrays are two of the latest tools that have been efficiently used in research laboratories, and may represent the future for epidemiological and/or clinical research studies, as well for individual *in vitro* diagnostics.
- The preanalytical phase of these diagnostics requires particular attention and standardization is an important challenge for future interlaboratory comparisons of results.
- Microbiota diagnostics is believed to form the future for diagnostics-based strategies for dealing with many GI tract pathologies, not just because they may originate directly from the microbiota but also because the microbiota may indirectly become modified by the disease.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

<p>1 Xu J, Gordon JI. Inaugural article: honor thy symbionts. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 100(18), 10452–10459 (2003).</p> <p>2 Goodacre R. Metabolomics of a superorganism. <i>J Nutr</i> 137(1 Suppl.), 259S–266S (2007).</p> <p>3 Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. <i>Curr Opin Gastroenterol</i> 24(1), 4–10 (2008).</p> <p>4 Dethlefsen L, Huse S, Sogin MI, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. <i>PLoS Biol</i> 6(11), e280 (2008).</p> <p>5 Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. <i>PLoS Biol</i> 5(7), e177 (2007).</p>	<p>6 De La Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Dore J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. <i>J Clin Microbiol</i> 43(11), 5588–5592 (2005).</p> <p>7 Mai V, Morris JG Jr. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. <i>J Nutr</i> 134(2), 459–464 (2004).</p> <p>8 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN <i>et al</i>. Diversity of the human intestinal microbial flora. <i>Science</i> 308(5728), 1635–1638 (2005).</p> <p>• Presents the clone-and-sequence results from approximately 13,000 16S rDNA sequences from different parts of the large bowel of three different patients. Supplementary data give interesting examples on how to exploit these sequences.</p> <p>9 Peek RM Jr, Blaser MJ. <i>Helicobacter pylori</i> and gastrointestinal tract adenocarcinomas. <i>Nat Rev Cancer</i> 2(1), 28–37 (2002).</p>	<p>10 Aas JA, Griffen AL, Dardis SR <i>et al</i>. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. <i>J Clin Microbiol</i> 46(4), 1407–1417 (2008).</p> <p>11 Saito D, Leonardo Rde T, Rodrigues JL, Tsai SM, Hofling JF, Goncalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. <i>J Med Microbiol</i> 55(Pt 1), 101–107 (2006).</p> <p>12 Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. <i>Oral Microbiol Immunol</i> 21(2), 112–122 (2006).</p> <p>13 Kroes J, Løpp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 96(25), 14547–14552 (1999).</p> <p>14 D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Iessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. <i>Am Heart J</i> 151(5), 977–984 (2006).</p>
---	--	---

- 15 Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J. Transl. Med.* 3, 27 (2005).
- 16 Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4(11), 430–435 (1996).
- 17 Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283–307 (2002).
- 18 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118(2), 229–241 (2004).
- 19 Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* 4(3), 269–273 (2003).
- 20 Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(24), 15451–15455 (2002).
- 21 Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 6(Suppl. 1), S43–45 (1997).
- 22 Backhed F, Ding H, Wang T *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(44), 15718–15723 (2004).
- 23 Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61(Suppl. 1), S5–S18 (2007).
- 24 Samuel BS, Hansen EF, Manchester JK *et al.* Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(25), 10643–10648 (2007).
- 25 Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62(1), 67–72 (2003).
- 26 Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 40(3), 235–243 (2006).
- 27 Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27(2), 104–119 (2008).
- 28 McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J. Clin. Gastroenterol.* 39(2), 98–109 (2005).
- Describes the impact of diet and anaerobic bacterial metabolism on colon cancer.
- 29 Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol.* 16(3), 481–488 (2005).
- 30 O’Keefe SJ, Kidd M, Espitalier-Noel G, Owira P. Rarity of colon cancer in Africans is associated with low animal product consumption, not fiber. *Am. J. Gastroenterol.* 94(5), 1373–1380 (1999).
- 31 Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 21(3), 387–395 (2000).
- 32 Pan SY, DesMeules M. Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol. Biol.* 472, 191–215 (2009).
- 33 Berr F, Kullak-Ublick GA, Paumgartner G, Munzing W, Hylemon PB. 7 α -dehydroxylating bacteria enhance deoxycholic acid input and cholesterol saturation of bile in patients with gallstones. *Gastroenterology* 111(6), 1611–1620 (1996).
- 34 Ball LM, Rafter JJ, Gustafsson JA, Gustafsson BF, Kohan MJ, Lewtas J. Formation of mutagenic urinary metabolites from 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats: role of the gut flora. *Carcinogenesis* 12(1), 1–5 (1991).
- 35 Van Tassel RL, MacDonald DK, Wilkins TD. Production of a fecal mutagen by *Bacteroides* spp. *Infect. Immun.* 37(3), 975–980 (1982).
- 36 Gibson GR, Macfarlane GT, Cummings JH. Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut* 34(4), 437–439 (1993).
- 37 Attene-Ramos MS, Wagner ED, Plewa MJ, Gaskins HR. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Mol. Cancer Res.* 4(1), 9–14 (2006).
- 38 Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104(3), 802–809 (1993).
- 39 de Kok TM, van Maanen JM. Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat. Res.* 463(1), 53–101 (2000).
- 40 Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444(7122), 1022–1023 (2006).
- Shows how metagenomics can be used to identify disease-associated microbiota.
- 41 Duncan SH, Lobley GF, Holtrop G *et al.* Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes. (Lond.)* 32(11), 1720–1724 (2008).
- Shows how metagenomics can be used to identify disease-associated microbiota.
- 42 Manichanh C, Rigottier-Gois I, Bonnaud F *et al.* Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55(2), 205–211 (2006).
- Shows how metagenomics can be used to identify disease-associated microbiota.
- 43 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(34), 13780–13785 (2007).
- Provides a new vision of the extreme diversity of the gut microbiota.
- 44 O’Keefe SJ. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24(1), 51–58 (2008).
- 45 Penders J, Thijs C, van den Brandt PA *et al.* Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 56(5), 661–667 (2007).
- 46 Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24(5), 701–714 (2006).
- 47 Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *ISME J.* 2(12), 1183–1193 (2008).
- 48 Stocchi A, Furne JK, Ellis CJ, Levitt MD. Competition for hydrogen by human faecal bacteria: evidence for the predominance of methane producing bacteria. *Gut* 32(12), 1498–1501 (1991).
- 49 Mihajlovski A, Alric M, Brugere JF. 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 (2008).
- 50 Conway de Macario E, Macario AJ. Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 299(2), 99–108 (2009).

- 51 Breitbart M, Hewson I, Felts B *et al.* Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J. Bacteriol.* 185(20), 6220–6223 (2003).
- 52 Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(1), 219–226 (2002).
- 53 Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrie E, Fite A, Macfarlane S. Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54(1), 77–85 (2005).
- 54 Penders J, Thijs C, Vink C *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118(2), 511–521 (2006).
- 55 Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T *et al.* A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228), 480–484 (2008).
- 56 Toivanen P, Vaahtovuori J, Eerola E. Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora. *Infect. Immun.* 69(4), 2372–2377 (2001).
- 57 Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43(11), 5721–5732 (2005).
- 58 Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(12), 4250–4255 (2004).
- 59 Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 107–133 (1977).
- 60 Bik EM, Eckburg PB, Gill SR *et al.* Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103(3), 732–737 (2006).
- 61 Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 29(8), 1035–1041 (1988).
- 62 Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70(6), 443–459 (1991).
- 63 Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Med. Microbiol.* 54(Pt 11), 1093–1101 (2005).
- 64 Aminov RI, Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJ, Welling GW, Flint HJ. Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent *in situ* hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to *Roseburia* spp. or *Eubacterium rectale*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9), 6371–6376 (2006).
- 65 Finegold SM, Attebery HR, Sutter VI. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 27(12), 1456–1469 (1974).
- 66 Suau A, Bonnet R, Sutren M *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11), 4799–4807 (1999).
- 67 Sghir A, Gramet G, Suau A, Rocher V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5), 2263–2266 (2000).
- 68 Rajilic-Stojanovic M, Smidt H, de Vos WM. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.* 9(9), 2125–2136 (2007).
- Reviews the high diversity of both the gut microbiome and the rest of the GI tract, including input from metagenomics.
- 69 Pedros-Alio C. Ecology. Dipping into the rare biosphere. *Science* 315(5809), 192–193 (2007).
- 70 Leadbetter JR. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st Century laboratory. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(3), 274–281 (2003).
- 71 Zengler K, Toledo G, Rappe M *et al.* Cultivating the uncultured. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(24), 15681–15686 (2002).
- 72 Zengler K, Walcher M, Clark G *et al.* High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules. *Methods Enzymol.* 397, 124–130 (2005).
- 73 Frohlich J, König H. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(5), 567–572 (2000).
- 74 Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33(4), 152–155 (2006).
- 75 DeLong EF, Pace NR. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 50(4), 470–478 (2001).
- 76 Amann RI, Krumholz L, Stahl DA. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172(2), 762–770 (1990).
- 77 Castillo M, Skene G, Roca M *et al.* Application of 16S rRNA gene-targeted fluorescence *in situ* hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59(1), 138–146 (2007).
- 78 Tuohy KM, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyle L, McCartney AL, Gibson GR. Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *J. Appl. Microbiol.* 102(4), 1026–1032 (2007).
- 79 Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6), 3094–3101 (2002).
- 80 Ouverney CC, Fuhrman JA. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4), 1746–1752 (1999).
- 81 Orphan VJ, House CH, Hinrichs KU, McKeegan KD, DeLong EF. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* 293(5529), 484–487 (2001).
- 82 Bonnet R, Suau A, Dore J, Gibson GR, Collins MD. Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(Pt 3), 757–763 (2002).
- 83 Forney LJ, Zhou X, Brown CJ. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(3), 210–220 (2004).
- 84 Kent AD, Smith DJ, Benson BJ, Triplett EW. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11), 6768–6776 (2003).
- 85 Dicksved J, Halfvarson J, Roscnquist M *et al.* Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* 2(7), 716–727 (2008).

- 86 Shaver YJ, Nagpal MI, Fox KF, Rudner R, Fox A. Variation in 16S–23S rRNA intergenic spacer regions among *Bacillus subtilis* 168 isolates. *Mol. Microbiol.* 42(1), 101–109 (2001).
- 87 Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF *et al.* Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53(5), 685–693 (2004).
- 88 Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y *et al.* Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ. Microbiol.* 10(3), 789–798 (2008).
- 89 Brousseau R, Hill JE, Prefontaine G, Goh SH, Harel J, Hemmingsen SM. *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10), 4828–4833 (2001).
- 90 Martin R, Langa S, Reviriego C *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143(6), 754–758 (2003).
- 91 Allen EE, Banfield JF. Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(6), 489–498 (2005).
- 92 Venter JC, Remington K, Heidelberg JF *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304(5667), 66–74 (2004).
- 93 Bentley DR. Whole-genome re-sequencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16(6), 545–552 (2006).
- 94 Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB *et al.* Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309(5741), 1728–1732 (2005).
- 95 Sogin ML, Morrison HG, Huber JA *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103(32), 12115–12120 (2006).
- 96 Loy A, Bodrossy L. Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin. Chim. Acta* 363(1–2), 106–119 (2006).
- Reviews microbial *in vitro* diagnostics with DNA microarrays, highlighting the necessity of robust and routinely applicable tests.
- 97 Bodrossy L, Sessitsch A. Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(3), 245–254 (2004).
- 98 Milton C, Rimour S, Missaoui M *et al.* PhylArray: phylogenetic probe design algorithm for microarray. *Bioinformatics* 23(19), 2550–2557 (2007).
- 99 Rimour S, Hill D, Milton C, Peyret P. GoArrays: highly dynamic and efficient microarray probe design. *Bioinformatics* 21(7), 1094–1103 (2005).
- 100 Gentry TJ, Wickham GS, Schadt CW, He Z, Zhou J. Microarray applications in microbial ecology research. *Microb. Ecol.* 52(2), 159–175 (2006).
- 101 Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A *et al.* Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Anal. Biochem.* 250(2), 203–211 (1997).
- 102 Wilson KH, Wilson WJ, Radosevich JL *et al.* High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5), 2535–2541 (2002).
- 103 DeSantis TZ, Brodie FL, Moberg JP, Zubietta IX, Piceno YM, Andersen GL. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb. Ecol.* 53(3), 371–383 (2007).
- 104 Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Murrell JC, Radajewski S, Weilharter A, Sessitsch A. Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* 5(7), 566–582 (2003).
- Example of the use of molecular metabolic markers in the field of microarrays for microbial diagnostics.
- 105 Rhee SK, Liu X, Wu L, Chong SC, Wan X, Zhou J. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7), 4303–4317 (2004).
- 106 Wu L, Thompson DK, Liu X *et al.* Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environ. Sci. Technol.* 38(24), 6775–6782 (2004).
- 107 Sebat JL, Colwell FS, Crawford RL. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(8), 4927–4934 (2003).
- 108 Dong Y, Glasner JD, Blattner FR, Triplett EW. Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 open reading frames. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4), 1911–1921 (2001).
- 109 Adamczyk J, Hesselsoe M, Iversen N *et al.* The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11), 6875–6887 (2003).
- 110 Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57(11), 1605–1615 (2008).
- Reviews the different strategies geared to studying the functions of highly diverse microbiota.
- 111 Gill SR, Pop M, Deboy RT *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312(5778), 1355–1359 (2006).
- First large metagenomic analysis of the human gut microbiome showing the high degree of diversity, with the metabolic capacities of the microbiome inferred from genomics.
- 112 Wang RF, Beggs ML, Robertson LH, Cerniglia CE. Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 213(2), 175–182 (2002).
- 113 Jin DZ, Wen SY, Chen SH, Lin F, Wang SQ. Detection and identification of intestinal pathogens in clinical specimens using DNA microarrays. *Mol. Cell. Probes* 20(6), 337–347 (2006).
- 114 Marreau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10), 4939–4942 (2001).
- 115 Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7), 3401–3407 (2002).
- 116 Pochart P, Lemann F, Flourie B, Pellier P, Goderel I, Rambaud JC. Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* 105(5), 1281–1285 (1993).
- 117 von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental

- samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21(3), 213–229 (1997).
- 118 Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36(5), 808–812 (2004).
- 119 Zoetendal EG, Boonjink CC, Klaassens ES *et al.* Isolation of RNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nat. Protoc.* 1(2), 954–959 (2006).
- 120 Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, Abee T, de Vos WM. DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 24(3), 405–410 (2001).
- 121 Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1), 46–50 (2005).
- 122 Kang S, Denman SE, Morrison M, Yu Z, McSweeney CS. An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. *Curr. Microbiol.* DOI: 10.1007/s00284-008-9345-z (2009) (Epub ahead of print).
- 123 Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7), 2798–2801 (1995).
- Websites**
- 201 The Ribosomal Database Project
<http://rdp.cme.msu.edu/>
- 202 The Greengenes 16S curated database
<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>
- 203 The probeBase
www.microbial-ecology.net/probebase
- 204 The 454 sequencer-dedicated website from the manufacturer
www.454.com
- 205 The Illumina dedicated website
www.illumina.com/sequencing/DNASequencing.ilmn
- Affiliations**
- Jean-François Brugère
Associate Professor, ERT-18 CIDAM,
Université d'Auvergne, CRNH Auvergne,
5c CBRV, Place Henri Dunant,
63000 Clermont-Ferrand, France
Tel.: +33 473 178 391
Fax: +33 473 178 392
j-francois.brugere@u-clermont1.fr
 - Agnès Mihajlovski, PhD
ERT-18 CIDAM, Université d'Auvergne,
CRNH Auvergne, 5c CBRV – Place Henri
Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France
Tel.: +33 473 178 391
Fax: +33 473 178 392
agnes.mihajlovski@u-clermont1.fr
 - Mohieddine Missaoui, PhD
Clermont Université, UMR-CNRS 6158,
LIMOS, Laboratoire d'Informatique et de
Modélisation et Optimisation des
Systèmes, 24 avenue des Landais,
63177 Aubière, France
Tel.: +33 473 405 368
Fax: +33 473 407 670
missaoui@isima.fr
 - Pierre Peyret
Professor, Clermont Université,
UMR CNRS 6023, Laboratoire
Microorganismes: Génome et
Environnement, 24 avenue des Landais,
63177 Aubière, France
Tel.: +33 473 405 139
Fax: +33 473 407 670
pierre.peyret@univ-bpclermont.fr

Chapitre 2 : Mise en évidence d'un potentiel nouvel ordre d'Archaea méthanogènes colonisant le tractus intestinal humain par analyse du marqueur moléculaire *mcrA* (Article 2)

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les données de la littérature sur la diversité de la microflore méthanogène intestinale humaine sont majoritairement issues d'études menées par approches de microbiologie classique. Ces dernières n'ont permis la mise en évidence que de deux Archaea méthanogènes hydrogénotrophes : *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae*, toutes deux appartenant à l'ordre 1 des Methanobacteriales.

L'application d'approches moléculaires à l'étude de la diversité des Archaea méthanogènes présentes dans le tube digestif d'autres espèces animales ou colonisant divers écosystèmes, a permis de mettre en évidence une diversité largement supérieure à celle révélée par les études culturelles. Il apparaît donc intéressant d'appliquer ce type d'approches à l'étude de la diversité des Archaea méthanogènes du microbiote intestinal humain. Dans ce contexte, une analyse phylogénétique menée sur l'ADNr 16S à l'aide d'amorces spécifiques d'Archaea, et une approche moléculaire métabolique utilisant *mcrA* comme marqueur spécifique des méthanogènes, ont été réalisées sur de l'ADN extrait de selles de 6 individus.

PRINCIPAUX RESULTATS

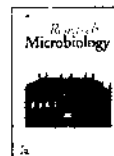
- La diversité des Archaea méthanogènes présentes dans le tractus digestif de l'homme semble avoir été sous estimée. En effet, la présence d'un nouveau phylotype, appelé *Mx-01*, a été mise en évidence par l'analyse du cistron *mcrA* chez un individu sur les six prenant part à l'étude.

- *Mx-01* a été retrouvé à six mois d'intervalle dans les selles de l'individu porteur ce qui indique que la présence de ce phylotype au sein de l'écosystème ne semble pas être transitoire.
- *Mx-01* ne peut être rattaché à aucun des cinq ordres méthanogènes précédemment décrit et fait partie d'un nouveau potentiel sixième ordre proche des ANME-1 d'après les analyses phylogénétiques menées sur les séquences protéiques McrA.
- Outre la présence de *Mx-01*, nouveau phylotype potentiellement méthanogène, les résultats obtenus à l'aide du gène codant l'ARNr 16S ont permis la mise en évidence d'un nouveau phylotype d'Archaea, s'affiliant aux Thermoplasmatales, et présent uniquement dans les selles de l'individu positif pour *Mx-01*.

PRINCIPALES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cet article présente la mise en évidence au sein d'un même échantillon de deux nouveaux phylotypes : un phylotype potentiellement méthanogène retrouvé par l'analyse du cistron *mcrA* et nommé *Mx-01*, et un phylotype mis en évidence à l'aide du marqueur ADNr 16S s'affiliant aux Thermoplasmatales. Deux hypothèses sont alors envisageables i) soit il existe des Archaea présentant le cistron *mcrA* au sein de leur génome et s'affiliant aux Thermoplasmatales, ii) soit ces deux phylotypes sont indépendants et l'intestin de l'homme peut abriter au moins deux types inconnus d'Archaea, dont un potentiellement méthanogène. Seul l'isolement et la co-localisation des deux marqueurs utilisés au sein d'une même cellule permettra de confirmer l'une ou l'autre de ces deux hypothèses.

De manière à déterminer si la présence de ces deux phylotypes n'est qu'anecdotique, une étude portant sur un plus grand nombre d'individus est nécessaire.



A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene

Agnès Mihajlovski, Monique Alric, Jean-François Brugère*

Université Clermont1, UFR Pharmacie, Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), IFR Santé-Auvergne, Equipe de Recherche Technologique Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament (ERT CIDAM), Clermont-Ferrand, F-63001, France

Received 20 December 2007; accepted 13 June 2008
Available online 2 July 2008

Abstract

The diversity of methanogenic Archaea from the gut of 6 humans was investigated by targeting *mcrA*, a molecular metabolic marker of methanogenesis. Three operational taxonomic units (OTUs) were recovered from about 400 clones analyzed, two of which were attributed to the expected Methanobacteriales *Methanobrevibacter smithii* (4 volunteers) and *Methanosphaera stadtmanae* (1 volunteer). The third OTU (1 volunteer) corresponded to a distant phylotype that does not cluster with any of the five methanogenic orders. This result, also supported by 16S archaeal sequences retrieved from the same volunteer, strongly suggests there may be a sixth order and hence potential underestimation of the role of methanogens in gut physiology. © 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Methyl-coenzyme M reductase; Human intestinal microflora; Methanogens; Gut Microbiota

1. Introduction

About 10^{14} microorganisms inhabit the human intestinal tract. This microflora plays several roles, including maturation of the immune system, protection against cell injury and regulation of energy balance [16]. This complex ecosystem consists of Eukarya, Archaea and Bacteria, and also of many viruses. According to recent data, bacterial diversity ranges from 400 to 1000 gastrointestinal species from at least nine different phyla [17]. Most of those species are still uncultured and our knowledge of the microbial diversity remains incomplete. In humans, methanogens have been found in the anaerobic population of the oral cavity, the vagina and the large intestine [3]. Breath-methane analysis, with a threshold of detection of 10^8 methanogens/g of fecal matter [4], shows that humans can be divided into two groups, non-producers (about 2/3), and those who excrete methane in breath (about 1/3) [12]. Unlike that of Eubacteria,

the diversity of gut methanogenic Archaea seems to be well determined and limited to two species belonging to Methanobacteriales, one of the five methanogenic orders defined to date: *Methanobrevibacter smithii* and occasionally *Methanosphaera stadtmanae* [6,14]. This was recently confirmed by the most comprehensive 16S rDNA sequence-based enumeration of colonic mucosa and fecal microbiota of three individuals, where only *M. smithii* was recovered among 1524 archaeal clones sequenced [5]. However, evidence from other digestive environments, like termite gut [7] or rumen [15], raises the hypothesis that the diversity of methanogens might be underestimated. The aim of this study was to investigate methanogen diversity of fecal microflora of 6 subjects by targeting the *mcr* operon which encodes the methyl-coenzyme M reductase (E.C. 2.8.4.1), a molecular metabolic marker specific of methanogenesis [13].

2. Materials and methods

2.1. Fecal samples and nucleic acid extraction

Six volunteers (three men and three women, aged from 25 to 69) gave informed written consent to the study protocol.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 17 83 91; fax: +33 4 73 17 83 92.
E-mail addresses: agnes.mihajlovski@u-clermont1.fr (A. Mihajlovski), monique.ALRIC@crnh.u-clermont1.fr (M. Alric), j-francois.brugere@u-clermont1.fr (J.-F. Brugère).

None had a history of recent treatment with antibiotics. All provided one stool sample, and volunteer 06 one more on two occasions 6 and 17 months later. The method of Yu and Morrison was used to extract DNA from the fecal samples [23].

2.2. PCR amplification, cloning, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and sequencing

Primers MM_01 and MM_02 (Table 1) were designed after alignment of *mcrA* sequences from members of the five orders of methanogens, a part of the *mcr* operon which encodes the α -subunit of methyl-coenzyme M reductase isoform I (MCR-I). These primers are also present in the *mrtA* sequence which encodes the α -subunit of methyl-coenzyme M reductase isoform II (MCR-II) of *M. stadtmanae*, the only Methanobacteriales with no *mcrA* gene in its genome [6]. Fourteen bases were added to the forward primer MM-01 for oriented cloning in the pSTC1.3 vector (StabyCloning kit, Eurogentec, Belgium), leading to primer MM_01_pSTC (Table 1). PCR was then performed on 25 ng of each extracted DNA, using MM_01_pSTC and MM_02 with 40 cycles of PCR and an annealing temperature of 56 °C. Resulting amplicons of the expected size (496 ± 20 bp) were extracted from agarose gels (MinElute gel extraction kit, Qiagen, France) and orientally inserted in the pSTC1.3 vector (StabyCloning Kit, Eurogentec, Belgium). The size and *AluI*–*Csp6I* RFLP pattern of the insert were determined for 100 clones per stool and grouped according to similarities. When possible, two or more clones of each profile were sequenced using the dye-terminator method (3100 Genetic analyzer, Applied Biosystem, France). Nucleotide BLAST [1] allowed exclusion of non-*mcr* clones. Other sequences were translated and aligned using ClustalW [22]. Sequences having an amino acid sequence identity of more than 98% were assigned to the same operational taxonomic unit (OTU). To confirm the diversity obtained, specific primers of each OTU were designed, i.e. permitting detection of *M. smithii*, *M. stadtmanae* and *Mx-01* (Table 1) with a 30 cycle PCR on DNA from each stool samples (annealing temperature 56 °C). Moreover, a PCR targeting a partial sequence of the 16S gene from non-Methanobacteriales Archaea was performed on each sample using modified primers from Skillman et al. [20], Arch f2 (TTCCggTTgATCCYgCCgga) and Arch

r934 (gTgCTCCCCCgCCAATTC) with a 14-base sequence added at its 5'-part in order to orientate cloning in the pSTC1.3 vector (see Table 1 for the 5'-tail sequence). The amplicon of the correct size, obtained exclusively with stool 06, was cloned and sequenced as described above.

2.3. Phylogenetic analysis

To compare and organize sequences obtained from the stools, an alignment with MCR-I sequences from members of the five well-defined orders of methanogenic Archaea and of other clusters was performed using ClustalW [22] and further refined by eye using Seaview [8] (see Fig. 1 for accession numbers of sequences). As anaerobic methane oxidizers (AMOs) also possess a MCR protein that may be involved in reverse methanogenesis, MCR sequences of some ANME-1 were also included in phylogenetic analysis [10]. Phylogenetic trees were constructed either with MEGA 3.1 with a minimum evolution method using a Dayhoff PAM matrix as an amino acid replacement model or with neighbor-joining on a protein distance matrix (calculated with a Jones–Taylor–Thornton (JTT) amino acid replacement model), and inferred with a 1000 bootstrap test [11]. A maximum-likelihood method was also employed, using PhyML [9] with a JTT amino acid replacement model and inferred with 100 bootstraps. In all phylogenetic analyses, *Methanopyrus kandleri* was used as the outgroup, as is generally the case [13]. Phylogenetic analysis was also performed using partial archaeal SSU rRNA gene sequences retrieved from stools of volunteer 06, using a maximum-likelihood method with PhyML [9] (BioNJ tree used as a starting tree, inferred with 100 bootstraps).

3. Results and discussion

The biodiversity of methanogens was assessed in the first six fecal samples. Using degenerate primers MM_01_pSTC and MM-02, *mcrA* amplifications were obtained at the expected size for the stool of all subjects except 02 (data not shown). Analysis of *AluI*–*Csp6I* RFLP patterns of 100 *mcrA* clones for each *mcrA*-positive stool showed the presence of 1, 21, 3, 5 and 6 different patterns, respectively, for stools from volunteers 01, 03, 04, 05 and 06. BLAST of at least one sequence per profile showed that all the clones from stool

Table 1
PCR primer sequences, amplicon lengths and targets

Primer	Sequence (5'–3') ^a	Amplicon length (bp)	<i>mcrA</i> or <i>mrtA</i> targets
MM_01_pSTC ^b	<i>CC TTCgCCgACTgATAYATgTClggYggTgTHgg</i>	≈ 496	methanogenic Archaea
MM_02	ACRTTCATlgCRTAgTTlgg		
MM_Mbs_Fw	<i>gCACCTAACAAACACggACA</i>	446	<i>Methanobrevibacter smithii</i>
MM_Mbs_Rv	TTTggTCCTCTCATTTCgAg		
MMr_Mss_Fw	<i>TgTgCaggAgAAgCagCTA</i>	335	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>
MMr_Mss_Rv	<i>gCTgCagggATTTCgTATT</i>		
MM_Mx01_Fw	<i>TgCAAgAgCAAACCTTCAA</i>	330	uncultured methanogen <i>Mx-01</i>
MM_Mx01_Rv	<i>gAgTTCgAATggCagACCT</i>		

^a All primers were designed in this study.

^b Italics correspond to 14-base sequence added to forward primer MM_01.

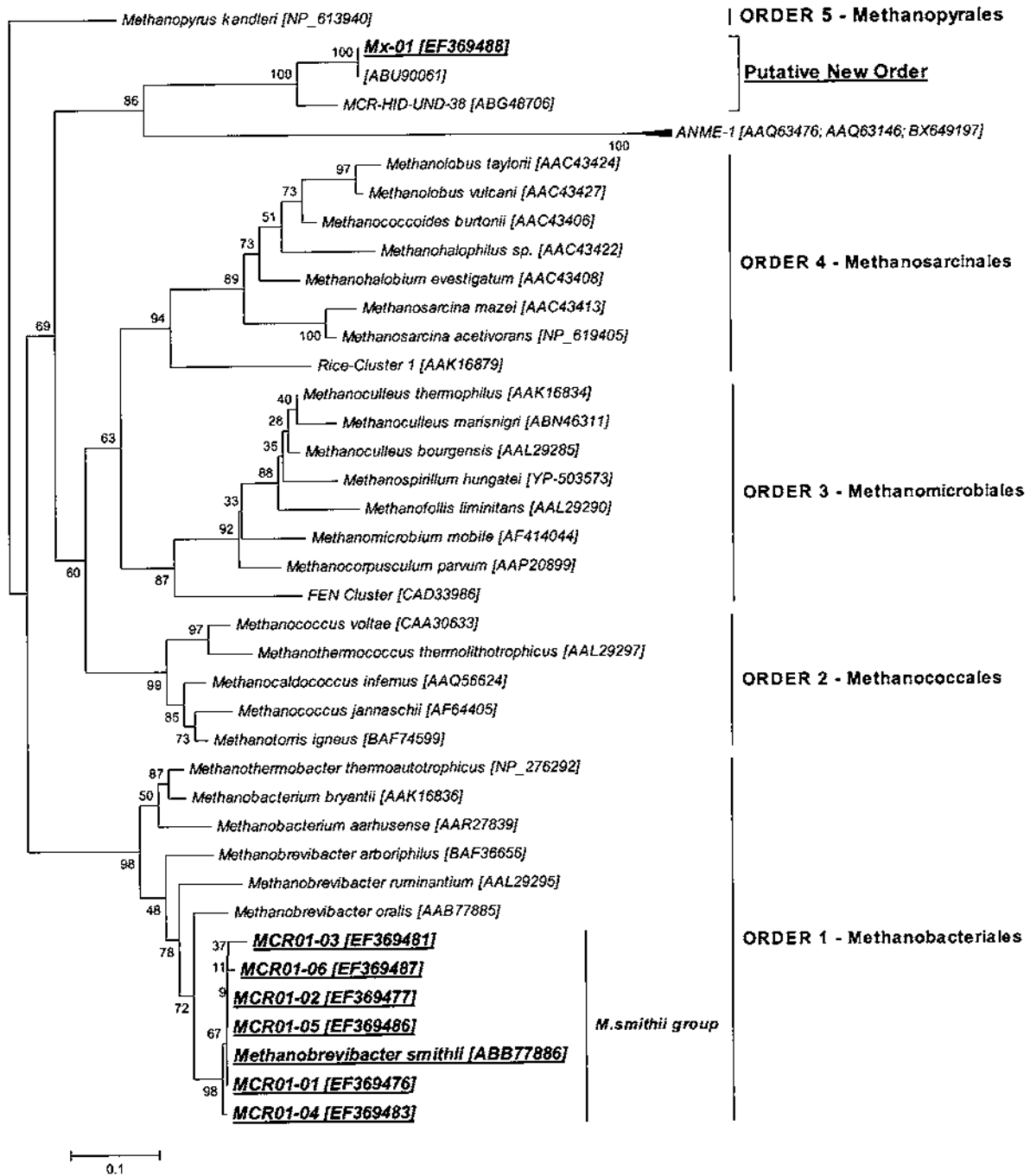


Fig. 1. Phylogenetic relationships within the methanogenic/methane-oxidizing Archaea, derived from MCR-A partial amino acid sequences of some taxa (Genbank accession numbers are given in brackets) and of Archaea retrieved from the human gut using MEGA 3.1 [11]. The *Methanopyrus kandleri* sequence is used as the outgroup [13]. The phylogram is constructed using the minimum evolution method (with a Dayhoff PAM matrix of amino acid substitution). The frequency (in percent) of each ramification from a 1000-time bootstrap re-sampling is indicated.

03 and 2% of those from stool 06 correspond to sequences that are not *mcrA* sequences, unlike all the remaining sequences. Thus, four of the six stools analyzed (stools 01, 04, 05 and 06) contain methanogens.

All the *mcrA* clones from stools 01, 04 and 05 and 81% of the *mcrA* clones from stool 06 could be assigned to seven different RFLP patterns. At the protein level, these clones

correspond to six different polypeptides that have an identity ranging from 98.6% to 100% with the MCR sequence of *M. smithii* (ABB77886), and so were assigned to the same OTU (Table 2). The other clones from stool 06 (17%) correspond to two distinct phylotypes. One phylotype was obtained for two clones, each with its own RFLP pattern corresponding to sequences with 99.3% and 100% of identity with the

Table 2
Quantity, origin and nearest identified taxon of each phylotype deduced from the analyses of 398 *mcrA* clones

Phylotype	Accession (Genbank)	Number of clones	Volunteer	Nearest valid taxon (accession number)	% Sequence identity
MCR1-01	EF369476	375	01-04-05-06	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (ABB77886)	100
MCR1-02	EF369477	1	04	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (ABB77886)	99.3
MCR1-03	EF369481	1	05	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (ABB77886)	98.7
MCR1-04	EF369483	1	05	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (ABB77886)	99.3
MCR1-05	EF369486	2	05-06	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (ABB77886)	99.3
MCR1-06	EF369487	1	06	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (ABB77886)	99.3
MCR1-Mx-01 (<i>Mx-01</i>)	EF369488	15	06	<i>Methanopyrus kandleri</i> (NP-613940)	66.0
MCR2-01	EU034642	1	06	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> (CAE48306)	99.3
MCR2-02	EU034643	1	06	<i>Methanosphaera stadtmanae</i> (CAE48306)	100

MCR protein of *M. stadtmanae*, deduced from the *mrtA* cistron (CAE48306). These sequences were also assigned to the same OTU (Table 2). Fifteen percent of clones from stool 06, all grouped into a single RFLP pattern, have the highest identity (89.8%) with published clone MCR-HID-UND-38 (ABG48706). This last clone corresponds to a sequence from the cluster MCR-6 defined by Smith et al. originating from methanogens of an unfarmed region (and of a cleared site in 1997) from the Hole-in-the-Donut region within the Everglades National Park in Florida [21]. An amino acid identity of 99.3% is now also observed in Genbank with the unpublished sequence ABU90061 obtained from an uncultured methanogenic archaeon recovered from chicken feces. This forms a single OTU which cannot be assigned to any archaeal lineage and which has a 66% amino acids identity as the highest similarity with a valid taxon (*Methanopyrus kandleri*). It is subsequently referred to as *Mx-01*.

Specific PCR using primers designed for the detection of *M. smithii*, *M. stadtmanae* and *Mx-01* (Table 1) were performed to check these results. It confirmed that these methanogens are absent from stools 02 and 03. *Methanobrevibacter smithii* is present in the four other stools, associated with *M. stadtmanae* and *Mx-01* in stool 06 (data not shown). *Mx-01* was also detected in the stool of volunteer 06, collected 6 and 17 months after the first experiment. This strongly suggests that *Mx-01* is a permanent resident of the microflora of volunteer 06 (data not shown).

Our findings confirm that the most common isolate of methanogenic *Archaea* found in the human intestinal tract is *M. smithii*, in agreement with the analysis of 1524 archaeal sequences of the 16S rDNA from the gut microflora by Eckburg et al. [5], and that *M. stadtmanae* is also found in the intestinal microflora of some individuals [14]. However, the presence of *Mx-01* also suggests that the diversity of methanogens may have been underestimated.

The sequence of *Mx-01* falls outside any described methanogenic order in phylogenetic studies performed either with a minimum evolution method (Fig. 1), a neighbor-joining method [18] or by maximum-likelihood [9] (data not shown). In every case, MCR of the anaerobic methane oxidizer ANME-1 is the most closely related sequence. The MCR sequence of ANME-1 presents a cysteine-rich sequence CCX₄CX₅C [19] which is not present in *Mx-01* (data not shown), strongly suggesting that *Mx-01* is more likely a methanogenic *Archaea* which may be part of a sixth order than an

anaerobic methane oxidizer. However, it cannot be excluded that this sequence is a divergent copy of *mcrA* acquired by a non-methanogenic lineage through a horizontal gene transfer from a methanogenic lineage. This might also be a divergent *mcrA* paralogue from a known order of methanogens, but this is probably not the case, as the genome of at least one member of each methanogenic order is characterized and does not show a sequence homologous to *Mx-MCR*.

We have cloned a partial sequence of the SSU RNA gene amplified from stool 06, using “universal” archaeal 16S primers which had been reported to fail to amplify the 16S part of *M. smithii* and *M. stadtmanae* [20]. A PCR product of the right size was obtained only for volunteer 06 (data not shown) and its sequence is available in Genbank under accession number EU662200. The phylogenetic study indicates that this SSU RNA gene sequence does not fall into any described methanogenic lineages, but stands near or within the Thermoplasmatales lineage (Fig. 2). Although it cannot be affirmed that sequences of *Mx-mcrA* and of archaeal 16S come from the same organism, these two results are consistent. It will be interesting to obtain the complete sequence of the *mcr* operon and to characterize other genes of the methanogenesis pathway. Since methanogenesis results from activity coded by genes that are disseminated in methanogen genomes [2], the presence of these other genes will be a strong argument for a functional new order of methanogens, as long as *Mx-01* is not isolated.

Whatever the case, as *Mx-01* is distant on the evolutionary time scale from other methanogens of the gut, it would be of interest to study its metabolic behavior and its role in the human intestinal flora. A study with a larger number of subjects is warranted, so as to determine its distribution throughout the general population and to evaluate the true diversity of methanogens in the human gut – a diversity that would appear to be underestimated.

3.1. Nucleotide sequence accession numbers

The sequences obtained in this study are available in Genbank under accession numbers EF369476 (MCR01-01), EF369478 (MCR01-02), EF369481 (MCR01-03), EF369483 (MCR01-04), EF369484 (MCR01-05), EF369487 (MCR01-06), EF369488 (MCR01-Mx-01), EU034642 (MCR2-01), EU034643 (MCR2-02) and EU662200 (archaeal 16S partial sequence from stools 06).

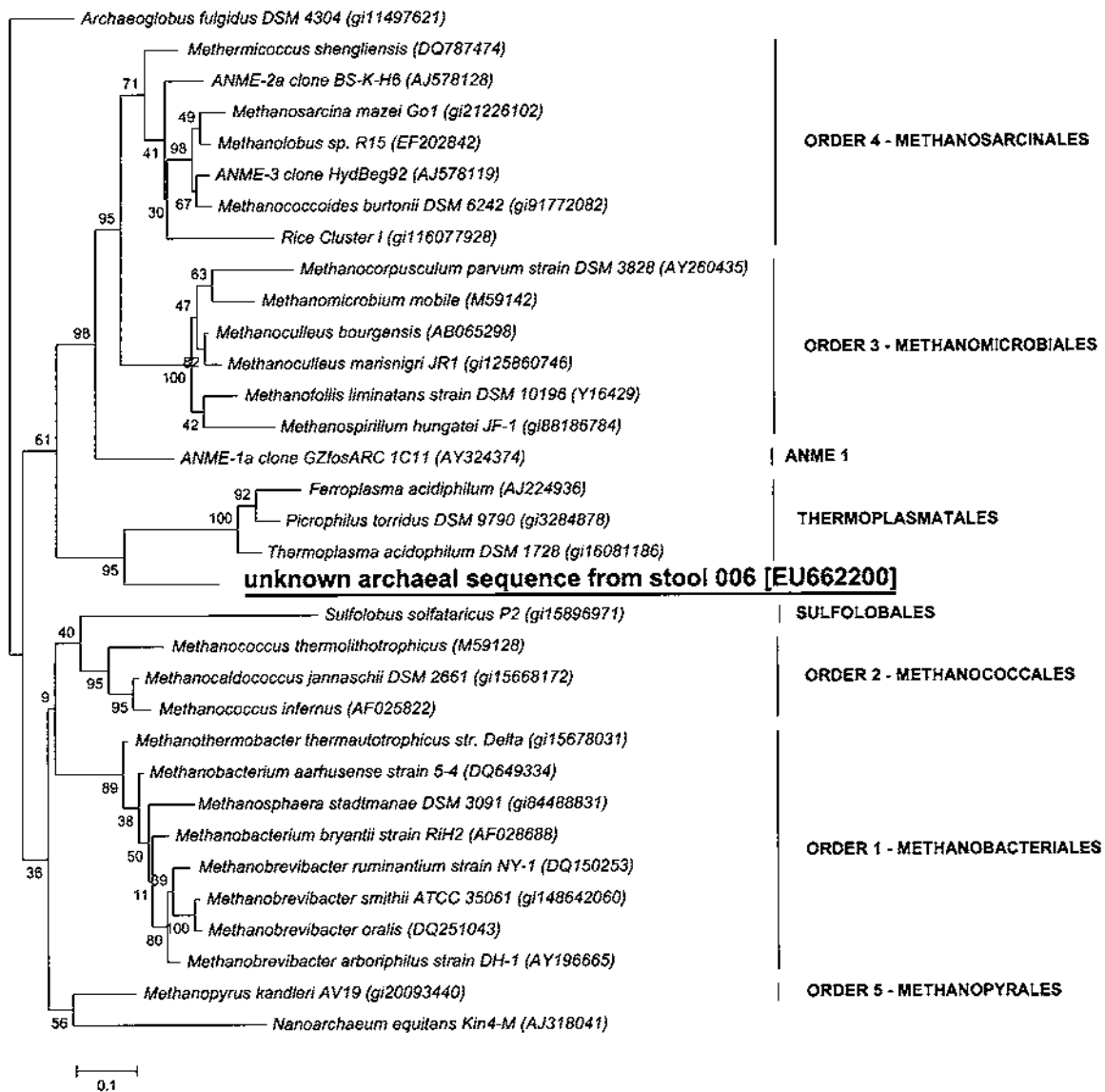


Fig. 2. Phylogenetic tree (maximum-likelihood algorithm) of archaeal SSU rRNA partial gene sequence from stools of volunteer 06. *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304 SSU rRNA gene was used as the outgroup. Accession numbers (or GI numbers for complete genome) are indicated in brackets. The scale bars stands for the estimated number of base pair changes per nucleotide sequence position. The frequency (in percent) of each ramification is also indicated.

Acknowledgements

The authors thank Eléonore Pierre for sequencing facilities in the IFR79 and Simon Loïodice and Loïc Durand for skillful technical assistance. This work was funded by a grant "Bonus Qualité Recherche" from the Université d'Auvergne to Jean-François Brugère. Agnès Mihajlovski is supported by a doctoral fellowship from the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

References

- [1] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- [2] Bapteste, E., Brochier, C., Boucher, Y. (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1, 353–363.
- [3] Chaban, B., Ng, S.Y., Jarrell, K.F. (2006) Archaeal habitats—from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52, 73–116.
- [4] Dore, J., Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Godere, I., Gouet, P., Pochart, P. (1995) Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 7–12.
- [5] Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- [6] Fricke, W.F., Seedorf, H., Henne, A., Krüger, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G., Thauer, R.K. (2006) The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J. Bacteriol.* 188, 642–658.
- [7] Friedrich, M.W., Schmitt-Wagner, D., Lueders, T., Brune, A. (2001) Axial differences in community structure of *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4880–4890.

- [8] Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 543–548.
- [9] Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O. (2005) PHYML online – a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res.* 33, W557–W559.
- [10] Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5483–5491.
- [11] Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5, 150–163.
- [12] Levitt, M.D., Furne, J.K., Kuskowski, M., Ruddy, J. (2006) Stability of human methanogenic flora over 35 years and a review of insights obtained from breath methane measurements. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 123–129.
- [13] Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W. (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521–3530.
- [14] Miller, T.L., Wolin, M.J. (1982) Enumeration of *Methanobrevibacter smithii* in human feces. *Arch. Microbiol.* 131, 14–18.
- [15] Nicholson, M.J., Evans, P.N., Joblin, K.N. (2007) Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microb. Ecol.* 54, 141–150.
- [16] O'Hara, A.M., Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688–693.
- [17] Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H., de Vos, W.M. (2007) Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.* 9, 2125–2136.
- [18] Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- [19] Shima, S., Thauer, R.K. (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 643–648.
- [20] Skillman, L.C., Evans, P.N., Naylor, G.E., Morvan, B., Jarvis, G.N., Joblin, K.N. (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10, 277–285.
- [21] Smith, J.M., Castro, H., Ogram, A. (2007) Structure and function of methanogens along a short-term restoration chronosequence in the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4135–4141.
- [22] Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- [23] Yu, Z., Morrison, M. (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 36, 808–812.

Chapitre 3 : Evaluation moléculaire du microbiote méthanogène intestinal humain révélant une augmentation de la diversité associée à l'âge de l'hôte (Article 3)

CONTEXTE ET OBJECTIFS

De nombreux facteurs sont susceptibles de jouer un rôle dans la colonisation par le microbiote méthanogène : origine ethnique, alimentation, sexe, et âge notamment. Ce dernier point a été étudié sur un panel de 63 individus appartenant à trois groupes d'âges différents, 23 nouveau-nés (âgés de 3 semaines à 10 mois), 20 adultes (âgés de 25 à 45 ans) et 20 seniors (âgés de 70 à 90 ans).

PRINCIPAUX RESULTATS

- La prévalence des Methanobacteriales (*M. smithii* et *M. Stadtmanae*) est significativement supérieure chez les adultes et les seniors par rapport aux nouveau-nés.
- 4 nouveaux phylotypes (nommés par la suite *Mx-02*, *Mx-03*, *Mx-04* et *Mx-05*) ont été mis en évidence à l'aide du marqueur moléculaire *mcrA*, et regroupés dans le même potentiel nouvel ordre d'Archaea méthanogène que *Mx-01*.
- 3 nouveaux phylotypes ont été mis en évidence à l'aide du marqueur moléculaire ADNr 16S. Tout comme le phylotype 16S retrouvé au cours des travaux précédents ces phylotypes s'affilient aux Thermoplasmatales.

- Une association quasi parfaite est obtenue entre les nouveaux phylotypes retrouvés à l'aide du marqueur *mcrA* et les phylotypes retrouvés à l'aide du marqueur ADNr 16S au sein des échantillons.

- Il y a une augmentation de la prévalence des nouveaux phylotypes *mcrA* et ADNr 16S entre les individus adultes et seniors ($p=0,065$).

PRINCIPALES CONCLUSIONS

Cette étude nous a permis de mettre en évidence qu'en plus de *Mx-01*, le tractus digestif de l'homme est colonisé par quatre autres phylotypes, nommés *Mx-02*, *Mx-03*, *Mx-04* et *Mx-05*, tous regroupés dans un même potentiel 6^{ème} ordre d'Archaea méthanogènes avec *Mx-01*. L'association quasi parfaite entre la présence des phylotypes *Mx* et des nouveaux phylotypes ADNr 16S retrouvés chez ces 63 individus repose la question concernant la co-localisation de ces deux marqueurs au sein d'une même Archaea, potentiellement méthanogène et affiliée aux Thermoplasmatales. De plus, l'étude de la distribution de ces nouveaux phylotypes a montré que l'âge influence la prévalence des membres du potentiel 6^{ème} ordre au sein de la population.

Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity

Agnès Mihajlovski,¹ Joël Doré,² Florence Levenez,² Monique Alric¹ and Jean-François Brugère^{1*}

¹Université d'Auvergne, Clermont-Université, Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) d'Auvergne, Equipe de Recherche Technologique « Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament » (ERT-18 CIDAM), Clermont-Ferrand, F-63001, France.

²Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA Jouy-en-Josas F-78352, France.

Summary

The methanogenic diversity of the human intestinal microbiota has long been viewed as composed of two Methanobacteriales: *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae*. Recently, *Mx-01*, a new phylotype hypothesized to belong to a putative sixth methanogenic order, was recovered from human faeces. Here we examined the diversity and the distribution of methanogens among healthy people of three age groups by analysing *mcrA* and 16S rDNA clones. The *mcrA* analysis of ~1200 clones revealed that the usual Methanobacteriales were present without any significant difference among adults and elderly (respectively 60% and 80% of carriers, $n = 40$, $P = 0.3$). In addition, four new phylotypes that grouped with *Mx-01* in the same monophyletic clade were recovered. These phylotypes were significantly more frequently detected in elderly people (40%, $n = 20$) than in adults (10%, $n = 20$, $P = 0.065$). In parallel, new 16S rDNA phylotypes affiliated near or within Thermoplasmatales were recovered. Altogether, these results indicate an age-related apparition of *Mx*-phylotypes, putatively methanogenic, which are formed of several species carrying a *mcrA* gene and that are not related to any of the five methanogenic orders. These species may be related to Thermoplasmatales or may cohabit with archaeal species related to Thermoplasmatales.

Received 5 June, 2009; accepted 27 October, 2009. *For correspondence. E-mail j-francois.brugere@u-clermont1.fr; Tel. (+33) 4 73 17 83 91; Fax (+33) 4 73 17 83 92.

© 2009 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd

Introduction

The adult human gastrointestinal (GI) tract is colonized by about 10^{14} microorganisms, with the highest concentration found in the large intestine ($\sim 10^{11}$ microorganisms/g of stools). The establishment of this ecosystem begins rapidly in newborn children. Indeed, within a few days after birth, the infant intestinal tract progresses from sterility to extremely dense colonization, ending with a mixture of microbes characteristic of the adult gastrointestinal tract after the second year of life (Palmer *et al.*, 2007). The adult intestinal bacterial composition has been intensively studied using both cultivation and culture-independent methods, and more recently using metagenomics (Booijink *et al.*, 2007; Brugère *et al.*, 2009). A recent estimation indicates that it consists of more than 15 000 different bacterial phylotypes belonging for the most part to two bacterial phyla: Bacteroidetes and Firmicutes (Frank and Pace, 2008). In addition to bacteria, two species of hydrogen-consuming methanogenic archaea are recognized as inhabiting the human colon of adults, *Methanobrevibacter smithii*, the predominant one (Miller *et al.*, 1982; Eckburg *et al.*, 2005) and *Methanosphaera stadtmanae* (Miller and Wolin, 1983), observed so far in a lower proportion of individuals. Recently, using a molecular-based approach, a novel phylotype (putatively methanogenic) was recovered from the stools of an elderly subject at two different times, indicating that intestinal methanogens could be more diverse than previously suspected (Mihajlovski *et al.*, 2008). This new phylotype, called *Mx-01*, does not belong to any methanogenic order described so far and was proposed to be member of a new order, i.e. a sixth order of methanogens. A similar phylotype was also retrieved once in another independent study and was described as a Methanosarcinales related to *Methanosalsum zhilinae* (Scantian *et al.*, 2008).

The microbiota is host specific and believed to remain stable throughout adulthood (Zoetendal *et al.*, 1998). However, during the ageing process, changes in the gastrointestinal tract, modification of diet and of the host immune system can affect the colonic microbiota, then allowing microbial population changes to occur (Mueller *et al.*, 2006; Woodmansey, 2007). We therefore sought to characterize the diversity and the distribution of

methanogenic archaea among healthy subjects of different ages (23 newborns, 20 adults and 20 elderly subjects) using a molecular approach associating analyses of a specific molecular metabolic marker of methanogenesis (Luton *et al.*, 2002), the α -subunit of the methyl-coenzyme M reductase gene (*mcrA*), and of the 16S rRNA gene.

Results and discussion

Sixty-nine stool samples were used in this study. They originated from 63 subjects grouped in 3 age-categories, i.e. newborns, adults and elderly subjects, respectively, from European Commission programs MEDIGUT, MICROBES and CROWNALIFE (Table 1). Total DNA was extracted from 200 mg aliquots of homogenized faeces (Suau *et al.*, 1999). The presence of the metabolic molecular marker *mcrA*, considered as specific of methanogens (Luton *et al.*, 2002) was determined using the degenerated primers pair MM_01_pSTC and MM_02 (Table 2, Mihajlovski *et al.*, 2008). A positive amplification of a part of the *mcrA* cistron (corresponding to 148 amino acids) was obtained for the stools of: 1 of the 23 newborns (with a very weak *mcrA* amplification), 12 of the 20 adults (60%) and 16 of the 20 elderly subjects (80%) (Table 1). Although culture- and breath methane measurement-based assays have reported that colonization of the gut by methanogens does not begin until 2–3 years of age (Bond *et al.*, 1971; Rutili *et al.*, 1996), methanogens have now been detected using molecular techniques during the first months of life (Stewart *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007). Palmer and colleagues (2007) described that among 14 babies, seven presented subdominant levels of methanogens in their stool during their first year of life, with 10^3 – 10^6 16S rRNA gene copy numbers recovered per gram of stool. They also indicated that this presence may be transient, as methanogens were detected in only one of the several samples collected at different ages in four newborns. Thus, the detection of only one *mcrA* positive newborn in our study may reflect a transient state with a low level of methanogens, according to the faint signal observed (data not shown). The age is a determinant factor of methanogens-carriage for newborns versus the two other groups, but is not a significant factor between adults and elderly people (respectively 60% and 80% of carriers, $n = 40$, Fisher's exact test, $P = 0.3$). Some studies suggest that there may be an increase in the concentration of methanogens in the human colon during the ageing process, as it is for the rat, in which the faecal concentrations of methanogenic archaea increase with age (Maczulak *et al.*, 1989). Breath-methane excretion tests revealed that human methane excreters are significantly more represented among the older population than among younger adults (Fernandes *et al.*, 1998).

Table 1. Presence and proportion of *M. smithii*, *M. stadtmanae*, *Mx*-phyotypes and non-Methanobacteriales archaea among the *mcrA* positive stools.

Age group	Mean age (range)	SD	Proportion of <i>mcrA</i> positive stool (%)	<i>mcrA</i>			16S rRNA gene	
				<i>M. smithii</i>	<i>M. stadtmanae</i>	<i>Mx</i>	% of the <i>mcrA</i> positive stools (reference of the positive stools)	Non-Methanobacteriales archaea
Newborns	4.9 ± 3.5 months	(3 weeks–10 months)	1/23 (4%)	0	0	1/1 (N10)	0	
Adults	33 ± 6.4 years	(25–45)	12/20 (60%)	100% [12/12]	17% [2/12] (A12, A16)	17% [2/12] (A02, A20)	25% [3/12] (A02, A08, A20)	
Elderly	79.4 ± 6.7 years	(70–96)	16/20 (80%)	100% [16/16]	25% [4/16] (E04, E11, E18, E20)	50% [8/16] (E02, E03, E04, E07, E08, E09, E18, E20)	50% [8/16] (E02, E03, E04, E07, E08, E09, E18, E20)	

Table 2. PCR primer sequences, amplicon lengths and targets.

Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Number of cycles	Amplicon length (bp)	Targets	Reference
MM_01_pSTC ^a	CC TT CgCCgACTgA TAY ATg TCl ggY ggT gTH gg	56°C	40	≈ 496	Methanogenic archaea <i>mcrA</i>	Mihajlovski et al. (2008)
MM_02	ACR TTC ATl gCR Tag TTI gg					
MM_Mbs_Fw	gCA CCT AAC AAC ACg gAC A	56°C	35	446	<i>Methanobrevibacter smithii mcrA</i>	Mihajlovski et al. (2008)
MM_Mbs_Rv	TTT ggT CCT CTC ATT TcG Ag					
MMr_Mss_Fw	TgT gCA ggA gAA gCA gCTA	56°C	35	335	<i>Methanosphaera stadtmanae mrtA</i>	Mihajlovski et al. (2008)
MMr_Mss_Rv	gCT gCA ggg ATT TcG TAIT					
MM_Mx01_Fw	TgC AAg AgC AAA CCT TCA A	56°C	35	330	Uncultured methanogen Mx-01 <i>mcrA</i>	Mihajlovski et al. (2008)
MM_Mx01_Rv	gAg TTC gAA Tgg CAg ACC T					
MM_Mx02_Fw	CAG CTC gga gAT gAC ATC AA	56°C	35	248	Uncultured methanogen Mx-02 <i>mcrA</i>	This study
MM_Mx02_Rv	ggC TgA ACC ACA CTg ATC CT					
MM_Mx03_Fw	TCC Agg TAC gga gga TTC Tg	56°C	35	288	Uncultured methanogen Mx-03 <i>mcrA</i>	This study
MM_Mx03_Rv	CTg gAg gTC gAA TCC gTA gA					
Arch 121	TTC Cgg TTg ATC Cyg Ccg gA	58°C	35	≈ 887	16S rRNA gene of non-Methanobacteriales archaea	Modified from Skillman et al. (2004)
Arch r334_pSTC ^a	CC TT CgCCgACTgA gTg CTC CCC CgC CAA TTC					
AS1_Fw	Cag CAg TCg CgA AAA CTT C	57.5°C	30	≈ 485	16S rRNA gene of Mx-01 and of newly recovered phylotypes	This study
AS2_Rv	AAC AAC TTC TCT CCg gCA C					

a. Parts in italics correspond to 14-base sequence added in order to allow orientated insertion into the pSTC1.3 vector (StabyCloning kit, Eurogentec)

More samples and quantitative molecular studies would therefore be necessary to determine if our result, also showing an increase in methanogens carriage, are of significant importance.

Among the 29 *mcrA* positive stools, 12 samples (4 from adults and 8 from elderly subjects) were chosen to construct *mcrA* clone libraries of 100 clones each. The resulting 1200 clones were arranged by AluI/Csp6I-RFLP patterns. After sequencing and BLAST analyses (Altschul et al., 1990), one clone corresponded to a chimeric sequence (detected by Bellerophon program, Huber et al., 2004), and 7 clones corresponded to non-*mcrA* sequences (or non-*mrtA* sequences, see Luton et al., 2002 for more precise explanation). They were consequently discarded. The 1192 clones left were divided into 12 different AluI/Csp6I-RFLP patterns (Table 3). Eight of these patterns (Mbs-P01 to Mbs-P08) corresponded to clones sharing 98.0–100% identity in their amino acids composition (deduced from the nucleic sequence), compared with the corresponding sequence of *M. smithii* ATCC 35061 (ABB77886). They were thus assigned to the same OTU (Table 3). Another pattern (Mbs-P09), only represented by one clone in the E18 library, had an amino acid sequence identity of 97.3% with the *M. smithii* ATCC 35061 sequence and thus was considered as a *Methanobrevibacter* sp. Altogether, these sequences represented 1107 clones in the libraries. An additional AluI/Csp6I-RFLP pattern (Mss), corresponding to a total of 27 clones, was recovered. Their corresponding sequences were identical and had an amino acid identity of 100% with the *mrtA* sequence of *M. stadtmanae* DSM 3091 (CAE48306) and were consequently assigned to the same OTU (Table 3). Two last AluI/Csp6I-RFLP patterns were recovered with corresponding sequences sharing 83.8% of identity at the amino acids level. They had *Methanopyrus kandleri* as their nearest valid taxon (amino acid sequence identity of 60.8% and 62.8%) (Table 3). These two AluI/Csp6I-RFLP patterns were assigned to two different OTUs further called *Mx-02* (ACN72205) and *Mx-03* (ACN72206), respectively, for sequences retrieved from stools E04 and from stools A02/E18.

Specific detection of the *mcrA* cistron of *M. smithii*, *Mx-01* (Mihajlovski et al., 2008), *Mx-02* and *Mx-03*, together with the *mrtA* cistron of *M. stadtmanae* was assessed for every sample (see Table 2 for PCR primer sequences). *Methanobrevibacter smithii* was recovered in every *mcrA* positive subject with the exception of the stool from newborn N10. This confirms that *M. smithii* is the most common methanogenic archaea inhabiting the human intestinal tract (Miller et al., 1982; Eckburg et al., 2005; Stewart et al., 2006; Palmer et al., 2007; Scanlan et al., 2008). *Methanosphaera stadtmanae*, which is a well-described methanogenic archaea using methanol and hydrogen as substrates (Miller and Wolin, 1983;

Table 3. Quantity, origin, nearest identified taxon and OTU affiliation of the *mcrA* clones.

RFLP pattern	Accession (GenBank)	Number of clones	Subjects	Nearest valid taxon (Accession number)	% of amino acid sequence identity	Name of the OTU
Mbs-P01	FJ752555	896	A01-A02-A10-A19-E03-E04-E07-E08-E09-E18-E20	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	99.3–100	<i>M. smithii</i>
Mbs-P02	FJ752556	201	A01-A02-E12-E18	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	98.0	
Mbs-P03	FJ752557	3	A01-E07-E20	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	99.3–100	
Mbs-P04	FJ752558	2	A02-E03	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	100	
Mbs-P05	FJ752559	1	A02	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	99.3	
Mbs-P06	FJ752560	1	E03	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	100	
Mbs-P07	FJ752561	1	E08	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	99.3	
Mbs-P08	FJ752562	1	E12	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	98.0	
Mbs-P09	FJ752563	1	E18	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	97.3	
Mbs-P01	FJ752564	27	E04-E18-E20	<i>M. stadtmanae</i> (CAE48306)	100	
Mx-02	FJ752565	1	E04	<i>M. kandleri</i> (NP-613940)	60.8	
Mx-03	FJ752566	57	A02-E18	<i>M. kandleri</i> (NP-613940)	62.8	

Fricke *et al.*, 2006), was recovered in 2/12 (17%) adults and 4/16 (25%) elderly subjects (Table 1). In addition to the *Mx-01* phylotype already described in two distinct studies of the human gut microbiota (Mihajlovski *et al.*, 2008; Scanlan *et al.*, 2008), two other *Mx*-like associated phylotypes were present. They were all recovered from stools positive for *M. smithii*, with the exception of stool N10. They were detected either individually or associated between them in 11 subjects: 1/23 newborns, 2/12 (17%) adults and 8/16 (50%) elderly subjects (Table 2). More precisely, *Mx-01* amplicons were obtained in one individual of each group, *Mx-02* amplicons in 1/12 adults and 3/16 elderly subjects and *Mx-03* amplicons in 1/12 adults and 7/16 elderly subjects (data not shown).

The *Mx-02* and the *Mx-03* *mcr* amplicons obtained from the sample E20 were cloned and six clones of each were sequenced. All the *Mx-02* *mcr* amplicons were identical to our reference sequence. The *Mx-03* *mcr* amplicons were different from the sequences retrieved from the stools A02 and E18, and were grouped into two different *Mx*-phylotypes, each deduced from 3 sequences. They were further called *Mx-04* and *Mx-05* and shared 80.5% identity at the amino acids level. The nearest *Mx*-neighbour of *Mx-04* and *Mx-05* (at the amino acids level) was *Mx-03* with, respectively, 95.1% and 78% of identity.

Alignment of the *McrA* sequence of *Mx-01*, *Mx-02* and *Mx-03* and of methanogenic and non-methanogenic lineages were performed using MUSCLE (Edgar, 2004) and refined by eyes leading to the analysis of 146 amino acids positions. *Mx-04*- and *Mx-05*-deduced *McrA* were not included in the analysis due to their small size (82 amino acids). A Minimum Evolution tree (Guindon and Gascuel, 2003), using a Dayhoff PAM matrix as amino acid replacement model and inferred with 1000 bootstraps, was constructed (Fig. 1). This tree showed that all the new *Mx* sequences were phylotypes that clustered in the novel monophyletic clade already obtained with *Mx-01*, distantly related to *McrA*-like sequences of the ANME-1 cluster (Mihajlovski *et al.*, 2008). *McrA* sequences described as component of the gastrointestinal tract of other animals are also grouped in this novel monophyletic clade, for example: sequences from the cattle rumen (Denman *et al.*, 2007), from the pig faeces (J.A. Ufnar, unpublished) and the wallaby foregut (Evans *et al.*, 2009) (Fig. 1). In the absence of functional tests, it can however, not be proven that these archaea produce methane. Therefore, it cannot be excluded that they are methane oxidizers as *mcrA* sequences are distantly related to *McrA*-like sequences from a mixed culture containing archaea that oxidized methane (ANME1, Hallam *et al.*, 2003).

Although being performed on only 40 subjects (20 adults–20 elderly), there seems to be an age-related increase in the proportion of subjects presenting *Mx* phy-

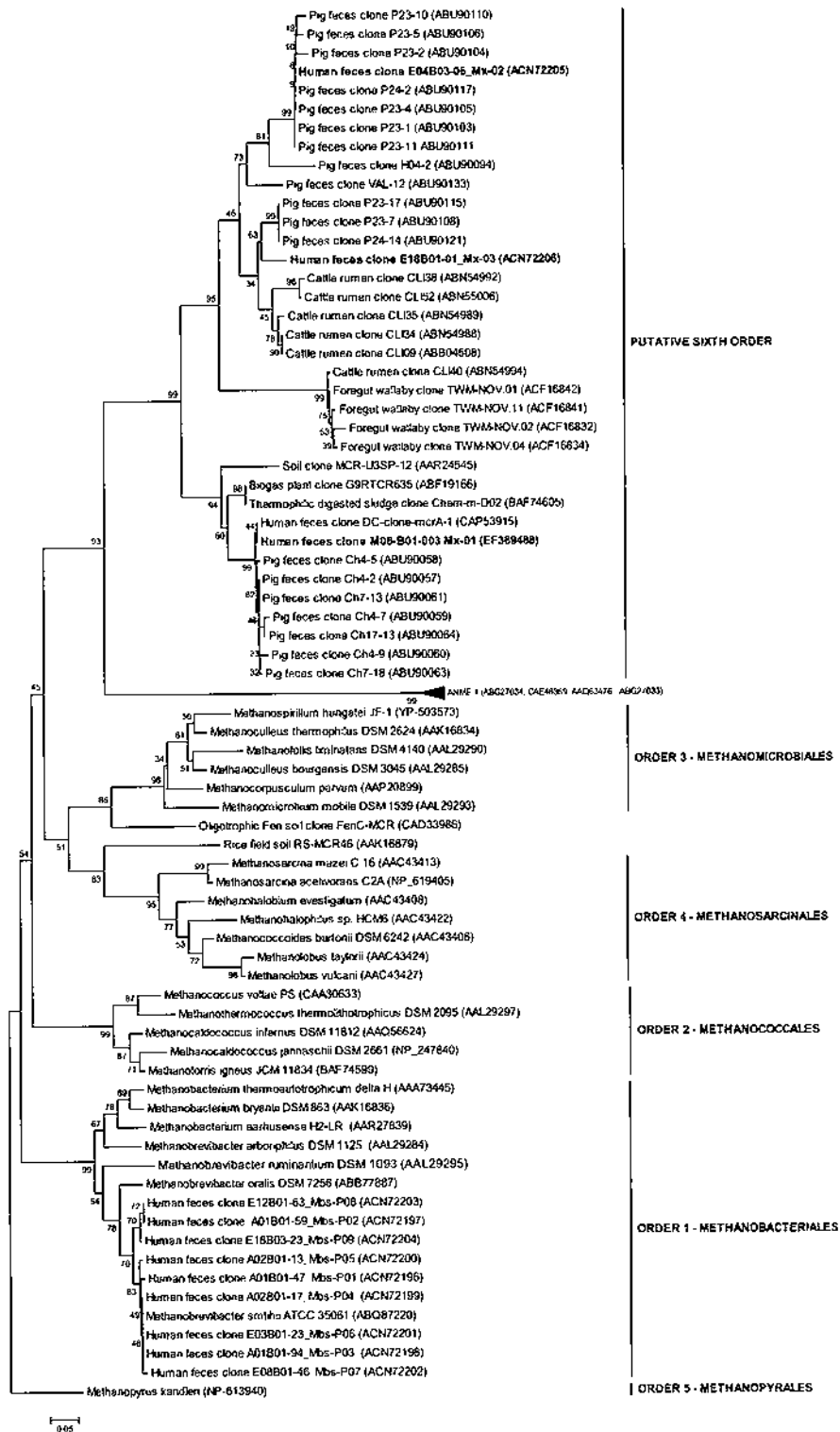


Fig. 1. Phylogenetic relationships within the methanogenic/methane-oxidizing archaea, derived from McrA partial amino acid sequences for some taxa and methanogenic archaea retrieved from the human gut. Tree were constructed using the Minimum Evolution method using a Dayhoff PAM matrix (Guindon and Gascuel, 2003). GenBank accession numbers are given in brackets. The *Methanopyrus kandleri* sequence was used as the outgroup (Luton *et al.*, 2002). The frequency (in %) of each ramification from a 1000-time bootstrap re-sampling is indicated. The scale bar represents 5% of divergence. Sequences from human faeces obtained in this study are in bold.

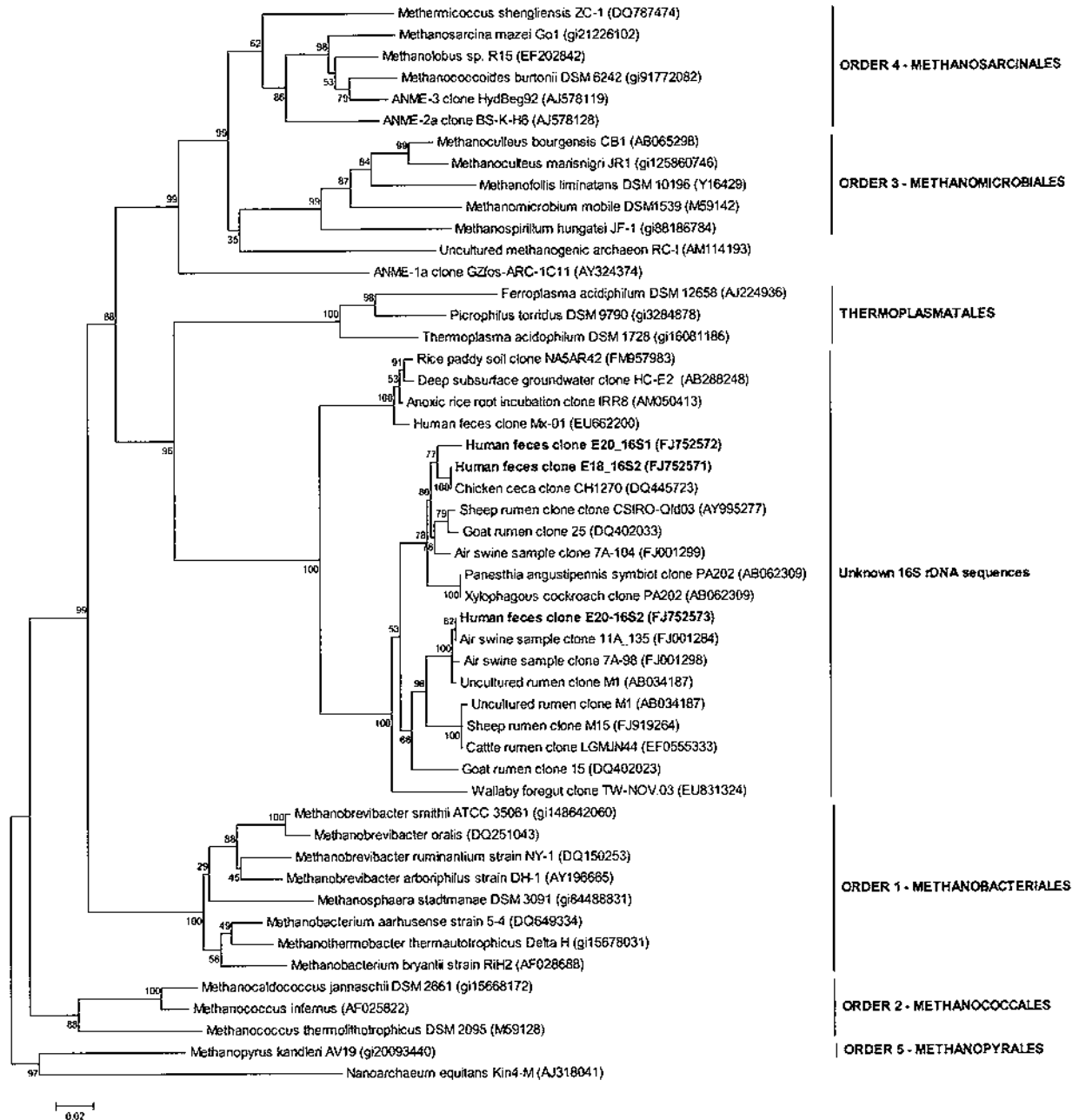


Fig. 2. Phylogenetic relationships within methanogenic and non-methanogenic lineages derived from 16S rRNA partial gene sequences of some taxa and of sequences recovered from the human gut. The tree was constructed with a NJ method and on a protein matrix calculated with a Kimura 2-Parameter correction method. GenBank accession numbers are given in brackets. The *Nanoarchaeum equitans* Kin4-M and *Methanopyrus kandleri* sequences were used as outgroups. The frequency (in %) of each ramification from a 1000-time bootstrap re-sampling is indicated. The scale bar represents 2% of divergence. Sequences from human faeces obtained in this study are in bold.

lotypes in their gastrointestinal tract (10% in adults versus 40% in elderly, Fisher's Exact test, $P = 0.065$). This may be explained by an increased transit time due to a reduction of faecal weight (Madsen, 1992; Woodmansey *et al.*, 2004), and the consequent decrease in the turnover rate of digestive contents, factor that may favour slow growing

microorganisms, i.e. methanogens (Mah *et al.*, 1977). This may be also due to a cumulative selection of archaea during lifetime by use of common antibacterial agents: their cell wall does not contain murein, the peptidoglycan of *Bacteria*, and are therefore insensitive to the antibiotics that inhibit the synthesis of cell walls in *Bacteria*, such

as penicillin, cycloserine and valinomycin (Garcia *et al.*, 2000). Moreover, they could also be insensitive to other class of antibiotics, like *M. smithii* that is highly resistant to streptomycin, gentamicin and clindamycin (antibiotics that inhibit protein synthesis), and to ciprofloxacin (antibiotic that interferes with DNA replication) (Dermoumi and Ansorg, 2001). However, as age-related changes in the faecal microbiota have been shown to vary between countries (Mueller *et al.*, 2006), these observations cannot be extrapolated to the human population worldwide.

Archaeal biodiversity was also studied with the 16S rRNA marker, in some samples that were positive for the new *Mx*-phylotypes, A02, E18 and E20. 16S rDNA clones were obtained using modified universal archaeal primers Arch f21 and Arch r934_pSTC (Table 2) that do not allow the amplification from Methanobacteriales DNA (Skillman *et al.*, 2004), and notably from *M. smithii* and *M. stadtmanae* (Mihajlovski *et al.*, 2008). Three different OTUs were recovered (A02/E18-16S, E20-16S, and E20-16S₂) sharing from 90.8% to 94.7% of identity. They were designated as three new phylotypes as no sequence identities greater than 98% were obtained with sequences from characterized organisms. The 16S rDNA sequence EU662200, which was recovered from the same sample than *Mx-01* in our previous study, shows between 84.9% and 86.8% identity with these new phylotypes. A phylogenetic analysis was performed using a neighbour-joining method on a similarity matrix calculated with a Kimura 2-Parameter correction method. The alignment of sequences was performed with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Gaps were removed from the alignment, leading to the analysis of 592 positions. This tree was inferred with 1000 bootstrap (Fig. 2). It shows that new 16S rDNA sequences clustered all in a group near or within the Thermoplasmatales lineage, together with the previously published 16S rDNA partial sequence retrieved from the same sample than *Mx-01*. A PCR primer pair was deduced from an alignment of all these sequences and used to detect non-methanobacteriales archaeal DNA in all the samples (Table 2). Comparison with the detection of the *mcrA* molecular marker revealed that (i) samples that gave a positive amplification were all *mcrA*-positive, (ii) all the *Mx*-positive samples except the newborn stool N10 were also reciprocally positive for non-methanobacteriales archaeal 16S rDNA, and (iii) the sample A08 also gave a positive signal although not determined as an *Mx* carrier. Concerning this last point, attempts to clone (and sequence) this potential archaeal 16S rRNA have yet remained unsuccessful. Technical failures have to be considered for the non-association between new *mcr* and 16S phylotypes in the newborn N10, due to a lack of sensitivity when *Mx* level may be low. However, and considering these arguments,

there is near-perfect association of 16S rDNA Thermoplasmatales-like sequences with the new *Mx* clade. This result was first suggested for *Mx-01* in our previous study (Mihajlovski *et al.*, 2008). It is also interesting to notice that the same association between *mcrA* sequences (represented by TWM-Nov clones in Fig. 1), forming a monophyletic clade distantly related to archaea that oxidized methane, and 16S rRNA gene sequences [represented by clone TW-November 03 (EU831324) in Fig. 2], affiliated with the Thermoplasmatales lineage, was recovered in a recent study, aiming at describing the wallaby foregut methanogenic composition (Evans *et al.*, 2009). It should also be noted that 16S rDNA sequences retrieved from the other digestive environments can also be affiliated with Thermoplasmatales (for example sequence DQ402033 from the goat rumen, sequence AB034187 from the bovine rumen (Tajima *et al.*, 2001), sequence DQ445723 from chicken ceca (Saengkerdsut *et al.*, 2007), sequence AB062309 from the gut of xylophagous cockroaches (Hara *et al.*, 2002). It can be concluded that the human gut is inhabited by microorganisms that carry a *mcrA* cistron, probably forming a new clade of either a sixth order of methanogens, or of anaerobic methane oxidizers. These organisms are either uncharacterized archaea that are closely related to Thermoplasmatales or are microorganisms that are associated, and probably interdependent with an uncharacterized archaea family that is closely related to Thermoplasmatales. These organisms are surprisingly shared among various animals and seem also to be more frequently associated to the gut microbiota of elderly.

Acknowledgements

The authors thank Eléonore Pierre, Patricia Combes and Fernande Gauthier for the sequencing facilities in the IFR79, and Philippe Renon for helpful discussion concerning methanogens distribution among age-groups. They also thank Mathieu Kohon and Pauline Rougeron for skilful technical assistance. Agnès Mihajlovski is supported by a doctoral fellowship from the French 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Bond, J.H., Jr, Engel, R.R., and Levitt, M.D. (1971) 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* **133**: 572–588.
- Booijink, C.C., Zoetendal, E.G., Kleerebezem, M., and de Vos, W.M. (2007) Microbial communities in the human

- small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol* **2**: 285–295.
- Brugere, J.F., Mihajlovski, A., Missaoui, M., and Peyret, P. (2009) Tools for stools: the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **9**: 353–365.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., and McSweeney, C.S. (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 313–322.
- Dermoumi, H.L., and Ansorg, R.A. (2001) Isolation and antimicrobial susceptibility testing of fecal strains of the archaeon *Methanobrevibacter smithii*. *Chemotherapy* **47**: 177–183.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635–1638.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 113–131.
- Evans, P.N., Hinds, L.A., Sly, L.I., McSweeney, C.S., Morrison, M., and Wright, A.D. (2009) Community composition and density of methanogens in the foregut of the Tamar wallaby (*Macropus eugenii*). *Appl Environ Microbiol* **75**: 2598–2602.
- Fernandes, J., Wolever, T.M., and Rao, A.V. (1998) Increased serum cholesterol in healthy human methane producers is confounded by age. *J Nutr* **128**: 1349–1354.
- Frank, D.N., and Pace, N.R. (2008) Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* **24**: 4–10.
- Fricke, W.F., Seedorf, H., Henne, A., Kruer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., et al. (2006) The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal Archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol* **188**: 642–658.
- Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe* **6**: 205–226.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**: 696–704.
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5483–5491.
- Hara, K., Shinzato, N., Seo, M., Oshima, T., and Yamagishi, A. (2002) Phylogenetic analysis of symbiotic archaea living in the gut of xylophagous cockroaches. *Microbes Environ* **17**: 185–190.
- Huber, T., Faulkner, G., and Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317–2319.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521–3530.
- Maczulak, A.E., Wolin, M.J., and Miller, T.L. (1989) Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2468–2473.
- Madsen, J.L. (1992) Effects of gender, age, and body mass index on gastrointestinal transit times. *Dig Dis Sci* **37**: 1548–1553.
- Mah, R.A., Ward, D.M., Baresi, L., and Glass, T.L. (1977) Biogenesis of methane. *Annu Rev Microbiol* **31**: 309–341.
- Mihajlovski, A., Alric, M., and Brugere, J.F. (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.
- Miller, T.L., and Wolin, M.J. (1983) Oxidation of hydrogen and reduction of methanol to methane is the sole energy source for a methanogen isolated from human feces. *J Bacteriol* **153**: 1051–1055.
- Miller, T.L., Wolin, M.J., de Macario, E.C., and Macario, A.J. (1982) Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Appl Environ Microbiol* **43**: 227–232.
- Mueller, S., Saunier, K., Hanisch, C., Norin, E., Alm, L., Midtvedt, T., et al. (2006) Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1027–1033.
- Palmer, C., Bik, E.M., Digiulio, D.B., Relman, D.A., and Brown, P.O. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**: e177.
- Rutili, A., Canzi, E., Brusa, T., and Ferrari, A. (1996) Intestinal methanogenic bacteria in children of different ages. *New Microbiol* **19**: 227–243.
- Saengkerdsud, S., Anderson, R.C., Wilkinson, H.H., Kim, W.K., Nisbet, D.J., and Ricke, S.C. (2007) Identification and quantification of methanogenic Archaea in adult chicken ceca. *Appl Environ Microbiol* **73**: 353–356.
- Scanlan, P.D., Shanahan, F., and Marchesi, J.R. (2008) Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol* **8**: 79.
- Skillman, L.C., Evans, P.N., Naylor, G.E., Morvan, B., Jarvis, G.N., and Joblin, K.N. (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**: 277–285.
- Stewart, J.A., Chadwick, V.S., and Murray, A. (2006) Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Letts Appl Microbiol* **43**: 58–63.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., and Dore, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4799–4807.
- Tajima, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., and Aminov, R.I. (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**: 67–72.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.

280 A. Mihajlovski et al.

Woodmansey, E.J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* **102**: 1178–1186.

Woodmansey, E.J., McMurdo, M.E., Macfarlane, G.T., and Macfarlane, S. (2004) 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* **70**: 6113–6122.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., and De Vos, W.M. (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3854–3859.

DISCUSSION

Diversité des Archaea colonisant le tractus digestif de l'homme

Les travaux menés au cours de cette thèse ont eu pour but d'enrichir notre connaissance du microbiote associé au tractus digestif humain et en particulier de mieux appréhender un élément majeur du microbiote hydrogénotrophe, sa composante méthanogène. Les études ont consisté à rechercher par méthodes moléculaires, directement à partir de l'ADN extrait de selles, la présence et la diversité des Archaea méthanogènes colonisant le tractus digestif de l'homme, en considérant l'âge des individus.

Soulignons que pour des raisons scientifiques et matérielles deux autres types d'approches n'ont pas été utilisés. La première, une approche par culture microbiologique classique, présente l'inconvénient de ne donner qu'une vue restreinte de la diversité naturelle d'un écosystème microbien (Aman *et al.* 1995). Ceci est d'autant plus vrai pour les Archaea méthanogènes qui sont strictement anaérobies et ont une croissance lente et dépendante de nombreux cofacteurs, ce qui les rend pour la plupart difficilement cultivables et isolables. De plus, une telle approche aurait nécessité de travailler directement sur échantillons frais, pour optimiser les chances de réussite. Enfin, l'identification précise des micro-organismes par culture classique reste délicate. Néanmoins, utiliser cette méthode aurait eu l'intérêt de mettre en évidence, de manière quantitative et potentiellement fonctionnelle (production de méthane), les Archaea méthanogènes vivantes et cultivables. La deuxième approche, la mesure de méthane dans l'air expiré, ne permet de déterminer la présence d'Archaea méthanogènes au sein du microbiote colique qu'à partir d'un seuil de 10^8 cellules par gramme de selles (McKay *et al.*, 1985). Elle ne permet pas non plus une identification précise des micro-organismes. Elle aurait pu être utilisée comme approche complémentaire, cependant elle est difficile à mettre en œuvre car elle nécessite le déplacement de l'ensemble des sujets inclus dans les études sur le site d'expérimentation.

L'approche moléculaire choisie, déjà validée dans d'autres écosystèmes, a été tout d'abord appliquée à un nombre restreint d'individus âgés de 25 à 69 ans (article 2). Elle a montré qu'en ciblant à la fois le marqueur moléculaire métabolique spécifique de la méthanogenèse *mcrA* et l'ADNr 16S, avec les techniques retenues (cf. infra), elle permettait de détecter des Archaea jusque là jamais mises en évidence dans le tractus digestif de l'homme. Aussi, cette approche a été mise en œuvre sur un plus grand nombre d'individus au cours d'une deuxième étude, à savoir 63 individus appartenant à trois groupes d'âge différents : 23 nouveau-nés (de 3 semaines à 10 mois), 20 adultes (de 25 à 45 ans) et 20 seniors (de 70 à 90 ans). Cette dernière étude (Article 3) a de ce fait permis d'appréhender les variations du microbiote méthanogène en fonction de l'âge des individus.

Etude de la diversité des Archaea méthanogènes sur la base du marqueur mcrA

Le marqueur moléculaire métabolique *mcrA* a été choisi afin d'étudier la diversité des Archaea méthanogènes colonisant le tractus digestif de l'homme et ceci pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le cistron *mcrA* code pour la sous-unité α de la méthyle-coenzyme M reductase (MCR, EC 2.8.4.1), enzyme qui catalyse la dernière étape de la méthanogenèse et en est spécifique. Il faut toutefois noter que MCR est également retrouvé chez les Archaea oxydant le méthane en anaérobiose (Hallam *et al.*, 2003, Lloyd *et al.*, 2006) chez lesquelles l'oxydation du méthane passerait par une inversion de plusieurs étapes de la méthanogenèse (Hallam *et al.*, 2003, Hallam *et al.*, 2004). De plus, les phylogénies *mcrA* sont similaires aux phylogénies d'ADNr 16S, ce qui sous-entend que le cistron *mcrA* n'est pas sujet à transfert horizontal et peut donc être utilisé comme marqueur phylogénétique des Archaea méthanogènes (Luton *et al.*, 2002).

Des amorces dégénérées ont été obtenues après alignement ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) d'un grand nombre de séquences *mcrA* issues i) de plusieurs représentants cultivés ou non, de chacun des cinq ordres méthanogènes décrits, ii) d'Archaea oxydant le méthane en

Tableau 1. Séquence des amorces dégénérées ciblant le cistron *mcrA* des Archaea méthanogènes et méthanotrophes

Amorce	Sequence (5'- 3')	Taille de l'amplicon (pb)
MM_01	TAY ATg TCI ggY ggT gTH gg	* ≈ 496
MM_01_pSTC ^a	<i>CCTTCgCCgACTgA</i> TAY ATg TCI ggY ggT gTH gg	
MM_02	ACR TTC ATI gCR Tag TTI gg	

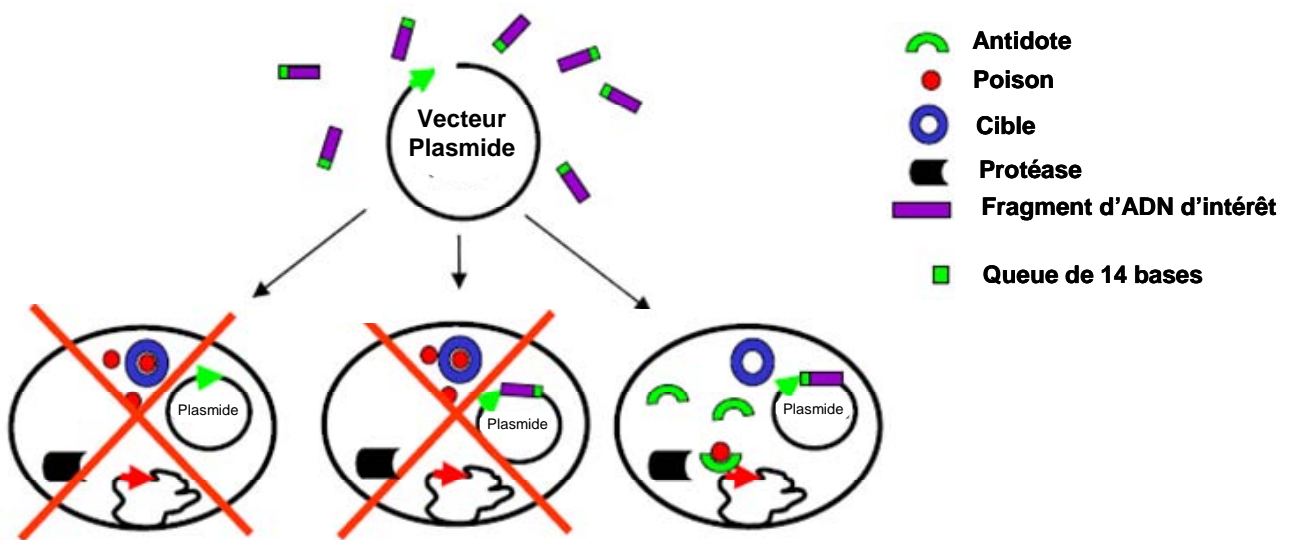


Figure 1 : Principe du clonage utilisant le système StabyCloning

anaérobie, les ANME 1 (Hallam *et al.*, 2003) et iii) de la séquences *mrtA* de *M. stadtmanae* (Fricke *et al.*, 2006), seul méthanogène connu à ce jour ne présentant pas l'opéron *mcr*. Les amorces issues de l'analyse visuelle de la séquence consensus obtenue après alignement sont présentées dans le tableau 1. Sur l'amorce MM-01, une queue oligonucléotidique a été rajoutée, donnant ainsi l'amorce modifié MM_01_pSTC, ce qui permet le clonage orienté dans le vecteur pSTC 1.3 du kit « StabyCloning » de la société Delphi Genetics. En effet, le chromosome des bactéries compétentes, fournies avec le kit, code pour un poison mortel pour la cellule, et seuls les vecteurs présentant un insert orienté de manière à permettre la synthèse d'un antidote assurent la survie et la reproduction de la bactérie (Figure 1). Une première phase expérimentale, à la fois de mise au point, de validation et de comparaison avec d'autres méthodes, a été effectuée en association avec le fabricant (Annexe I : Technical Note Delphi Genetics Inc.). Les travaux réalisés au cours de cette thèse représentent un total de 16 banques de 100 clones chacune (4 pour la première étude et 12 pour la deuxième). L'utilisation de ce kit de clonage a permis de grandement faciliter l'analyse des profils RFLP (à chaque séquence différente, un et un seul profil RFLP). Par la suite, au moins un clone par profil a été séquencé, au sein de chaque banque. Des analyses phylogénétiques des séquences mises en évidence ont ensuite été réalisées.

Le marqueur *mcrA* a ainsi permis la mise en évidence de huit phylotypes distincts, en considérant 98 % d'identité entre séquences protéiques (*McrA*) comme valeur seuil délimitant deux OTUs (Article 2 et 3).

Trois de ces huit phylotypes correspondaient à des Methanobacterales, dont deux d'entre eux à *M. smithii* et *M. stadtmanae*. Que l'analyse soit globale ou individu par individu, *M. smithii* a été l'Archaea méthanogène la plus représentée dans les banques de clones. En effet sur les 16 banques analysées, 11 étaient exclusivement constituées de clones correspondant à cette Archaea méthanogène (100 clones sur 100) et sur l'ensemble des banques, elle a été représentée par 1487 / 1600 clones (soit par environ 93 % des clones). *M. stadtmanae*, quant à elle, a été représentée par un nombre de clones plus restreint, à savoir 29 au total retrouvés dans 4 des 16 banques. Un troisième phylotype, représenté uniquement par un clone dont la séquence McrA déduite présentait 97,3 % d'identité avec celle de *M. smithii* (ATCC 35061) a

également été mis en évidence et considéré comme un phylotype du genre *Methanobrevibacter* différent, quoique proche, des espèces *M. smithii* retrouvées chez l'homme. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature montrant que *M. smithii* est l'Archaea méthanogène la plus fréquemment retrouvées chez l'homme et qu'elle est parfois, mais rarement, associée à *M. stadtmanae* (Miller *et al.*, 1982, Eckburg *et al.*, 2005, Stewart *et al.*, 2006, Palmer *et al.*, 2007, Scanlan *et al.*, 2008).

Cinq autres phylotypes, nommés de *Mx-01* à *Mx-05*, ont également été mis en évidence. *Mx-01*, *Mx-02* et *Mx-03* ont été retrouvés par l'analyse des banques *mcrA*. Les deux autres phylotypes, *Mx-04* et *Mx-05* ont été, quant à eux, mis en évidence *via* l'analyse des amplifications préalablement supposées spécifiques, du cistron *mcrA* de *Mx-01*, *Mx-02* et *Mx-03*. Dans le cas présent, *Mx-04* et *Mx-05* sont issus de l'analyse de l'amplification « spécifique » du cistron *mcrA* de *Mx-03* obtenu à partir des selles E20 (Article 3). Ces résultats semblent indiquer que d'autres phylotypes sont présents dans le tube digestif de l'homme, mais n'ont pas été mis en évidence jusque là faute d'outils suffisamment discriminants. Dans tous les cas, l'identité entre les diverses séquences protéiques McrA correspondant aux *Mx* était comprise entre 69,0 % et 95,1 %. Aucune identité supérieure à 98 % n'a été retrouvée avec un taxon connu, confirmant que ces cinq OTU sont bien distincts et ne correspondent à aucun micro-organisme précédemment caractérisé. Les analyses phylogénétiques menées au cours de ces travaux (Articles 2 et 3) montrent que l'ensemble de ces séquences forment un groupe monophylétique qui ne peut être rattaché à aucun des 5 ordres méthanogènes décrits à ce jour. Il est par contre apparenté de manière éloigné aux ANME 1, un groupe d'Archaea oxydant le méthane en anaérobiose (Hallam *et al.*, 2003, Lloyd *et al.*, 2006). Ces résultats ne permettent donc pas d'inférer du métabolisme des phylotypes *Mx*. En effet, la question de savoir si ces micro-organismes sont des Archaea méthanogènes, des Archaea méthanotrophes anaérobies, ou d'autres types de micro-organismes reste entière à la vue de ces résultats. Par la suite, nous parlerons cependant des micro-organismes *Mx* comme étant les membres d'un potentiel 6^{ème} ordre d'Archaea méthanogènes.

Tableau 2. Identité entre les séquences *mcrA* de *Mx-01*, *Mx-02*, *Mx-03*, *Mx-04* et *Mx-05*

	<i>Mx-01*</i>	<i>Mx-02*</i>	<i>Mx-03*</i>	<i>Mx-04**</i>	<i>Mx-05**</i>
<i>Mx-01*</i>					
<i>Mx-02*</i>	72,1 %				
<i>Mx-03*</i>	72,8 %	78,4 %			
<i>Mx-04**</i>	69,3 %	81,0 %	91,9 %		
<i>Mx-05**</i>	71,3 %	77,4 %	79,0 %	81,5 %	

* séquences de 442 à 445 pb

** séquences de 248 à 254 pb

L'identité moyenne des séquences nucléiques *mcrA* entre les Archaea méthanogènes faisant partie d'une même famille est de 79 % et s'échelonne de 71,7 à 83,2 selon les ordres et les familles considérés (Steinberg & Regan, 2008). Si les différents phylotypes *Mx* retrouvés au cours de ces études sont des Archaea méthanogènes, on peut utiliser l'identité entre séquences des différents phylotypes afin de présumer de leurs regroupements et de l'étendue de ce 6^{ème} ordre. Ainsi, la séquence *mcrA* de *Mx-01* ne présente qu'entre 69,3 % et 72,8 % d'identité avec les autres séquences *Mx* (Tableau 2) ce qui suggère la présence d'au moins 2 familles distinctes au sein de ce 6^{ème} ordre putatif. Cependant, cette analyse peut être remise en cause par deux points : i) seules 248 pb sont considérées dans l'analyse pour *Mx-04* et *Mx-05*, contre 442 à 445 pb pour les autres séquences *Mx*, ce qui peut fausser la valeur de l'identité, et ii) ces valeurs peuvent n'avoir aucun sens si le gène *mcr* des espèces *Mx* est non-fonctionnel et donc non-soumis aux mêmes pressions de sélection (vitesse évolutive plus rapide).

Enfin, notons qu'une identité de 100 % a été retrouvée entre la séquence McrA de *Mx-01* et celle d'un clone issu de fèces humaines (Scanlan *et al.*, 2008). De plus, l'ensemble des séquences McrA, correspondant aux phylotypes *Mx* retrouvés dans ces études, présente des identités élevées (> 80 %) avec des séquences retrouvées dans le tractus digestif d'autres animaux et notamment du porc (Ufnar *et al.* non publié), du bovin (Denman *et al.*, 2007) et du wallaby (Evans *et al.*, 2009). Des identités protéiques supérieures à 98 % ont notamment été retrouvées entre les séquences McrA de *Mx-01* et *Mx-02* avec les séquences déduites de clones issus du rumen bovin (Ufnar *et al.*, non publié). Ainsi, les phylotypes proches de *Mx* sont également retrouvés dans le tractus digestif d'autres animaux, monogastriques ou ruminants, et pour certains, ne sont donc pas spécifiques à l'homme. Il est également intéressant de noter que d'après les phylogénies McrA, *Mx-01* est également affilié à un clone issu de l'environnement et notamment des eaux marécageuses de Floride (clone MCR-U3SP-12, (Castro *et al.*, 2004)), montrant que les micro-organismes constituant ce nouvel ordre ne sont pas exclusivement retrouvés dans les écosystèmes digestifs.

Lors d'amplifications PCR réalisées à l'aide d'amorces dégénérées, la proportion entre les différents amplicons varie notamment en fonction de la température d'hybridation choisie

(Lueders & Friedrich, 2003). Ainsi, la proportion des clones représentant les différents membres d'une communauté microbienne ne permet pas de présumer de l'abondance de chaque phylotype dans l'écosystème analysé. De ce fait, il est possible que l'analyse de banques de 100 clones ne donne qu'une vision trompeuse de la réelle abondance des phylotypes *mcrA* présents dans ces échantillons. De plus, se restreindre à analyser 100 clones par banque introduit très probablement aussi un biais quant à la richesse effective de l'échantillon : ceci peut être notamment illustré pour les selles E20 (Article 3), selles pour lesquelles l'analyse de 100 clones *mcrA* n'a révélé la présence que de *M. smithii* et de *M. stadtmanae* alors que ces selles renferment en plus *Mx-02*, *Mx-04* et *Mx-05* d'après les analyses complémentaires menées. L'analyse *in silico* des séquences *mcrA* de ces 3 derniers phylotypes montre que les profils RFLP correspondant à chacun d'entre eux sont différents de ceux obtenus pour *M. smithii* et *M. stadtmanae*, signifiant que ces derniers sont effectivement absents de la banque *mcrA* du sujet E20. Enfin, seul un nombre restreint de clones a été séquencé pour chaque profil RFLP différent. Or, il n'est pas exclu que deux phylotypes distincts présentent des profils de restriction identiques. De ce fait, il est probable que la diversité observée lors de ces analyses ne soit qu'une sous-estimation de la réelle diversité.

Etude de la diversité des Archaea sur la base du marqueur ADNr 16S

Une étude de la diversité des Archaea a également été menée en parallèle de la recherche des Archaea méthanogènes. Celle-ci a nécessité l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S, l'une des cibles moléculaires les plus souvent utilisées dans les études de diversité microbienne. Elle a été réalisée par amplification PCR, clonage et séquençage. Les amorces choisies ont été : Arch f21 (5'TTCCggTTgATCCYgCCggA3') (Zheng *et al.*, 1996) et Arch r934 (5'gTgCTCCCCgCCAATTC3') (Skillman *et al.*, 2004). Ces amorces sont spécifiques du domaine des Archaea et leur analyse *via* la *Ribosomal Data Base Project Release 10* (<http://rdp.cme.msu.edu/>) a montré que ce couple ne permettait pas l'amplification de l'ADNr 16S de *M. smithii* et de *M. stadtmanae*. De ce fait, ce couple d'amorce a été choisi de manière à étudier la diversité des Archaea autres que les Methanobacterales classiquement retrouvées au

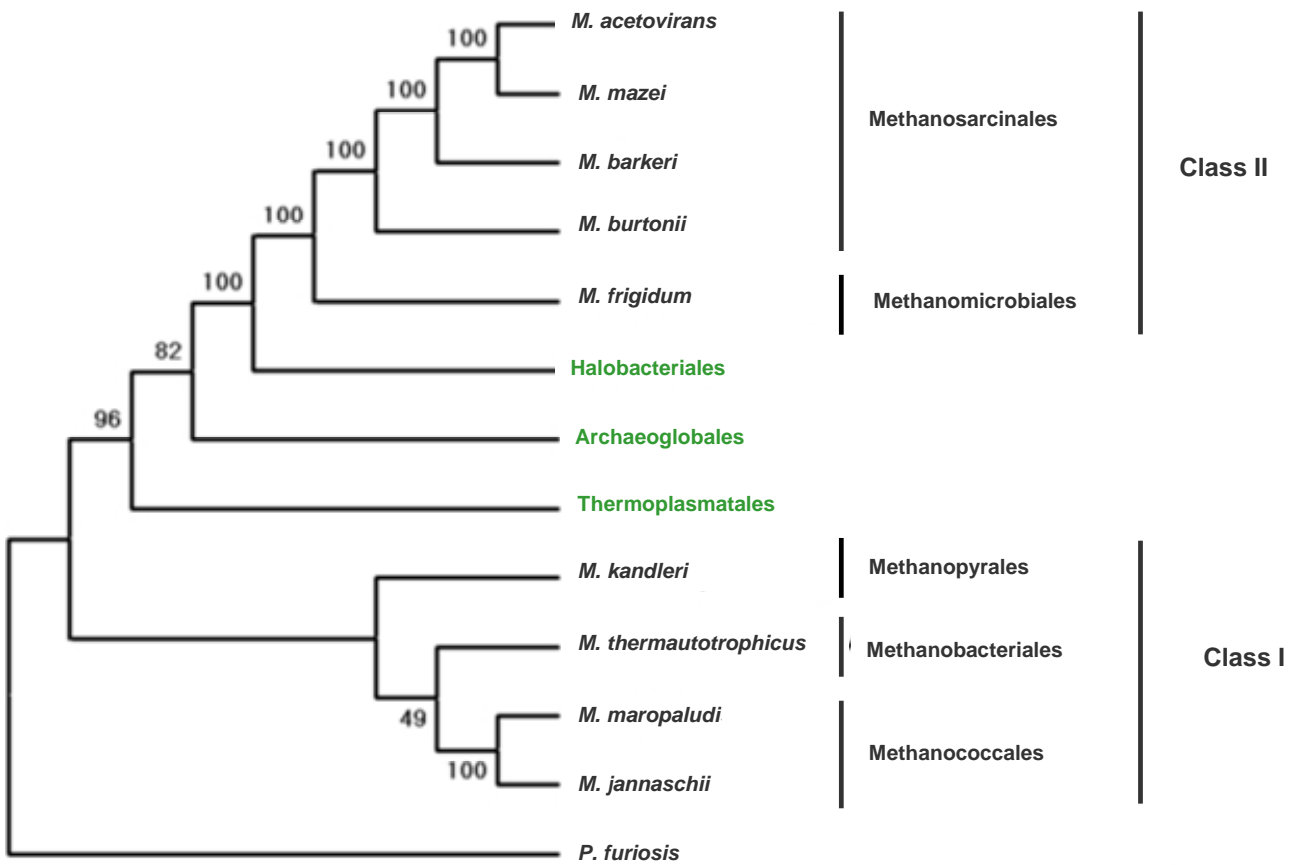


Figure 2. Phylogénie des méthanogènes déduite de l'analyse de 53 protéines ribosomales (Modifié à partir de Baptiste *et al.* 2005)

sein des échantillons. Ces amorces ont ensuite été utilisées pour l'amplification du marqueur ADNr 16S sur des selles *Mx* positives : *Mx-01* positive (selles 006, Article 2), *Mx-03* positives (selles A02 et E18, Article 3) et selles *Mx-02*, *Mx-04* et *Mx-05* positives (selles E20, Article 3). De 2 à 6 clones ont été séquencés pour chacune des selles. Ceci a permis de mettre en évidence la présence de 4 phylotypes partageant de 84,9 à 94,7 % d'identité entre séquences. Aucun de ces phylotypes ne présentait d'identité supérieure à 98 % avec un micro-organisme caractérisé.

Les analyses phylogénétiques menées sur ces 4 nouveaux phylotypes ont montré qu'ils sont regroupés avec d'autres séquences ADNr 16S correspondant à des clones provenant d'organismes issus d'analyses menées sur le tractus digestif de nombreux animaux, notamment : le rumen des chèvres (Tajima *et al.*, 2001), le caecum du poulet (Saengkerdsub *et al.*, 2007) et le tractus digestif du wallaby (Evans *et al.*, 2009). De plus, tout comme pour les séquences *mcrA*, ce groupe ne peut être rattaché à aucun des cinq ordres méthanogènes décrit à ce jour. Par contre, il est apparenté à l'ordre des Thermoplasmatales, renfermant des micro-organismes thermoacidophiles (Reysenbach & Cady, 2001) et qui s'intercale entre les Classes I et II des Archaea méthanogènes (Baptiste *et al.*, 2005), comme le montre la Figure 2.

**Les deux marqueurs moléculaires *mcrA* et ADNr 16S sont-ils associés
au sein d'une seule et même Archaea ?**

L'amplification de l'ADNr 16S de l'ensemble des nouveaux phylotypes, mis en évidence au cours des deux études, a permis de montrer que ces derniers étaient retrouvés pour chaque selle *Mx* positive, à une exception près. Une telle association entre la présence de séquences *mcrA* et ADNr 16S a également été mise en évidence au cours d'une étude récente menée par Evans *et al.* (2009). Dans cette étude, un nouveau phylotype *mcrA*, également apparenté de manière éloignée aux ANME-I, a été retrouvé en parallèle à un phylotype ADNr 16S s'affiliant au Thermoplasmatales (Evans *et al.*, 2009). Enfin, cette même association a également été retrouvée lors de la détermination des conditions de maintien en culture du phylotype *Mx-01* (Cf p. 83). L'hypothèse la plus simple consiste à supposer qu'il s'agit de deux types de micro-organismes indépendants l'un de l'autre, et dont la co-localisation n'est que le fruit du hasard. Deux arguments vont dans ce sens. En effet, il a été observé une absence d'amplification du marqueur 16S chez un individu porteur de *Mx* (nouveau né N10, article 3), et inversement, une absence d'amplification du marqueur *mcrA* chez un individu pour lequel une amplification ADNr 16S d'Archaea avait été obtenue (Adulte A18, article 3). Cependant, le fait que le nouveau-né N10 présentait une très faible amplification *mcrA* et l'impossibilité technique d'avoir pu vérifier que l'amplification ADNr 16S obtenue pour l'individu A18 correspondait effectivement à une Thermoplasmatale, ne nous permet pas d'être catégorique sur l'indépendance de ces 2 types de micro-organismes. Deux autres hypothèses qui permettraient d'expliquer cette co-localisation, retrouvée dans des conditions très variables, à savoir au sein de deux écosystèmes digestifs différents (celui de l'homme et celui du wallaby) ainsi que dans des cultures *in vitro* (Cf p. 83), restent alors envisageables :

- soit il s'agit de deux types de micro-organismes co-évoluant ensemble. A titre d'exemple ce dernier type de relation a notamment été récemment mise en évidence pour deux Archaea : *Nanoarchaeum equitans* (Euryarchaeota) et *Ignicoccus hospitalis* (Crenarchaeota). Dans cette exemple, *N. equitans* ne peut

être cultivé en l'absence de *I. hospitalis*, alors que ce dernier se développe bien sans son symbiote putatif (Huber *et al.*, 2002).

- soit chaque marqueur *Mx-mcrA* et ADNr 16S d'Archaea mis en évidence appartient à un seul et même micro-organisme. Cette dernière hypothèse revêt un intérêt concernant l'évolution des Archaea méthanogènes. En effet, les Classes I et II des méthanogènes sont séparées par des lignées non-méthanogènes : les Thermoplasmatales, les Archaeoglobales et les Halobacteriales. Ceci suggère que la méthanogenèse a été perdue au moins 3 fois au cours de l'évolution des Euryarchaeotes comme suggéré récemment (Gribaldo & Brochier-Armanet, 2006). La mise en évidence de la présence du cistron *mcrA* (de manière résiduelle ou bien réellement impliqué dans les voies de la méthanogenèse ou de la méthanotrophie) au sein d'un micro-organisme s'affiliant aux Thermoplasmatales d'après les phylogénies de l'ADNr 16S, serait un élément supplémentaire confirmant cette hypothèse.

La mise en évidence de la co-localisation de ces deux marqueurs au sein d'une même cellule par FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization), ou par amplification de ces deux marqueurs sur une souche isolée, ou encore par une analyse génomique globale menée sur culture enrichie, sont autant d'approches qui confirmeraient ou non la justesse d'une telle hypothèse.

***Mx*: méthanogènes, méthanotrophes ou autre ?**

Les phylogénies *McrA* montrent que le nouveau potentiel 6^{ème} ordre d'Archaea méthanogènes est apparenté de manière éloignée à un groupe d'Archaea réalisant l'oxydation anaérobie du méthane, les ANME I (Hallam *et al.*, 2003). Chez ces dernières, l'oxydation anaérobie du méthane passerait par une inversion de plusieurs étapes de la méthanogenèse, ce qui expliquerait notamment la présence du cistron *mcrA* au sein de leur génome (Hallam *et al.*, 2003, Hallam *et al.*, 2004). Qu'en est-il alors du métabolisme des nouveaux phylotypes retrouvés au cours de nos travaux ?

Un premier élément de réponse serait de dire que les séquences *mcrA* des phylotypes *Mx* ne présentent pas la signature spécifique des ANME-1, représentée par une séquence riche en cystéine de type CCX₄CX₅C (Shima & Thauer, 2005) et de ce fait seraient bien des Archaea méthanogènes. Il faut toutefois noter que les ANME 2 (un autre groupe d'AMOs non affilié aux ANME 1), également suspectées d'inverser plusieurs étapes de la méthanogenèse, ne présentent pas cette signature. Il ne peut donc être totalement exclu que les membres de ce potentiel nouvel ordre soit des Archaea oxydant le méthane.

Un deuxième élément est apporté par des expériences préliminaires non décrites dans ce manuscrit. Il m'a été possible de maintenir *Mx-01* en culture. Le maintien de ce phylotype a pu être réalisé au cours de 10 repiquages (à ce jour) dans un milieu DZM141, additionné de méthanol à une concentration de 10 mM, d'ampicilline à 500 mg/L et incubé à 37°C sous une pression de 1 bar de CH₄ ou de N₂. Il a été mis en évidence que la détection de *Mx-01* (après 21 jours de culture) *via* l'amplification spécifique du cistron *mcrA* est associée à la présence de méthane dans l'atmosphère des tubes de culture (de l'ordre de 0,5 %), et ce, en l'absence de détection par PCR de *M. smithii* et de *M. stadtmanae*, (en ciblant spécifiquement le cistron *mcrA*). Ces résultats préliminaires viennent appuyer l'hypothèse que les membres du potentiel 6^{ème} ordre d'Archaea méthanogènes mis en évidence seraient effectivement méthanogènes et

non méthanotrophes. Il ne faut toutefois pas écarter la possibilité que cette production de méthane soit le fruit de l'activité i) d'une ou de plusieurs autres Archaea méthanogènes n'ayant pas été mis en évidence par l'approche utilisée, ii) de *M. smithii* ou de *M. stadtmanae* présents dans les tubes de cultures à des valeurs inférieures au seuil de détection de la technique employée, ou encore iii) d'un des phylotypes ADNr 16S pour lequel le cistron *mcrA* n'aurait pas été mis en évidence par l'approche utilisée, ceci en sachant que les amplifications de *Mx-01* ont été associées aux amplifications d'un phylotype ADNr 16S d'Archaea non Methanobacterales au sein des cultures.

Impact de l'âge sur la distribution des nouveaux phylotypes

Afin d'étudier l'impact de l'âge sur la distribution des nouveaux phylotypes mis en évidence *via* le marqueur moléculaire *mcrA* et *via* le marqueur moléculaire ADNr 16S, le suivi de ces nouveaux phylotypes par PCR spécifique a été réalisé au cours de l'étude menée sur des individus appartenant à trois groupes d'âge différents : 23 nouveau-nés (de 3 semaines à 10 mois), 20 adultes (de 25 à 45 ans) et 20 seniors (de 70 à 90 ans) (Article 3).

Fernandes *et al.* (1998) ont montré que les 66 méthano-excréteurs inclus dans leur étude étaient significativement plus âgés que les 63 non-méthano-excréteurs ($49,5 \pm 16,0$ versus $39,6 \pm 17,0$ ans, $p = 0,0009$), suggérant ainsi une augmentation de l'abondance et de la prévalence des Archaea méthanogènes colonisant le tractus digestif de l'homme avec l'âge. Dans notre étude, la présence de *M. smithii*, en association ou non avec *M. stadtmanae*, a été retrouvée chez 80 % des seniors ($n=20$) et 60 % des adultes ($n=20$), cette distribution entre les deux populations semble être homogène (Test d'exactitude de Fisher, $p=0,3$)

Un seul nouveau-né sur les 23 analysés a présenté un phylotype *Mx*, avec une absence de *M. smithii* ou *M. stadtmanae*. Quelques études par approches de microbiologie classique ou par mesure de méthane dans l'air expiré ont montré que la colonisation de l'intestin humain par les méthanogènes ne commençait pas avant l'âge de 2-3 ans (Bond *et al.*, 1971, Rutili *et al.*, 1996). D'après les travaux menés par Palmer *et al.* (2007), il semble que les Archaea méthanogènes n'apparaissent que transitoirement au sein du microbiote colique, dans la première année de vie. En effet, l'analyse par PCR quantitative ciblant l'ADNr 16S spécifique des Archaea a montré que seuls 7 nouveau-nés sur 14 présentaient des Archaea méthanogènes, à des concentrations variant de 10^3 à 10^6 copies d'ADNr 16S par gramme de selles (Palmer *et al.*, 2007). De plus, sur les 30 échantillons prélevés au cours de la première année de vie de chaque nouveau-né, les Archaea méthanogènes n'ont été détectées que sur un seul échantillon pour 4 d'entre eux, et uniquement chez un enfant après 5 semaines de vie (Palmer *et al.*, 2007). D'après ces résultats, il

est fortement probable que la présence de *Mx-01* dans les selles de ce nouveau-né ne soit que transitoire.

Si on s'intéresse exclusivement aux nouveaux phylotypes *Mx*, ils sont retrouvés individuellement ou associés les uns avec les autres chez 2/20 (10 %) adultes et 8/20 (40 %) seniors. Bien que réalisé sur un petit nombre d'individus, la distribution apparaît non homogène entre adultes et seniors (test d'exactitude de Fisher, $p=0,065$) et la proportion de porteurs de *Mx* dans la population semble augmenter avec l'âge. Ceci peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Le vieillissement est souvent associé avec une augmentation du temps de transit due à la réduction de la masse des fèces (Woodmansey *et al.*, 2004). Cette stagnation de la matière fécale au sein du côlon pourrait favoriser le développement des micro-organismes dont la croissance est lente, tel que les méthanogènes (Mah *et al.*, 1977). Cependant, le temps de transit ne doit pas être le seul facteur impliqué. En effet, les noirs africains d'origine rurale ont des temps de transit plus courts que les caucasiens et pourtant présentent une prévalence de méthano-excréteurs supérieure (Segal *et al.*, 1988).

Les Archaea se caractérisent également par l'absence de muréine (ou peptidoglycane) au sein de leur paroi cellulaire. Elles présentent de la pseudo-muréine ou des sous-unités protéiques selon l'ordre considéré, ce qui leur confère une résistance aux antibiotiques visant la synthèse du peptidoglycane comme notamment la pénicilline, la cyclosérine et la valinomycine (Garcia *et al.*, 2000). Il a été également montré que *M. smithii* est très résistant à la streptomycine, la gentamycine et la clindamycine, des antibiotiques inhibant la synthèse protéique et à la ciprofloxacine un antibiotique interférant dans la réplication de l'ADN (Dermoumi & Ansorg, 2001). De ce fait, les Archaea, méthanogènes ou non, pourraient être sélectionnées au cours de la vie par l'utilisation d'agents antimicrobiens tels que les antibiotiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces études nous ont permis de mettre en évidence, *via* l'analyse du marqueur moléculaire métabolique de la méthanogenèse *mcrA*, qu'en plus des deux *Methanobacteriales* *M. smithii* et *M. stadtmanae*, le tractus digestif de l'homme est colonisé par cinq phylotypes, nommés *Mx-01*, *Mx-02*, *Mx-03*, *Mx-04* et *Mx-05*. D'après les phylogénies *McrA*, ces nouveaux phylotypes ne peuvent être rattachés à aucun des 5 ordres méthanogènes précédemment décrits et sont regroupés au sein d'un potentiel 6^{ème} ordre d'Archaea méthanogènes apparenté de manière éloignée aux ANME 1. Il a également été montré qu'au sein de la population présentant des méthanogènes, à savoir 60 % des adultes et 80 % des seniors (Article 3), la prévalence de ces nouveaux phylotypes, seuls ou en association, augmente en fonction de l'âge des individus, passant de 10 % chez les adultes à 40 % chez les seniors (χ^2 test, $p < 0.05$). En parallèle, l'analyse du marqueur ADN_r 16S a permis la mise en évidence de quatre nouveaux phylotypes s'affiliant au Thermoplasmatales. Il semble peu probable que l'association entre les deux types de phylotypes (*mcrA* et ADN_r 16S) soit le fruit du hasard, et ce résultats laisse à penser, soit qu'ils vivent en étroite association au sein du tractus, soit qu'ils correspondent aux mêmes micro-organismes.

A l'heure actuelle, aucun représentant du potentiel 6^{ème} ordre d'Archaea méthanogènes n'a été isolé. Bien que les approches moléculaires donnent une meilleure vision que les approches culturelles concernant la diversité des communautés microbiennes colonisant un écosystème, elles ne permettent pas d'inférer du rôle des phylotypes mis en évidence au sein de l'écosystème considéré. La caractérisation phénotypique d'un micro-organisme nécessite dans la majeure partie des cas son isolement. De ce fait les travaux entrepris au sein du laboratoire et ayant permis de maintenir l'un des représentant de ce potentiel nouvel ordre d'Archaea méthanogène (*Mx-01*) en culture, vont être poursuivis par des tentatives d'isolement en roll-tubes. Différentes conditions (températures, substrats, antibiotiques...) sont actuellement testées au sein du laboratoire de manière à enrichir nos cultures en *Mx-01*. L'obtention d'une culture enrichie permettrait d'envisager une approche métagénomique qui permettrait de fournir des réponses aux questions concernant la co-localisation des marqueurs *mcrA* et ADN_r 16S correspondant aux nouveaux phylotypes mis en évidence. Elle permettrait également de déterminer si la présence du cistron *mcrA* est résiduelle ou est retrouvée en association avec les

autres gènes codant pour les enzymes impliquées dans la méthanogenèse. A défaut de cette approche globale l'obtention d'une culture enrichie permettra de faciliter les approches par hybridation fluorescente *in-situ* en cours de développement au sein du laboratoire, afin de déterminer si les marqueurs *mcrA* et ADNr 16S sont co-localisés au sein de la même cellule ou si nous avons à faire à deux micro-organismes différents. Enfin cet enrichissement permettra de déterminer la physiologie de *Mx*, et donc également d'en décrire des rôles hypothétiques au sein des écosystèmes digestifs animaux.

De ce point de vue, il semble également intéressant de déterminer l'abondance et la proportion des nouveaux phylotypes par rapport à l'ensemble des bactéries ou des Archaea méthanogènes, au sein des différents groupes d'âge étudiés. De ce fait une approche par PCR quantitative utilisant le SybrGreen et ciblant l'ADNr 16S de l'ensemble des bactéries, de l'ensemble des Archaea et de l'ensemble des nouveaux phylotypes ADNr 16S est en cours de développement. Si les résultats concernant la co-localisation des deux marqueurs *mcrA* et ADNr16S révèlent que chacun appartient à des Archaea différentes, il est également prévu de développer une approche par PCR quantitative ciblant le cistron *mcrA*.

De toute évidence le microbiote intestinal humain n'a pas encore révélé tous ses secrets concernant sa diversité et son potentiel métabolique. Ceci laisse présager que de nouvelles fonctions de ce microbiote sur la santé humaine restent à découvrir.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Agrawal, A. & P. J. Whorwell, (2006) Irritable bowel syndrome: diagnosis and management. *Bmj* **332**: 280-283.
- Alam, M., T. Midtvedt & A. Uribe, (1994) Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand J Gastroenterol* **29**: 445-451.
- Amann, R. I., W. Ludwig & K. H. Schleifer, (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.
- Anderson, I., L. E. Ulrich, B. Lupa, D. Susanti, I. Porat, S. D. Hooper, A. Lykidis, M. Sieprawska-Lupa, L. Dharmarajan, E. Goltsman, A. Lapidus, E. Saunders, C. Han, M. Land, S. Lucas, B. Mukhopadhyay, W. B. Whitman, C. Woese, J. Bristow & N. Kyrpides, (2009) Genomic characterization of methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PLoS One* **4**: e5797.
- Anonymous, (1981) The pioneers of pediatric medicine: Teodor Escherich *Eur J Pediatr* **137**: 131.
- Attene-Ramos, M. S., E. D. Wagner, M. J. Plewa & H. R. Gaskins, (2006) Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Mol Cancer Res* **4**: 9-14.

B

- Backhed, F., H. Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich & J. I. Gordon, (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15718-15723.
- Backhed, F., J. K. Manchester, C. F. Semenkovich & J. I. Gordon, (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 979-984.
- Ball, L., J.J. Rafter, J.A. Gustafsson, B.E. Gustafsson, M.J. Kohan & J. Lewtas, (1991) Formation of mutagenic urinary metabolites from 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats: role of the gut flora. *Carcinogenesis* **12**: 1-5.
- Baptiste, E., C. Brochier & Y. Boucher, (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* **1**: 353-363.

- Belay, N., R. Johnson, B. S. Rajagopal, E. C. de Macario & L. Daniels, (1988) Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl Environ Microbiol* **54**: 600-603.
- Belay, N., B. Mukhopadhyay, E. Conway de Macario, R. Galask & L. Daniels, (1990) Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J Clin Microbiol* **28**: 1666-1668.
- Biavati, B., M. Vasta & J. G. Ferry, (1988) Isolation and characterization of "Methanosphaera cuniculi" sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **54**: 768-771.
- Bik, E. M., P. B. Eckburg, S. R. Gill, K. E. Nelson, E. A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M. J. Blaser & D. A. Relman, (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 732-737.
- Bleicher, K., G. Zellner & J. Winter, (1989) Growth of methanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 307-312.
- Bond, J. H., Jr., R. R. Engel & M. D. Levitt, (1971) Factors influencing pulmonary methane excretion in man. An indirect method of studying the in situ metabolism of the methane-producing colonic bacteria. *The Journal of experimental medicine* **133**: 572-588.
- Boone, D. R. & R. W. Castenholz, (2001) "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 2nd ed., Vol. 1. *Springer-Verlag, New York, Berlin, Heildelberg.*
- Bouskra, D., C. Brezillon, M. Berard, C. Werts, R. Varona, I. G. Boneca & G. Eberl, (2008) Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **456**: 507-510.
- Boyle, P. & J. Ferlay, (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* **16**: 481-488.
- Brauman, A., J. Dore, P. Eggleton, D. Bignell, J. A. Breznak & M. D. Kane, (2001) Molecular phylogenetic profiling of prokaryotic communities in guts of termites with different feeding habits. *FEMS Microbiol Ecol* **35**: 27-36.
- Breitbart, M., I. Hewson, B. Felts, J. M. Mahaffy, J. Nulton, P. Salamon & F. Rohwer, (2003) Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* **185**: 6220-6223.
- Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo & P. Forterre, (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature reviews* **6**: 245-252.

C

- Castro, H., A. Ogram & K. R. Reddy, (2004) Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6559-6568.
- Chaban, B., S. Y. Ng & K. F. Jarrell, (2006) Archaeal habitats--from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol* **52**: 73-116.
- Christl, S. U., G. R. Gibson & J. H. Cummings, (1992) Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine. *Gut* **33**: 1234-1238.
- Conway de Macario, E. & A. J. Macario, (2008) Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis. *Int J Med Microbiol*.
- Corthier, G., (2007) Flore intestinale et santé : quels enjeux ? *Nutrition clinique et métabolisme* **21**: 76-80.
- Cummings, J. H. & G. T. Macfarlane, (1991) The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* **70**: 443-459.
- Cummings, J. H. & G. T. Macfarlane, (1997) Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* **13**: 476-478.

D

- Daniels, L., G. Fuchs, R. K. Thauer & J. G. Zeikus, (1977) Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol* **132**: 118-126.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie & J. F. Colombel, (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127**: 412-421.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins & C. S. McSweeney, (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 313-322.

- Deplancke, B., K. R. Hristova, H. A. Oakley, V. J. McCracken, R. Aminov, R. I. Mackie & H. R. Gaskins, (2000) Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2166-2174.
- Dermoumi, H. L. & R. A. Ansorg, (2001) Isolation and antimicrobial susceptibility testing of fecal strains of the archaeon *Methanobrevibacter smithii*. *Chemotherapy* **47**: 177-183.
- Donovan, S. E., K. J. Purdy, M. D. Kane & P. Eggleton, (2004) Comparison of Euryarchaea strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3884-3892.
- Doty, R. L., P. Shaman, S. L. Applebaum, R. Giberson, L. Siksorski & L. Rosenberg, (1984) Smell identification ability: changes with age. *Science* **226**: 1441-1443.
- Drossman, D. A., W. E. Whitehead & M. Camilleri, (1997) Irritable bowel syndrome: a technical review for practice guideline development. *Gastroenterology* **112**: 2120-2137.
- Duncan, S. H., G. E. Lobley, G. Holtrop, J. Ince, A. M. Johnstone, P. Louis & H. J. Flint, (2008) Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* **32**: 1720-1724.

E

- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson & D. A. Relman, (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638.
- Evans, P. N., L. A. Hinds, L. I. Sly, C. S. McSweeney, M. Morrison & A. D. Wright, (2009) Community composition and density of methanogens in the foregut of the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Appl Environ Microbiol* **75**: 2598-2602.

F

- Falk, P. G., L. V. Hooper, T. Midtvedt & J. I. Gordon, (1998) Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1157-1170.

- Farrugia, G., S. Lei, X. Lin, S. M. Miller, K. A. Nath, C. D. Ferris, M. Levitt & J. H. Szurszewski, (2003) A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8567-8570.
- Fernandes, J., T. M. Wolever & A. V. Rao, (1998) Increased serum cholesterol in healthy human methane producers is confounded by age. *J Nutr* **128**: 1349-1354.
- Florin, T. H. & H. J. Woods, (1995) Inhibition of methanogenesis by human bile. *Gut* **37**: 418-421.
- Fonty, G. & F. Chaucheyras-Durand, (2007) Les écosystèmes digestifs. *Monographies de microbiologie, Larpent J.-P. ed, Lavoisier, Paris, France.*
- Forterre, P., (2007) Microbes de l'enfer. *Pour la science, ed, Belin, France* Monographies de microbiologie, Larpent J.-P. ed, Lavoisier, Paris, France.
- Forterre, P., C. Brochier & H. Philippe, (2002) Evolution of the Archaea. *Theor Popul Biol* **61**: 409-422.
- Forterre, P. & H. Philippe, (1999) Where is the root of the universal tree of life? *Bioessays* **21**: 871-879.
- Fox, G. E., L. J. Magrum, W. E. Balch, R. S. Wolfe & C. R. Woese, (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 4537-4541.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz & N. R. Pace, (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13780-13785.
- Fricke, W. F., H. Seedorf, A. Henne, M. Kruer, H. Liesegang, R. Hedderich, G. Gottschalk & R. K. Thauer, (2006) The Genome Sequence of Methanosphaera stadtmanae Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis. *J. Bacteriol.* **188**: 642-658.
- Frontier, S. & D. Pichot-Viale, (1998) Ecosystèmes. Structure, fonctionnemen, évolution. *Dunod, Paris.*

G

- Galand, P., S. Saarnio, H. Fritze & K. Yrjälä, (2002a) Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS microbiol ecol* **42**: 441-449
- Garcia, J.-L., B. K. C. Patel & B. Ollivier, (2000) Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**: 205-226.
- Gérard, P. & A. Bernalier-Donadille, (2007) Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de nutrition et de diététique* **42**: 92.
- Geypens, B., D. Claus, P. Evenepoel, M. Hiele, B. Maes, M. Peeters, P. Rutgeerts & Y. Ghoo, (1997) Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut* **41**: 70-76.
- Gibson, G. R., J. H. Cummings & G. T. Macfarlane, (1988) Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J Appl Bacteriol* **65**: 241-247.
- Gibson, G. R., G. T. Macfarlane & J. H. Cummings, (1993) Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut* **34**: 437-439.
- Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett & K. E. Nelson, (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**: 1355-1359.
- Glasser, A. L., J. Boudeau, N. Barnich, M. H. Perruchot, J. F. Colombel & A. Darfeuille-Michaud, (2001) Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun* **69**: 5529-5537.
- Gribaldo, S. & C. Brochier-Armanet, (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **361**: 1007-1022.

H

- Hackstein, J. H. & C. K. Stumm, (1994) Methane production in terrestrial arthropods. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5441-5445.

- Haines, A., G. Metz, J. Dilawari, L. Blendis & H. Wiggins, (1977) Breath-methane in patients with cancer of the large bowel. *Lancet* **2**: 481-483.
- Hallam, S. J., P. R. Girguis, C. M. Preston, P. M. Richardson & E. F. DeLong, (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5483-5491.
- Hallam, S. J., N. Putnam, C. M. Preston, J. C. Detter, D. Rokhsar, P. M. Richardson & E. F. DeLong, (2004) Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.
- Hamer, H. M., D. Jonkers, K. Venema, S. Vanhoutvin, F. J. Troost & R. J. Brummer, (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**: 104-119.
- Handelsman, J., (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 669-685.
- Hayashi, H., M. Sakamoto, M. Kitahara & Y. Benno, (2003) Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* **47**: 557-570.
- Hayashi, H., R. Takahashi, T. Nishi, M. Sakamoto & Y. Benno, (2005) Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* **54**: 1093-1101.
- Hoff, G., A. Bjornekleit, I. E. Moen & E. Jenssen, (1986) Epidemiology of polyps in the rectum and sigmoid colon. Evaluation of breath methane and predisposition for colorectal neoplasia. *Scand J Gastroenterol* **21**: 193-198.
- Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk & J. I. Gordon, (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**: 881-884.
- Hori, T., K. Matsumoto, Y. Sakaitani, M. Sato & M. Morotomi, (1998) Effect of dietary deoxycholic acid and cholesterol on fecal steroid concentration and its impact on the colonic crypt cell proliferation in azoxymethane-treated rats. *Cancer Lett* **124**: 79-84.

- Huber, H., M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer & K. O. Stetter, (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Huber, R., M. Kurr, H. W. Jannasch & K. Stetter, (1989) A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (Methanopyrus) growing at 110°C. *Nature* **342**: 833-834.
- Hudson, M. J., A. M. Tomkins, H. S. Wiggins & B. S. Drasar, (1993) Breath methane excretion and intestinal methanogenesis in children and adults in rural Nigeria. *Scand J Gastroenterol* **28**: 993-998.
- Hungate, R., (1969) Methods in microbiology. *Academic press, London*.

I

- Ismail, A. S. & L. V. Hooper, (2005) Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G779-784.

J

- Jarvis, G. N., C. Strompl, D. M. Burgess, L. C. Skillman, E. R. Moore & K. N. Joblin, (2000) Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current microbiology* **40**: 327-332.
- Jetten, M. S., A. Stams & A. Zehnder, (1992) Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngeni* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **88**: 181-197.
- Justesen, T., O. H. Nielsen, K. Hjelt & P. A. Krasilnikoff, (1984) Normal cultivable microflora in upper jejunal fluid in children without gastrointestinal disorders. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **3**: 683-686.

K

- Karlsson, S., M. Persson & G. E. Carlsson, (1991) Mandibular movement and velocity in relation to state of dentition and age. *J Oral Rehabil* **18**: 1-8.

- King, T., M. Elia & J. Hunter, (1998) Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* **352**: 1187-9.
- Koga, Y., M. Nishihara, H. Morii & M. Akagawa-Matsushita, (1993) Ether polar lipids of methanogenic bacteria: structures, comparative aspects, and biosyntheses. *Microbiol Rev* **57**: 164-182.
- Kulik, E. M., H. Sandmeier, K. Hinni & J. Meyer, (2001) Identification of archaeal rDNA from subgingival dental plaque by PCR amplification and sequence analysis. *FEMS microbiology letters* **196**: 129-133.
- Kurokawa, K., T. Itoh, T. Kuwahara, K. Oshima, H. Toh, A. Toyoda, H. Takami, H. Morita, V. K. Sharma, T. P. Srivastava, T. D. Taylor, H. Noguchi, H. Mori, Y. Ogura, D. S. Ehrlich, K. Itoh, T. Takagi, Y. Sakaki, T. Hayashi & M. Hattori, (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* **14**: 169-181.

L

- Leadbetter, J. R. & J. A. Breznak, (1996) Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3620-3631.
- Lepage, P., P. Seksik, M. Sutren, M. F. de la Cochetiere, R. Jian, P. Marteau & J. Dore, (2005) Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 473-480.
- Lepp, P. W., M. M. Brinig, C. C. Ouverney, K. Palm, G. C. Armitage & D. A. Relman, (2004) Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6176-6181.
- Levitt, M. D., J. K. Furne, M. Kuskowski & J. Ruddy, (2006) Stability of human methanogenic flora over 35 years and a review of insights obtained from breath methane measurements. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**: 123-129.
- Lewis, S. & S. Cochrane, (2007) Alteration of sulfate and hydrogen metabolism in the human colon by changing intestinal transit rate. *Am J Gastroenterol* **102**: 624-633.

- Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight & J. I. Gordon, (2005a) Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* **102**: 11070-11075.
- Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein & J. I. Gordon, (2006) Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022-1023.
- Liesack, W., S. Schnell & N. P. Revsbech, (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 625-645.
- Lin, C. & T. L. Miller, (1998) Phylogenetic analysis of Methanobrevibacter isolated from feces of humans and other animals. *Arch Microbiol* **169**: 397-403.
- Lin, C., L. Raskin & D. A. Stahl, (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS microbiol ecol* **22**: 281-294.
- Liu, Y. & W. B. Whitman, (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 171-189.
- Lloyd, K. G., L. Lapham & A. Teske, (2006) An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7218-7230.
- Ludwig, W. & K. H. Schleifer, (1994) Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 155-173.
- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner & K. H. Schleifer, (1998) Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.
- Lueders, T., K. J. Chin, R. Conrad & M. Friedrich, (2001) Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (mcrA) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ Microbiol* **3**: 194-204.
- Lueders, T. & M. W. Friedrich, (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol* **69**: 320-326.

Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp & P. W. Riley, (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology (Reading, England)* **148**: 3521-3530.

M

Macfarlane, G. T., K. L. Blackett, T. Nakayama, H. Steed & S. Macfarlane, (2009) The gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* **15**: 1528-1536.

Macpherson, A. J. & N. L. Harris, (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 478-485.

Maczulak, A. E., M. J. Wolin & T. L. Miller, (1989) Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2468-2473.

Madara, J. L., S. Nash, R. Moore & K. Atisook, (1990) Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr Pathol*: 306-324.

Mah, R. A., D. M. Ward, L. Baresi & T. L. Glass, (1977) Biogenesis of methane. *Annu Rev Microbiol* **31**: 309-341.

Makarova, K. S., L. Aravind, M. Y. Galperin, N. V. Grishin, R. L. Tatusov, Y. I. Wolf & E. V. Koonin, (1999) Comparative genomics of the Archaea (Euryarchaeota): evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. *Genome Res* **9**: 608-628.

McGarr, S. E., J. M. Ridlon & P. B. Hylemon, (2005) Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *Journal of clinical gastroenterology* **39**: 98-109.

McKay, L. F., W. G. Brydon, M. A. Eastwood & J. H. Smith, (1981) The influence of pentose on breath methane. *Am J Clin Nutr* **34**: 2728-2733.

McKay, L. F., M. A. Eastwood & W. G. Brydon, (1985) Methane excretion in man--a study of breath, flatus, and faeces. *Gut* **26**: 69-74.

Megonigal, J. P. & A. B. Guenther, (2008) Methane emissions from upland forest soils and vegetation. *Tree Physiol* **28**: 491-498.

Melcher, E. A., M. D. Levitt & J. L. Slavin, (1991) Methane production and bowel function parameters in healthy subjects on low- and high-fiber diets. *Nutr Cancer* **16**: 85-92.

- Metges, C. C., A. E. El-Khoury, L. Henneman, K. J. Petzke, I. Grant, S. Bedri, P. P. Pereira, A. M. Ajami, M. F. Fuller & V. R. Young, (1999) Availability of intestinal microbial lysine for whole body lysine homeostasis in human subjects. *Am J Physiol* **277**: E597-607.
- Midtvedt, A. C. & T. Midtvedt, (1992) Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **15**: 395-403.
- Miller, T. L. & M. J. Wolin, (1982) Enumeration of *Methanobrevibacter smithii* in human feces. *Arch Microbiol* **131**: 14-18.
- Miller, T. L. & M. J. Wolin, (1983) Stability of *Methanobrevibacter smithii* populations in the microbial flora excreted from the human large bowel. *Appl Environ Microbiol* **45**: 317-318.
- Miller, T. L. & M. J. Wolin, (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* **141**: 116-122.
- Miller, T. L. & M. J. Wolin, (1986) Methanogens in human and animal intestinal tract systems. *Applied microbiology* **7**: 223-229.
- Miller, T. L., M. J. Wolin, E. C. de Macario & A. J. Macario, (1982) Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Appl Environ Microbiol* **43**: 227-232.
- Moore, W. E. & L. V. Holdman, (1974) Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied microbiology* **27**: 961-979.
- Moreau, M. C., R. Ducluzeau, D. Guy-Grand & M. C. Muller, (1978) Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin. *Infect Immun* **21**: 532-539.
- Morvan, B., F. Bonnemoy, G. Fonty & P. Gouet, (1996) Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current microbiology* **32**: 129-133.
- Mukhopadhyay, B., E. Purwantini, E. Conway de Macario & L. Daniels, (1991) Characterization of a *Methanosarcina* strain isolated from goat feces, and that grows on H₂-CO₂ only after adaptation. *Current microbiol* **23**: 165-173.

N

- Nagengast, F. M., M. J. Grubben & I. P. van Munster, (1995) Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* **31A**: 1067-1070.
- Newton, J. P., R. Yemm, R. W. Abel & S. Menhinick, (1993) Changes in human jaw muscles with age and dental state. *Gerodontology* **10**: 16-22.
- Nicholson, J. K., E. Holmes & I. D. Wilson, (2005) Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature reviews* **3**: 431-438.

O

- O'Brien, J. M., R. H. Wolkin, T. T. Moench, J. B. Morgan & J. G. Zeikus, (1984) Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide. *J Bacteriol* **158**: 373-375.
- O'Keefe, S. J. D., M. Kidd, G. Espitalier-Noel & P. Owira, (1999) Rarity of colon cancer in Africans is associated with low animal product consumption, not fiber. *The American Journal of Gastroenterology* **94**: 1373-1380.

P

- Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane & O. G.J., (1985) The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Am. Soc. Microbiol. News* **51**: 4-12.
- Palmer, C., E. M. Bik, D. B. Digiulio, D. A. Relman & P. O. Brown, (2007) Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS biology* **5**: e177.
- Pan, S. Y. & M. DesMeules, (2009) Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol Biol* **472**: 191-215.
- Patacchini, R., P. Santicioli, S. Giuliani & C. A. Maggi, (2005) Pharmacological investigation of hydrogen sulfide (H₂S) contractile activity in rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* **509**: 171-177.
- Paynter, M. J. & R. E. Hungate, (1968) Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp. n., isolated from the bovine rumen. *J Bacteriol* **95**: 1943-1951.

- Perrenoud, J. P., (1957) Pyxigraphy; a procedure for examining the contents of the gastrointestinal system by means of a sampling capsule. *Gastroenterologia* **87**: 349-355.
- Pimentel, M., Y. Kong & S. Park, (2004) IBS subjects with methane on lactulose breath test have lower postprandial serotonin levels than subjects with hydrogen. *Digestive diseases and sciences* **49**: 84-87.
- Pimentel, M., A. G. Mayer, S. Park, E. J. Chow, A. Hasan & Y. Kong, (2003) Methane production during lactulose breath test is associated with gastrointestinal disease presentation. *Digestive diseases and sciences* **48**: 86-92.
- Pique, J. M., M. Pallares, E. Cuso, J. Vilar-Bonet & M. A. Gassull, (1984) Methane production and colon cancer. *Gastroenterology* **87**: 601-605.
- Pitt, P., K. M. de Bruijn, M. F. Beeching, E. Goldberg & L. M. Blendis, (1980) Studies on breath methane: the effect of ethnic origins and lactulose. *Gut* **21**: 951-954.
- Pochart, P., J. Dore, F. Lemann, I. Goderel & J. C. Rambaud, (1992) Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon. *FEMS microbiology letters* **77**: 225-228.
- Pochart, P., F. Lemann, B. Flourie, P. Pellier, I. Goderel & J. C. Rambaud, (1993) Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* **105**: 1281-1285.

R

- Rambaud, J. C., J. P. Buts, C. G. & F. B., (2004) Flore microbienne intestinale-Physiologie et pathologie digestives. *Ed, John Libbey Eurotext, Montrouge, France.*
- Rea, S., J. P. Bowman, S. Popovski, C. Pimm & A. D. Wright, (2007) Methanobrevibacter millerae sp. nov. and Methanobrevibacter olleyae sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 450-456.
- Reddy, B. S., (1981) Diet and excretion of bile acids. *Cancer research* **41**: 3766-3768.
- Reysenbach, A. L. & S. L. Cady, (2001) Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends Microbiol* **9**: 79-86.

- Riegler, M., M. Lotz, C. Sears, C. Pothoulakis, I. Castagliuolo, C. C. Wang, R. Sedivy, T. Sogukoglu, E. Cosentini, G. Bischof, W. Feil, B. Teleky, G. Hamilton, J. T. LaMont & E. Wenzl, (1999) Bacteroides fragilis toxin 2 damages human colonic mucosa in vitro. *Gut* **44**: 504-510.
- Rieu-Lesme, F., C. Delbes & L. Sollelis, (2005) Recovery of Partial 16S rDNA Sequences Suggests the Presence of Crenarchaeota in the Human Digestive Ecosystem. *Current microbiology*.
- Roediger, W. E., A. Duncan, O. Kapaniris & S. Millard, (1993) Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* **104**: 802-809.
- Rutili, A., E. Canzi, T. Brusa & A. Ferrari, (1996) Intestinal methanogenic bacteria in children of different ages. *New Microbiol* **19**: 227-243.

S

- Saengkerdsub, S., R. C. Anderson, H. H. Wilkinson, W.-K. Kim, D. J. Nisbet & S. C. Ricke, (2007) Identification and Quantification of Methanogenic Archaea in Adult Chicken Ceca. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 353-356.
- Sakai, S., H. Imachi, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, H. Harada & Y. Kamagata, (2007) Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: a novel isolate affiliated with the clone cluster rice cluster I. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4326-4331.
- Samuel, B. S. & J. I. Gordon, (2006) A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *PNAS* **103**: 10011-10016.
- Sanborn, A., (1931) The fecal flora of adults, with particular attention to individual differences and their relationship to the effects of various diets. *J Infect Dis* **48**.
- Savage, D. C., (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**: 107-133.
- Scanlan, P. D., F. Shanahan & J. R. Marchesi, (2008) Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. *BMC Microbiol* **8**: 79.

- Schiffrin, E. J., J. E. Morley, A. Donnet-Hughes & Y. Guigoz, (2009) The inflammatory status of the elderly: The intestinal contribution. *Mutat Res.*
- Segal, I., A. R. Walker, S. Lord & J. H. Cummings, (1988) Breath methane and large bowel cancer risk in contrasting African populations. *Gut* **29**: 608-613.
- Sharp, R., C. J. Ziemer, M. D. Stern & D. A. Stahl, (1998) Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS microbiol ecol* **26**: 71-78.
- Shima, S. & R. K. Thauer, (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Current opinion in microbiology* **8**: 643-648.
- Shin, E. C., B. R. Choi, W. J. Lim, S. Y. Hong, C. L. An, K. M. Cho, Y. K. Kim, J. M. An, J. M. Kang & S. S. Lee, (2004) Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe* **10**: 313-319.
- Singh, J., A. Behal, N. Singla, A. Joshi, N. Birbian, S. Singh, V. Bali & N. Batra, (2009) Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnol J* **4**: 480-494.
- Skillman, L. C., P. N. Evans, G. E. Naylor, B. Morvan, G. N. Jarvis & K. N. Joblin, (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**: 277-285.
- Smith, K. S. & C. Ingram-Smith, (2007) Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol* **15**: 150-155.
- Sprenger, W. W., J. H. Hackstein & J. T. Keltjens, (2007) The competitive success of *Methanomicrococcus blatticola*, a dominant methylotrophic methanogen in the cockroach hindgut, is supported by high substrate affinities and favorable thermodynamics. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 266-275.
- Sprenger, W. W., M. C. van Belzen, J. Rosenberg, J. H. Hackstein & J. T. Keltjens, (2000) *Methanomicrococcus blatticola* gen. nov., sp. nov., a methanol- and methylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 6**: 1989-1999.
- Stahl, D. A., S. Fishbain, M. Klein, B. J. Baker & M. Wagner, (2002) Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 189-195.

- Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper & J. I. Gordon, (2002) Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15451-15455.
- Steinberg, L. M. & J. M. Regan, (2008) Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6663-6671.
- Stephen, A. M., H. S. Wiggins, H. N. Englyst, T. J. Cole, B. J. Wayman & J. H. Cummings, (1986) The effect of age, sex and level of intake of dietary fibre from wheat on large-bowel function in thirty healthy subjects. *Br J Nutr* **56**: 349-361.
- Stewart, J. A., V. S. Chadwick & A. Murray, (2006) Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Lett Appl Microbiol* **43**: 58-63.

T

- Tajima, K., T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura & R. I. Aminov, (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 microbiology letters* **200**: 67-72.
- Thauer, R. K., A. K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel & R. Hedderich, (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature reviews* **6**: 579-591.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson, (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Turnbaugh, P. J., F. Backhed, L. Fulton & J. I. Gordon, (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* **3**: 213-223.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis & J. I. Gordon, (2006a) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444**: 1027-1131.

V

Van Tassel, R. L., D. K. MacDonald & T. D. Wilkins, (1982) Production of a fecal mutagen by *Bacteroides* spp. *Infect Immun* **37**: 975-980.

W

Weiffenbach, J. M., B. J. Baum & R. Burghauser, (1982) Taste thresholds: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* **37**: 372-377.

Whitford, M. F., R. M. Teather & R. J. Forster, (2001) Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol* **1**: 5.

Whitman, W. B., D. C. Coleman & W. J. Wiebe, (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6578-6583.

Whitman, W. B. e. a., (2001) Taxonomiy of methanogenic archaea. . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, D.R. BOONE, R. W. CASTENHOLTZ & G. M. GARRITY, Vol. 1. ed.: 211–213. New York: Springer.

Widdel, F., (1986) Growth of Methanogenic Bacteria in Pure Culture with 2-Propanol and Other Alcohols as Hydrogen Donors. *Appl Environ Microbiol* **51**: 1056-1062.

Woese, C. R., (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.

Woese, C. R. & G. E. Fox, (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5088-5090.

Woese, C. R., O. Kandler & M. L. Wheelis, (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576-4579.

Wolf, Y. I., I. B. Rogozin, N. V. Grishin, R. L. Tatusov & E. V. Koonin, (2001) Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC evolutionary biology* **1**: 8.

- Woodmansey, E. J., M. E. McMurdo, G. T. Macfarlane & S. Macfarlane, (2004) 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* **70**: 6113-6122.
- Wright, A. D., C. H. Auckland & D. H. Lynn, (2007) Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4206-4210.
- Wright, A. D., A. F. Toovey & C. L. Pimm, (2006) Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* **12**: 134-139.
- Wright, A. D., A. J. Williams, B. Winder, C. T. Christophersen, S. L. Rodgers & K. D. Smith, (2004) Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1263-1270.

X

- Xu, J. & J. I. Gordon, (2003) Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10452-10459.

Y

- Yanagita, K., Y. Kamagata, M. Kawaharasaki, T. Suzuki, Y. Nakamura & H. Minato, (2000) Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* By fluorescence in situ hybridization. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**: 1737-1742.

Z

- Zhang, H., J. K. DiBaise, A. Zuccolo, D. Kudrna, M. Braidotti, Y. Yu, P. Parameswaran, M. D. Crowell, R. Wing, B. E. Rittmann & R. Krajmalnik-Brown, (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2365-2370.

- Zheng, D., E. W. Alm, D. A. Stahl & L. Raskin, (1996) Characterization of universal small-subunit rRNA hybridization probes for quantitative molecular microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4504-4513.
- Zinder, S. H., (1993) Physiological ecology of methanogens. *In Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. J.G. Ferry, Ed.: 128-206. New York: Chapman & Hall.
- Zoetendal, E. G., K. Ben-Amor, H. J. Harmsen, F. Schut, A. D. Akkermans & W. M. de Vos, (2002) Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4225-4232.
- Zuckerland, E. a. P., L, (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins, in evolving genes and proteins. *V. Bryson and H.J. Vogel (éd), academic Press, New York*: 97-166.

Site internet :

[1] <http://www.answers.com/topic/archaeon>

ANNEXES

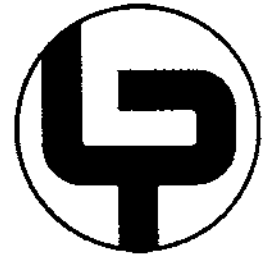
StabyCloning™ based Molecular Methods for the Identification of novel Microbial Strains

Delphi Genetics Inc.

Sharpened Tools for Lifescience Discoveries

Technical Note

Technical notes provide customers with innovative applications and clear protocols specifically designed for Delphi Genetics products.



DELPHI
genetics

INTRODUCTION



The human intestinal flora is composed of a highly diversified population encompassing the three domains of life: Eukaria, Bacteria and Archaea. It is generally believed that 80% of the later are still unidentified to date. We herein describe a molecular method for the identification of unknown microbial strains, especially archaeons. A special focus is put on methanogens, in which it is possible to amplify a specific molecular marker for this metabolic group (*mcr*, the operon encoding Methyl-coM reductase, the last enzyme of methanogenesis) using degenerated PCR primers. StabyCloning™ is a very efficient Kit for this task, as it allows for the construction of representative libraries and the efficient screening of those libraries. All colonies are independent clones and the insert is correctly oriented. StabyCloning™ is very effective for a large range of insert sizes: from 1 base pair to more than 14000bp. As a result, each unique clone corresponds to a strain,

different for every RFLP profile obtained after digestion with selected restriction endonucleases.

This approach limits the number of sequencing reactions that have to be performed as it allows for the clear identification of each individual clone. Thereupon a phylogenetic analysis allows the researcher to reveal the relationships of these newly uncovered strains within the tree of life.

The proprietary StabyCloning™ technology has been extensively tested and validated in Prof. Alric's Laboratory at the Université d'Auvergne in Clermont-Ferrand (France) where StabyCloning™ has routinely outperformed PCR Cloning Kits from other leading suppliers for this specific application. The protocol developed by this laboratory is featured in the following section.

PROTOCOL

1. Biological samples (e.g. stool samples) are collected and DNA is extracted
2. Using PCR, molecular markers are specifically amplified from these biological samples.
3. The amplified sequences are directionally cloned in the plasmid pSTC1.2 using the StabyCloning™ Kit. The directionality of the cloning reaction is ensured by adding a specific 14bp tail to one of the primers.
4. The obtained library of clones is then used to assess the diversity of the sample. The insert is either checked using PCR with oligonucleotides targeting the vector at each side of the cloning site or by mini-preparation of DNA.

5. Clone specific PCR products (or plasmid DNA) are RE digested using *AclI* and *Csp6I*, yielding a specific RFLP profile for each clone. (see Fig. 1)
6. Unique clones are sequenced and the sequences are fed into a phylogenetic software for analysis

TYPICAL RESULTS

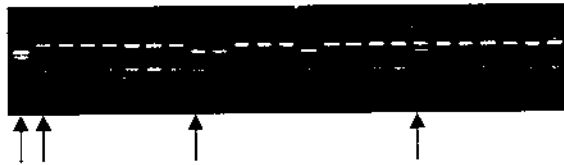


Figure 1: typical results using this methodology. Four different RFLP profiles are visible on this gel (Arrows), where each profile corresponds to a unique strain of methanogenic archaeon from the human tractus.

BENEFITS OF THE StabyCloning™ KIT FOR THE CREATION OF REPRESENTATIVE LIBRARIES AND THE SCREENING OF CLONE DIVERSITY

- **Efficient cloning of inserts:** the positive selection process is based on gene activation rather than gene disruption. Hence, only clones bearing the desired construct are selected. It is well known that the selection of recombinants using gene disruption is not always efficient with a variety of inserts, especially small inserts. This is the case for positive selection using a *lethal gene* only (e.g. "Zero Background" vectors from Invitrogen using *ccdB* or *pJet* vectors from Fermentas using *eco47IR*) or the Blue/White selection system based on the insertional disruption of *lacZ*. Therefore the proportion of clones bearing the correct insert is increased when using the StabyCloning™ technology.
- **Orientation of the insert: A unique feature of the StabyCloning™ system** is that you can select for the correct orientation of the insert. This greatly facilitates the sequencing and the sequence comparisons when screening multiple inserts.
- **Speed of the reaction:** The whole procedure (ligation + transformation + plating) takes 1 hour. No antibiotic resistance gene expression is required,

therefore the reaction can be directly plated and all the colonies on the plate are independent clones.

- **Higher number of clones** (see figure2).

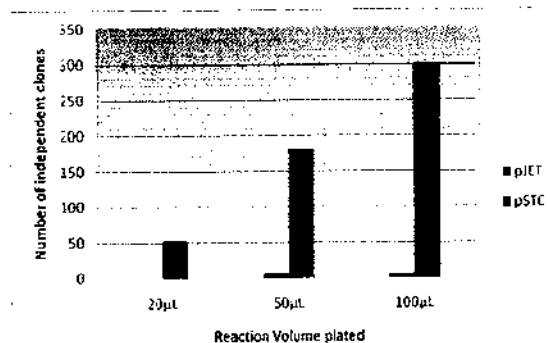
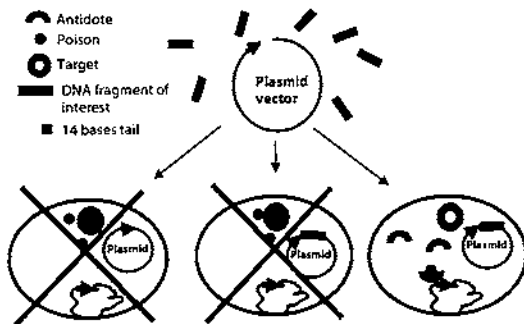


Figure 2. Number of transformants, the StabyCloning Kit is compared to Fermentas pJET Kit. 20, 50 or 100 µl transformed bacteria have been plated in each case. The insert (about 500 bp) was ligated using a vector/insert molar ratio of 1:3. 0.5µL of the ligation product (20 µL) was used for transformation (electroporation of commercial strains DG1 (Delphi Genetics) or CYS21 (Delphi Genetics)). Using StabyCloning™, in excess of 300 independent clones are obtained when using either 50 or 200 ng of vector in the ligation reaction, less than 10 independent clones are obtained using the pJET vector.

ABOUT THE StabyCloning™ SYSTEM

The StabyCloning™ Kit is designed for the rapid, precise, and efficient cloning of PCR products generated using proofreading polymerases. The system uses a proprietary positive selection strategy based on the plasmid toxin/antitoxin module *ccd*. The complete cloning procedure is performed within one hour (including plating). StabyCloning™ relies on the activation of an antitoxin gene rather than on the disruption of a toxin gene. DelphiGenetics' new selection scheme exhibits therefore unique advantages over other selection approaches. When a sequence of 14 base pairs (encoding the last 4 codons and the stop codon of the antidote gene) is added to the 5'-end of the DNA fragment to be cloned, the fusion of this sequence with the truncated antitoxin gene restores an active gene encoding a protein (CcdA) able to counteract the action of the toxin located in the chromosome of the host bacteria. The 14-bp sequence is incorporated into the target DNA fragment by using a modified PCR primer (the appropriate 14-base tail is added at the 5'-end of one of the two PCR primers).

As illustrated in the following figure, this process allows (i) the selection of recombinant plasmids that incorporate the fragment of interest (non-recombinant plasmids contain an inactive, truncated, *ccdA** gene, hence the host bacteria cell dies), and (ii) orientation of the fragment of interest (only one of the two possible orientations will restore an active, non-truncated, *ccdA* gene). Moreover, restoration of the *ccdA* gene stabilizes the plasmid into the bacterial population without the need for antibiotics (see www.delphigenetics.com for additional information on the advantages of this stabilization system).



KIT COMPONENTS

- pSTC1.3 blunt ended vector
- CYS21 bacteria
- T4 DNA ligase and reaction buffer
- Regeneration medium
- Forward and Reverse sequencing primers
- Primer Control mix

StabyCloning™ Products are available with either electro- or chemically- competent cells.

ORDER REFERENCES

- STC1-10: electro-competent cells, 10 reactions
- STC1-12: chemically-competent cells, 10 reactions
- STC1-20: electro-competent cells, 20 reactions
- STC1-22: chemically-competent cells, 20 reactions

RELATED PRODUCTS

Please visit www.delphigenetics.com for additional information on our DNA engineering and protein expression products

REFERENCES

Mihajlovski A., Alric M., Brugère J.-F. (2008). A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* In Press.

LEGAL

StabyCloning™ is a trademark of Delphi Genetics.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. JF Brugère, A Mihajlovski and Prof. M. Alric from the ERT-CIDAM, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Université d'Auvergne Clermont-1 have contributed valuable data to this technical note, with the technical assistance of Pauline Rougeron and Mathieu Kohon..





Delphi Genetics SA

Rue C. Ader, 16

B-6041 Charleroi

Belgium

Tel: +32.71.37.85.25

Fax: +32.71.37.60.57

www.delphigenetics.com

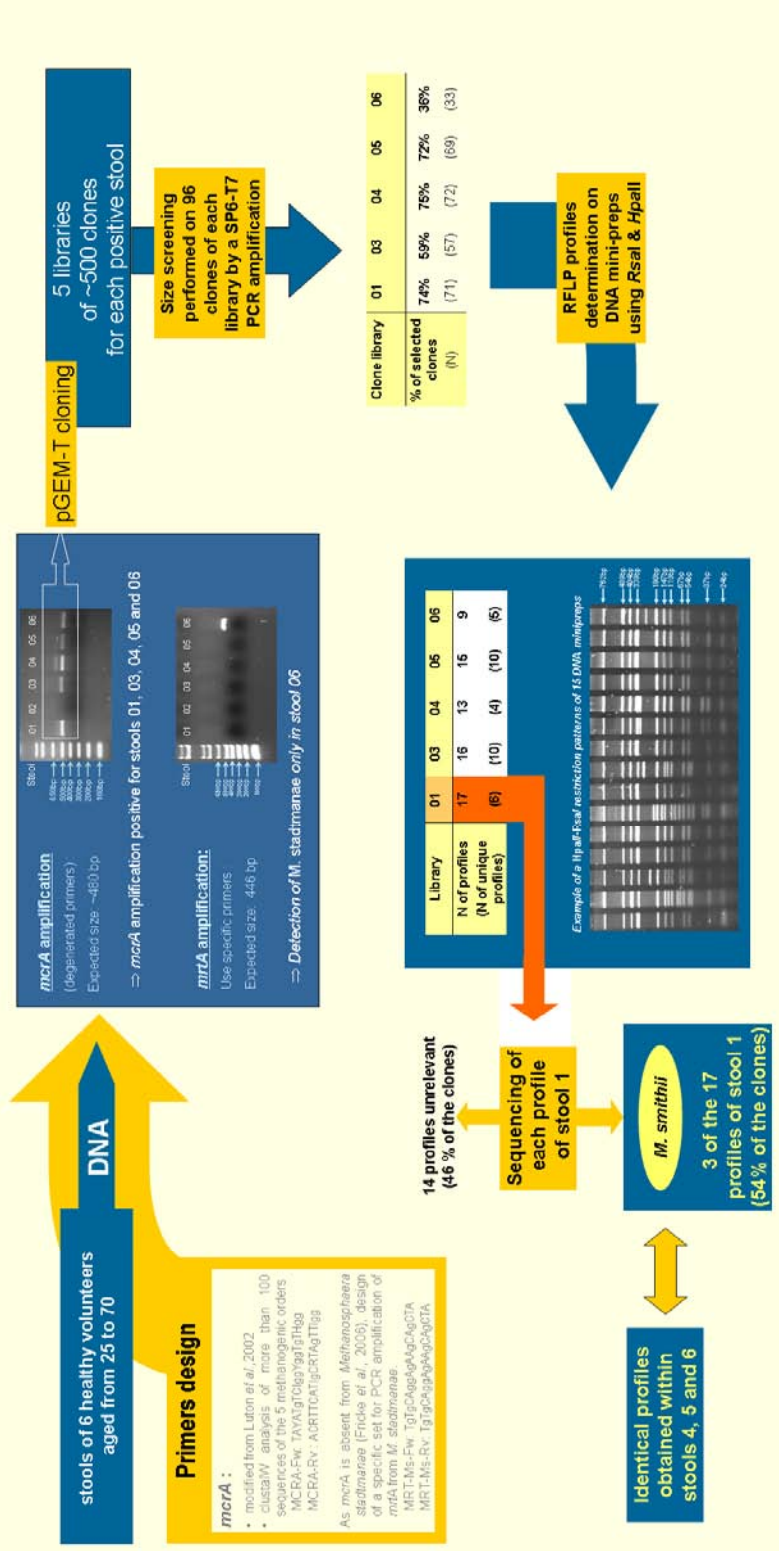
delphigenetics@delphigenetics.com

Annexe II : «Gut Microbiology Meeting _RRI-INRA 2006», Juin 2006, Aberdeen (Ecosse)

Assessing the methanogens diversity of the human intestinal flora by targeting the *mcrA* gene.

Agnès Mihajlovski, Monique Alric and J.-François Brugère
 J.Francois.BRUGERE@u-clermont.fr
 ERT-CIDAM, Université d'Auvergne Clermont-Ferrand, France

The methanogens diversity of the intestinal flora has been assessed using the *mcrA* gene as a metabolic molecular marker. This gene encodes the α -sub-unit of the methanogen-specific methyl-CoM reductase, a α - β - γ enzyme catalysing the last step of methanogenesis. So far, this gene is only absent in *Methanospheera stadmanae*, a potential methanogen of the human intestinal flora, leading us to perform a specific PCR test revealing its presence only in stool 6. Stools have been collected from 6 healthy volunteers and primers designed from alignment of known *mcrA* sequences. PCR amplifications from stools were positive for 5 of the 6 samples. Five organised libraries (of ~500 clones each) have been constructed and *RsaI*-*HpaII* RFLP profiles analysed for size-conform clones of a 96 sample of each library. Each profile from stool 1 has been sequenced. Only 3 of the 17 profiles (50% of the clones) correspond to *mcrA* amplicon. They all belong to *Methanobrevibacter smithii* whose *mcrA* gene has just been sequenced (Vianna et al., 2006). These profiles are also found in stools 4, 5 and 6. Sequence analysis reveals little or no polymorphism among the *M. smithii* strains. In conclusion, the diversity of methanogens in stool 1 seems to be very restricted. The perspectives are to finalized this work by completing the sequencing of all other different profiles from stool 3, 4, 5, and 6 and to perform the same principle for assessing the Sulphate-Reducing Prokaryotes diversity.



CONCLUSION

- Although adapted to the detection of *M. stadmanae*, *mcrA* is an efficient molecular marker for assessing methanogens diversity (Friedrich, 2005).
- For the stool 1, analysis of 69 clones has revealed the exclusive presence of *M. smithii*. Sequence analysis of 13 clones belonging to *M. smithii* profiles has shown little or no nucleotide variation (less than 1%).
- This confirms the very low diversity of methanogens inhabiting the intestinal tract for stool 1, as it has been shown in an exhaustive molecular study (Eckburg et al., 2005)

PERSPECTIVES

- to sequence *M. smithii* profiles from stools 4, 5 and 6
- to intraspecies variation in and among individuals ?
- to sequence all other different profiles from other stools
- to Methanogen diversity ?
- Use of the same methodology for assessing the Sulphate Reducing Prokaryotes diversity.

References

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CL, Devlin L, Dressen L, Hargrett-Nelson NE, Heuman DA, 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308(5723): 163-168.

Fridke WF, Seedorf H, Henne A, Kraus M, Liesegang H, Heldrich R, Gutschalk G, Thauer RK, 2006. The genome sequence of *Methanospheera stadmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methanum formation and ATP synthesis. *J Bacteriol* 188(2): 842-86.

Friedrich MW, 2005. Methylo-coenzyme B₁₂ reductase: unique functional marker for methanogenic and anaerobic methanogenic archaea. *Molecular Enzymes* 38: 425-47

Vianna MR, Alric M, Brugère JF, 2006. Sequence analysis of the *mcrA* gene in human fecal samples. *Journal of Microbiology* 148: 2571-20.

Vianna MR, Contrás G, Gomes BP, Neuz KP, 2006. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Oral Microbiol* 14(4):174-82.

Annexe III : Journée de la recherche, Novembre 2007 Clermont-Ferrand

Mise en évidence d'un nouvel ordre d'Archaea méthanogène au sein de la microflore intestinale humaine

A. Mihajlovski¹, J. Doré², M. Alric¹ et J.-F. Brugère¹



¹ IRT CIDAM, Faculté de Pharmacie, Université de Clermont-Fd1

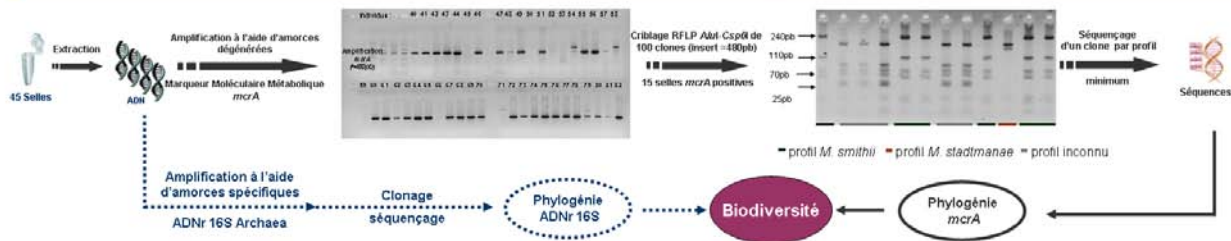
² Unité d'Ecologie et Physiologie du Système Digestif, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas

L'intestin humain renferme de l'ordre de 10¹⁴ microorganismes regroupés, d'après les méthodes culturales, en ~ 400 espèces issues des trois domaines du vivant : Bacteria, Archaea et Eukaryota. Au sein de cette flore, les procaryotes hydrogénéotrophes permettent le développement de la flore fermentaire colique responsable de processus digestifs fondamentaux. Cette hydrogénéotrophie se caractérise, selon les microorganismes présents, par la production de méthane (CH₄, méthanogénèse), de sulfure d'hydrogène (H₂S, sulfato-réduction) ou d'acétate (CH₃COO⁻, acétogénèse réductrice). Le méthane est exclusivement produit par des Archaea méthanogènes de l'ordre 1 (Méthanobactériales des espèces *Methanobrevibacter smithii* et *Methanosphaera stadtmanae*) [1]. Il est détectable dans l'air expiré chez un individu sur trois lorsque l'abondance en méthanogènes est supérieure à 10⁹ cell/g de selles [2, 3].

Origine et impact de la diversité inter-individuelle en flore méthanogène ?

Biodiversité des populations méthanogènes présentes.

Principe méthodologique



Résultats

Diversité des séquences mcrA obtenues

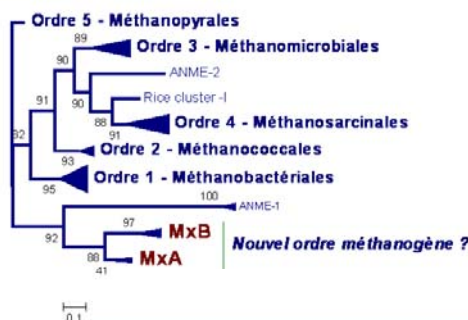
OTU	Echantillons	Taxon valide le plus proche (Accession)	% identité de séquence
<i>M. smithii</i>	15/15	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	> 99%
<i>M. stadtmanae</i>	3/15	<i>M. stadtmanae</i> (CAE48306)	> 99%
<i>M. smithii</i> - like	1/15	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	97,28% à 97,96%
MxA	1/15	<i>M. kandleri</i> (NP 613940)	65,99%
MxB	2/15	<i>M. kandleri</i> (NP 613940)	63,27%

Séquences mcrA provenant :

- d'espèces caractérisées comme colonisant le colon humain
- d'une Méthanobactériale phylogénétiquement proche de *M. smithii*
- **de 2 Archaea inconnues**

Phylogénie mcrA

Phylogénie réalisée après alignement (ClustalW) par maximum de vraisemblance (PhyML)
NB : Analyse ADNr 16S en cours



Conclusions

Mise en évidence de deux méthanogènes inconnus MxA et MxB
 Biodiversité au sein de la flore intestinale humaine jusqu'à présent sous-estimée
 MxA et MxB ne peuvent être rattachés à aucun des 5 ordres de méthanogènes décrits à ce jour

Perspectives

Culture de MxA et MxB → Caractéristiques métaboliques
 Impact de ce nouvel ordre sur :
 - l'écologie de la microflore colique ?
 - la physiologie digestive ?
 - la santé de l'hôte ?
 Analyse phylogénétique de l'ARNr 16S : confirmation d'un 6^{ème} ordre ?

Références

- [1] T.L. Miller, M.J. Wolin, Enumeration of *Methanobrevibacter smithii* in human feces, Arch Microbiol 131 (1982) 14-18.
- [2] M.D. LeVitt, J.K. Furne, M. Kuskowski, J. Ruddy, Stability of human methanogenic flora over 35 years and a review of insights obtained from breath methane measurements, Clin Gastroenterol Hepatol 4 (2006) 123-129.
- [3] J. Dore, B. Morvan, F. Rieu-Lesme, I. Goderef, P. Gouet, P. Pochart, Most probable number enumeration of H₂-utilizing acetogenic bacteria from the digestive tract of animals and man, FEMS Microbiol Lett 130 (1995) 7-12.

Annexe IV : 5ème Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, Mars 2008

5ème Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois

MISE EN EVIDENCE D'ESPECES D'UN NOUVEL ORDRE D'ARCHÉES METHANOGENES AU SEIN DE LA MICROFLORE COLIQUE HUMAINE

A. Mihajlovski, J. Doré, M. Atric et J.F. Brugère

UNIVERSITÉ D'Auvergne
INRA

Agnès Mihajlovski 27 mars 2008

ERT-CIDAM : plateau technologique

→ Développement d'outils moléculaires d'analyse de la flore intestinale humaine

Étude de la diversité de certains grands groupes métaboliques

Diversité et Distribution de la flore méthanogène chez l'homme

Agnès Mihajlovski 27 mars 2008

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes

Ordre 4 : Methanosarcinales (CH₃COO⁻ et/ou CH₃-X)

Ordre 3 : Methanomicrobiales (H₂)

Ordre 2 : Methanococcales (H₂)

Ordre 1 : Methanobacteriales (H₂)

Ordre 5 : Methanopyrales (H₂)

Phylogénie ARNr 16S – Garcia et al. 2002

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes et flore colique humaine

2 espèces appartenant à l'ordre des Methanobacteriales (Ordre 1) → HYDROGÉNOTROPHES

$4H_2 + CO_2 \xrightarrow{\text{Methanobrevibacter smithii}} CH_4 + 2H_2O$

$H_2 + CH_3OH \xrightarrow{\text{Methanosphaera stadtmanae}} CH_4 + H_2O$

Agnès Mihajlovski 27 mars 2008

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes et flore colique humaine

MATIERE ORGANIQUE → Fermentation → H₂

Sulfato-réduction
 $4H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-} + 4H_2O$

Acéto-génèse réductrice
 $4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$

Méthanogénèse
 $4H_2 + CO_2 \xrightarrow{M. smithii} CH_4 + 2H_2O$
 $CH_3OH + H_2 \xrightarrow{M. stadtmanae} CH_4 + H_2O$

→ 30 à 50% d'individus méthano-excréteurs
>10⁸ Archées méthanogènes/g de selles

Étude de la biodiversité des Archées Méthanogènes

Culture difficile → Approche moléculaire nécessaire

Agnès Mihajlovski 27 mars 2008

Biodiversité

Amplification du marqueur *mcrA* sur un panel de 73 individus

73 ADN Extraits de selles

- 29 nouveau-nés (3 semaines à 10 mois)
- 22 adultes (25 à 65 ans)
- 22 seniors (70 à 90 ans)

PCR Amorces dégénérées ciblant *mcrA* codant la sous-unité α de MCR I

Nouveau-nés 1/29

Adultes 16/22

Seniors 20/22

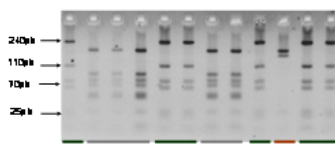
15 banques de 200 clones (6 adultes - 9 seniors)

Biodiversité

Criblage des banques et séquençage

→ **1^{ère} étape :** Criblage PCR
Sélection de 100 clones dont taille des inserts est de 480 ± 50 pb

→ **2^{ème} étape :** a) Criblage RFLP (*Restriction enzymatique* AluI-Csp6I)
b) Regroupement en profils identiques



■ profil *M. smithii* ■ profil *M. stadmanae* ■ profil inconnu

→ **3^{ème} étape :** Séquençage d'au moins un clone par profil

Agnès Mhajlovski 27 mars 2008

Résultats - Biodiversité

Diversité au sein des 15 selles *mcrA*⁺ sélectionnées

OTU*	Nombre d'échantillons	Taxon valide le plus proche (Numéro d'accèsion)	% identité de séquence
<i>M. smithii</i>	15/15	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	>99%
<i>M. stadmanae</i>	4/15	<i>M. stadmanae</i> (CAE48306)	>99%
Mx-01	1/15	<i>M. kandleri</i> (NP-613340)	66%
Mx-02	1/15	<i>M. kandleri</i> (NP-613340)	61%
Mx-03	2/15	<i>M. kandleri</i> (NP-613340)	63%

* OTU (Unité opérationnelle taxonomique) : séquences protéiques ayant une identité > 98%

Agnès Mhajlovski 27 mars 2008

Résultats - Biodiversité

Diversité au sein des 15 selles *mcrA*⁺ sélectionnées

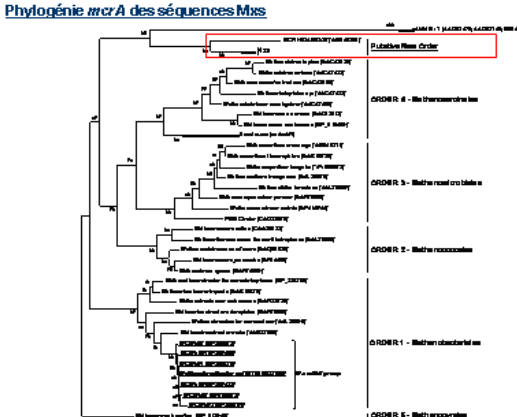
OTU*	Echantillons	Séquence la plus proche (Numéro d'accèsion)	% identité de séquence
Mx-01	1/15	Méthanogène non cultivé Selles de poulet (EF928045)	> 99%
Mx-02	1/15	Méthanogène non cultivé Selles de porc (EF928045)	> 99%
Mx-03	2/15	Méthanogène non cultivé Selles de porc (EF928045)	> 93%

* OTU (Unité opérationnelle taxonomique) : séquences protéiques ayant une identité > 98%

Agnès Mhajlovski 27 mars 2008

Résultats - Biodiversité

Phylogénie *mcrA* des séquences Mx



Agnès Mhajlovski 27 mars 2008

Distribution

73 ADN

PCR
Amorces spécifiques ciblant *mcrA* de :

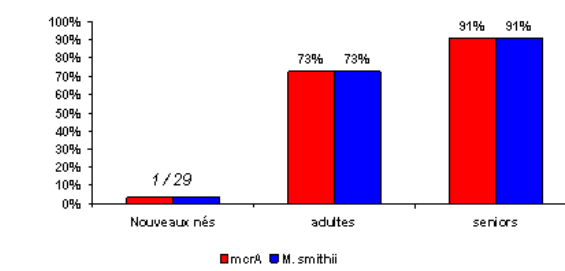
- *M. smithii*
- *M. stadmanae*
- Mx-01
- Mx-02
- Mx-03

Distribution

Agnès Mhajlovski 27 mars 2008

Résultats - Distribution

Proportion de selles *mcrA*⁺ et *M. smithii*⁺ au sein du panel de 73 individus



Catégorie	<i>mcrA</i> ⁺	<i>M. smithii</i> ⁺
Nouveaux nés	1/29	
adultes	73%	73%
seniors	91%	91%

Agnès Mhajlovski 27 mars 2008

Résultats - Distribution

Archéobactéries PCR II a pathogènes / Amibes pathogènes

	M. smithii	M. stadtmanae	Archéobactéries PCR II a pathogènes / Amibes pathogènes		
			Mx-01	Mx-02	Mx-03
ADULTES					
A01					
A04					
A03					
A05					
A06					
A07					
A08					
A09					
A10					
A11					
A12					
A13					
A14					
A15					
A16					
A17					
A18					
A19					
A20					
A21					
A22					
A23					
A24					
SENIORS					
S05					
S06					
A03 D					
A05 D					
A07 D					
A09 D					
A10 D					
A12 D					
A13 D					
A14 D					
A15 D					
A16 D					
A17 D					
A18 D					
A19 D					
A20 D					
A21 D					
A22 D					
A23 D					
A24 D					

Agnès Mhadjovski 27 mars 2008

CONCLUSIONS

Étude de la biodiversité des Archées méthanogènes :

→ Biodiversité supérieure à celle décrite à ce jour :

Mx-01 }
Mx-02 } 6^{ème} ordre potentiel
Mx-03 }

Étude de la distribution des Archées méthanogènes :

→ Proportion de selles présentant des Archées méthanogènes (selles *mcrA* +)
nouveau-nés (1/29) < adultes (70%) < seniors (90%)

→ Biodiversité des Archées méthanogènes supérieure chez les seniors
avec associations très fréquentes

***M. smithii* ± *M. stadtmanae* ± Mx-01 ± Mx-02 ± Mx-03**

Agnès Mhadjovski 27 mars 2008

PERSPECTIVES

Mise en évidence de 3 espèces nouvelles

- ↳ Méthanogènes ?
- ↳ Métabolisme ?
- ↳ Impact sur la physiologie digestive ?
- ↳ Influence sur la santé ?

→ Culture et isolement de Mx-01, Mx-02 et Mx-03
en cours

Potentiel 6^{ème} ordre d'Archées méthanogènes

→ Confirmation par analyse des séquences d'ADNr 16S
en cours

Agnès Mhadjovski 27 mars 2008



Annexe V : Journée de l'Ecole Doctorale, Mai 2008, Clermont-Ferrand

Journée de l'Ecole Doctorale

ARCHAEA POTENTIELLEMENT METHANOGENES DE LA MICROFLORE INTESTINALE HUMAINE

Mise en évidence d'un nouvel ordre composé de 3 espèces différentes

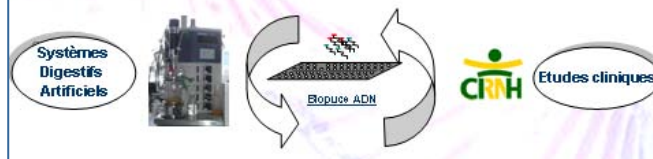
MIHAJLOVSKI A. ; ALRIC M. ; BRUGERE J-F.



Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

ERT-CIDAM : plateau technologique

Développement d'outils moléculaires d'analyse de la flore intestinale humaine



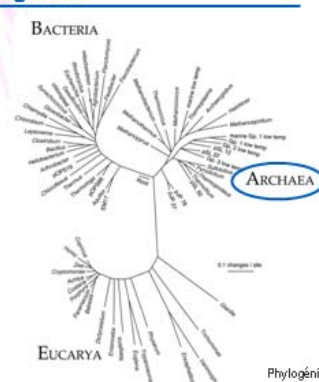
Étude de certains grands groupes métaboliques

↳ Biodiversité et Distribution de la flore méthanogène chez l'homme

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes

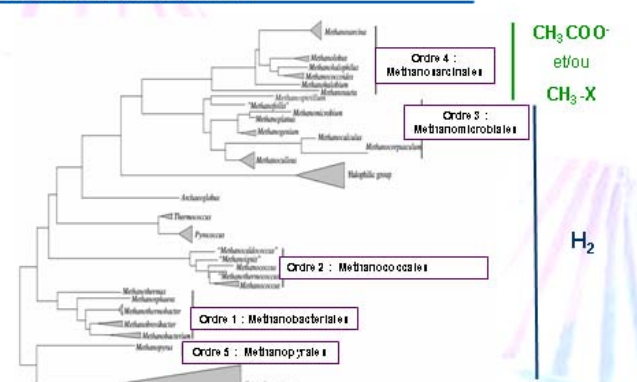


Phylogénie SSU ARNr – Pace 1997

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes



CH₃COO⁻ et/ou CH₃-X

H₂

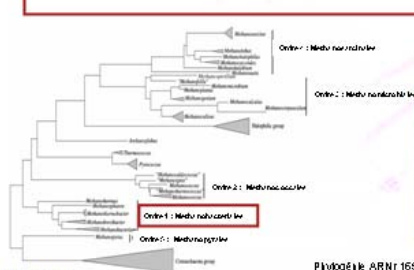
Phylogénie ARNr 16S – Garcia et al. 2002

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes et flore colique humaine

$4H_2 + CO_2 \xrightarrow{\text{Methanobrevibacter smithii}} CH_4 + 2H_2O$

$H_2 + CH_3OH \xrightarrow{\text{Methanospheera stadmanae}} CH_4 + H_2O$



Hydrogénéotrophes

Phylogénie ARNr 16S – Garcia et al. 2002

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Archées méthanogènes et flore colique humaine

MATIERE ORGANIQUE → Fermentation → H₂

Sulfato-réduction
 $4H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow S^{2-} + 4H_2O$

Acétogénèse réductrice
 $4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$

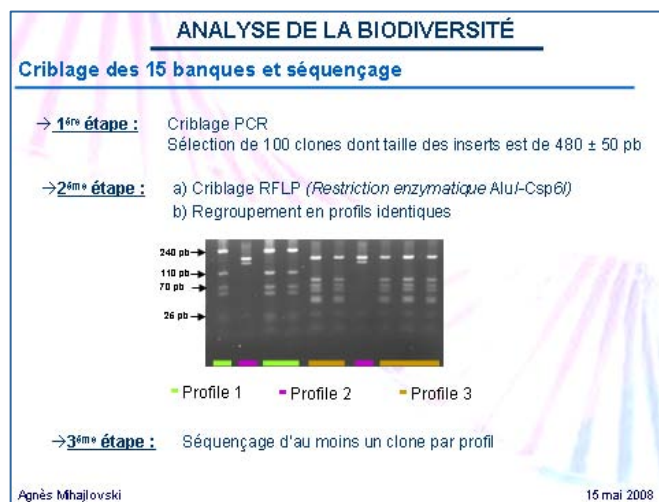
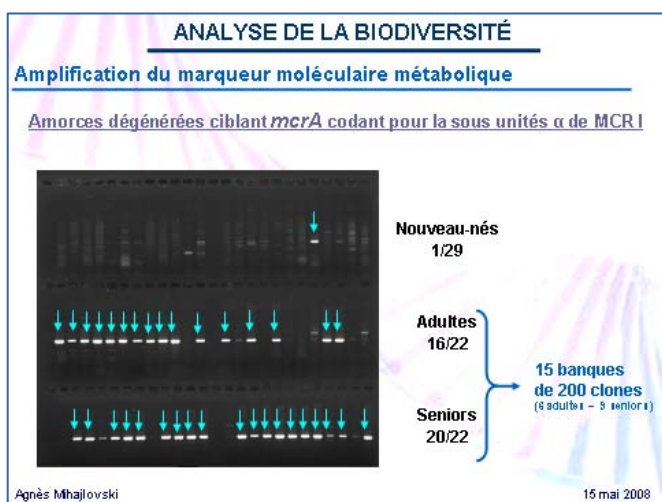
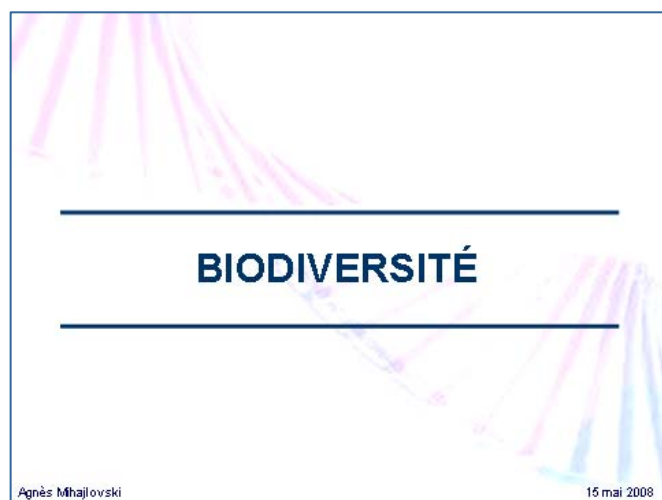
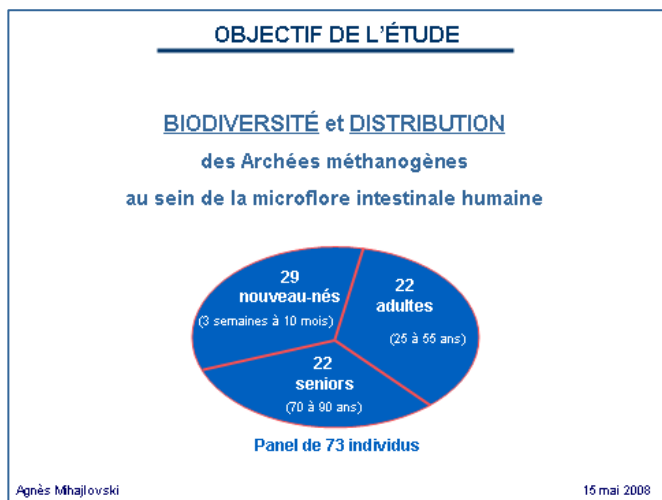
Méthanogénèse
 $4H_2 + CO_2 \xrightarrow{\text{M. smithii}} CH_4 + 2H_2O$
 $H_2 + CH_3OH \xrightarrow{\text{M. stadmanae}} CH_4 + H_2O$

→ 30 à 50% d'humains méthano-excréteurs
>10⁸ Archées méthanogènes/g de selles

Étude de la biodiversité des Archées Méthanogènes

Culture difficile → Approche moléculaire nécessaire

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008



RÉSULTATS DE LA BIODIVERSITÉ

Diversité au sein des 15 selles *mcrA*⁺ sélectionnées

OTU*	Nombre d'échantillons	Taxon valide le plus proche (Numéro d'accession)	% identité de séquence
<i>M. smithii</i>	15/15	<i>M. smithii</i> (ABB77886)	>99%
<i>M. stadtmanae</i>	4/15	<i>M. stadtmanae</i> (CAE48306)	>99%
Mx-01	1/15	<i>M. kandleri</i> (NP-613340)	66%
Mx-02	1/15	<i>M. kandleri</i> (NP-613340)	61%
Mx-03	2/15	<i>M. kandleri</i> (NP-613340)	63%

*OTU (Unité taxonomique opérationnelle) : séquences protéiques ayant une identité > 98%

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

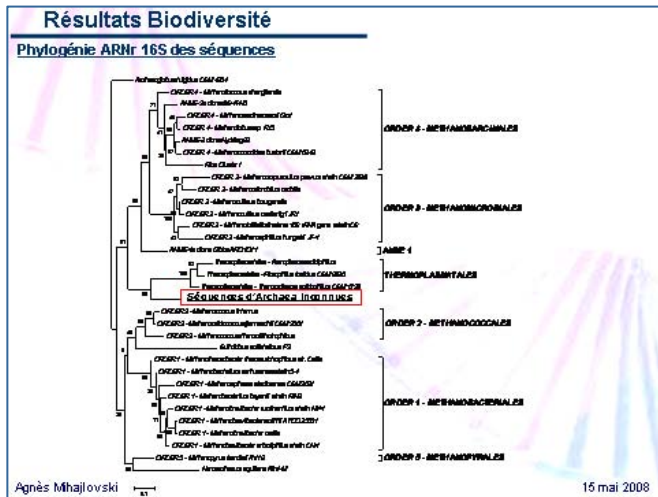
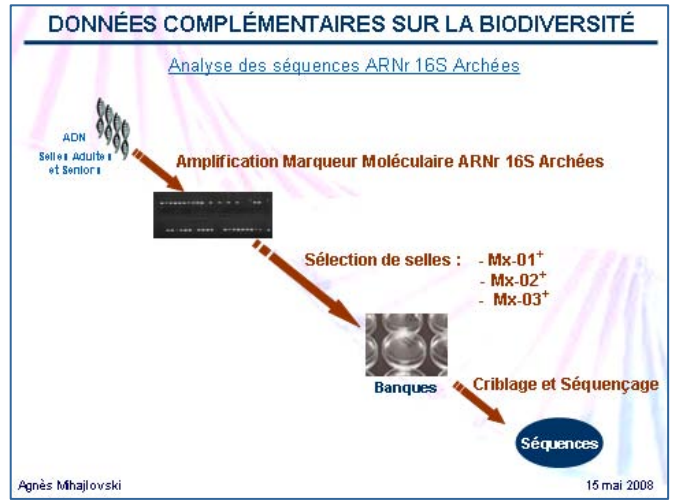
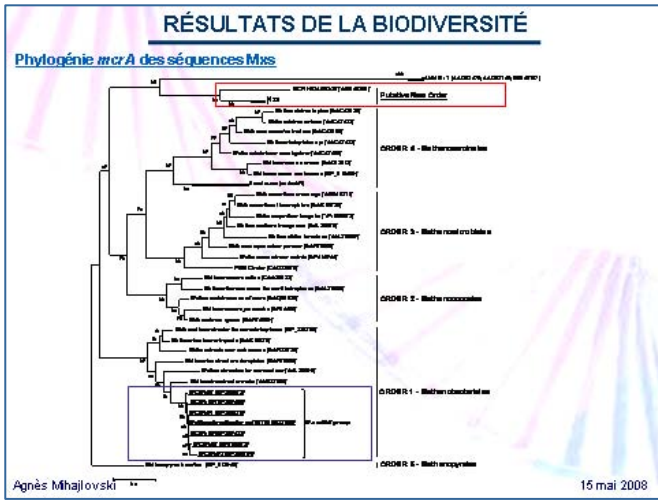
RÉSULTATS DE LA BIODIVERSITÉ

Diversité au sein des 15 selles *mcrA*⁺ sélectionnées

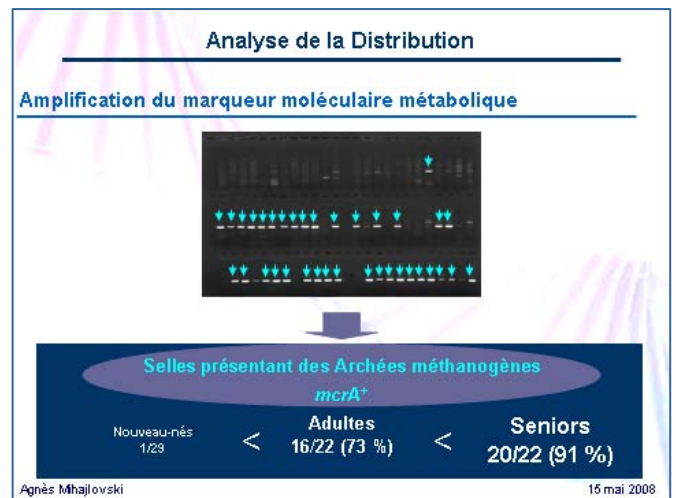
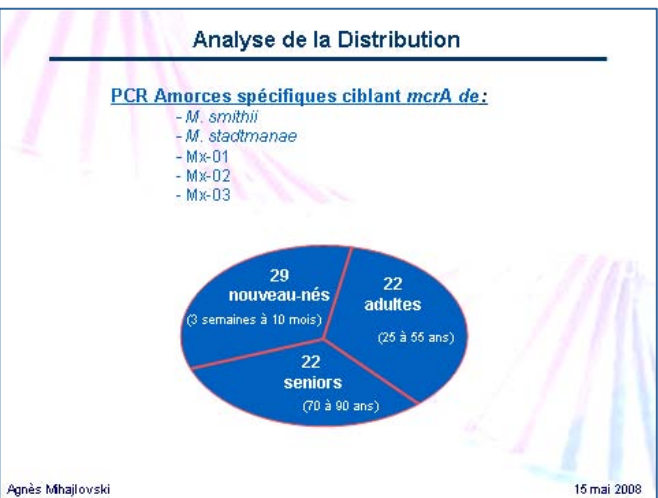
OTU*	Echantillons	Séquence la plus proche (Numéro d'accession)	% identité de séquence
Mx-01	1/15	Méthanogène non cultivé Selles de poulet (EF628045)	> 99%
Mx-02	1/15	Méthanogène non cultivé Selles de porc (EF628045)	> 99%
Mx-03	2/15	Méthanogène non cultivé Selles de porc (EF628045)	> 93%

*OTU (Unité opérationnelle taxonomique) : séquences protéiques ayant une identité > 98%

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008



DISTRIBUTION



RÉSULTATS DE LA DISTRIBUTION

		An piléris à base PC-II a été Mhajovski sur une même année				
		M. smithii	M. stadtmanae	Mx-01	Mx-02	Mx-03
ADULTES	C04					
	C06					
	C07					
	C08					
	C09					
	C10					
	C11					
	C12					
	C14					
	C15					
	C16					
	C18					
	C19					
	C20					
	C22					
	C23					
	C24					
SENIORS	C25					
	C26					
	C27					
	C28					
	C29					
	C30					
	A01 D					
	A02 D					
	A03 D					
	A04 D					
	A05 D					
	A06 D					
	A07 D					
	A08 D					
	A09 D					
	A10 D					
	A11 D					
A12 D						
A13 D						
A14 D						
A15 D						
A16 D						
A17 D						
A18 D						
A19 D						
A20 D						
A21 D						
A22 D						
A23 D						
A24 D						
A25 D						
A26 D						
A27 D						
A28 D						
A29 D						
A30 D						

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

CONCLUSIONS

Étude de la biodiversité des Archées méthanogènes :
 → Biodiversité supérieure à celle décrite à ce jour :

Mx-01 } 6^{ème} ordre potentiel
 Mx-02 }
 Mx-03 }

Étude de la distribution des Archées méthanogènes :
 → Proportion de selles présentant des Archées méthanogènes (selles *mcrA*⁺)
 nouveau-nés (1/29) < adultes (70%) < seniors (90%)

→ Biodiversité des Archées méthanogènes **supérieure** chez les **seniors** avec associations très fréquentes

M. smithii ± *M. stadtmanae* ± Mx-01 ± Mx-02 ± Mx-03

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

PERSPECTIVES

Mise en évidence de 3 espèces nouvelles

Méthanogènes ?
 → Recherche de nouveaux marqueurs de la méthanogenèse
en cours

Méthanogènes ? Métabolismes ?
 → Culture et isolement de Mx-01, Mx-02 et Mx-03
en cours

**Impact sur la physiologie digestive ?
 Influence sur la santé ?**

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

Remerciements

Jean-François Brugère Monique Alric

Simon Loïdice, Loïc Durand, Pauline Rougeron et Mathieu Kohon
 Sylvain Denis
 Marie Champod

Tous les membres de l'équipe de l'ERT-CIDAM

L'UMR CNRS 6023
 Et notamment les équipes de Gérard Fonty et Pierre Peyret

Agnès Mhajlovski 15 mai 2008

Annexe VI : Gut Microbiome _ INRA-RRI 2008, Juin 2008, Clermont-Ferrand

Frequent presence of a putative new Order of methanogens in the intestinal flora of seniors
A molecular-based study among 67 subjects

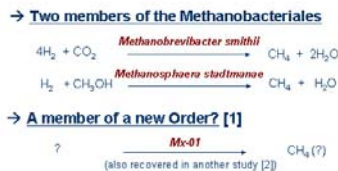


A. MIHAJLOVSKI¹, J. DORE², M. ALRIC¹ and J.F. BRUGERE¹
¹ERT CIDAM, Faculté de Pharmacie, Université Clermont-Fd I, CRNH Auvergne, IFR Santé 79, France
²Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA Jouy-en-Josas, France



CONTEXT AND OBJECTIVES

The methanogenic biodiversity of the human intestinal microflora:



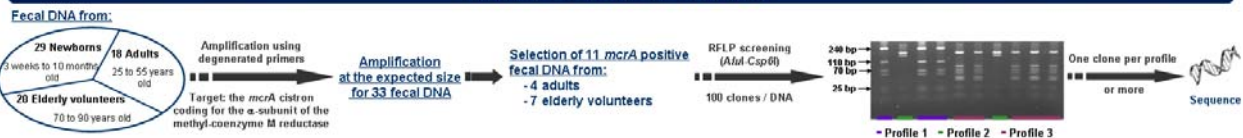
Do other methanogens inhabit the human gut?

Does their distribution and biodiversity increase with age

as it was observed for some other microbial populations and other hosts [3, 4]?

Aim of this work: Characterisation of the biodiversity and distribution of methanogenic Archaea among a panel of 67 volunteers of different ages

METHODS AND RESULTS



Sequences analyses and phylogeny

Biodiversity

Diversity recovered among the 11 selected mcrA positive stools

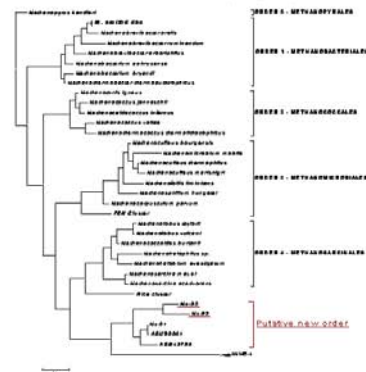
OTU*	Number of samples	Nearest valid taxon (accession number)	% sequence identity
<i>M. smithii</i>	11/11	<i>M. smithii</i> (AB977885)	>99%
<i>M. stadmanae</i>	3/11	<i>M. stadmanae</i> (CAE48305)	>99%
Mx-02	1/11	<i>M. kandleri</i> (NP 613940)	61%
Mx-03	2/11	<i>M. kandleri</i> (NP 613940)	63%

Usual methanogenic species inhabiting the human colon

2 unknown putative methanogenic Archaea

→ 63% identity between their amino acid sequences
 → less than 60% identity with the amino acid sequence of Mx-01

MCR α-subunit tree (PhyML)



Detection of each OTU using OTUs specific primers

Distribution

mcrA positive stools

Elderly volunteers
18/20 (90%)
 ↓
 Adults
14/18 (72%)
 ↓
 Newborns
1/29

Distribution of phylotypes among the mcrA positive stools

	<i>M. smithii</i>	<i>M. Stadmanae</i>	Mx-02	Mx-03
Elderly volunteers	18/18	6/18	3/18	8/18
Adults	14/14	2/14	0	1/14
Newborns	1/1	0	0	0

Note: Mx-01 was not recovered in any stools

Elderly volunteers

- ↳ Highest proportion of mcrA positive stools
- ↳ Highest methanogenic biodiversity
- ↳ Highest frequency of each phylotypes

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The biodiversity of methanogenic Archaea inhabiting the human intestinal tract probably higher than previously described
 Presence of Mx-02 and Mx-03 in addition to *M. smithii*, *M. stadmanae* and Mx-01

A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut [1]
 Mx-01, Mx-02 and Mx-03, distinct members of a new archaeal Order

Frequent presence of this putative new order in the intestinal microflora of elderly people

Methanogenic Archaea?
 Characteristics?

Isolation of Mx-01, Mx-02 and Mx-03

IMPACT OF THIS NEW ORDER ON HUMAN GUT PHYSIOLOGY

REFERENCES

[1] A. Mihajlovski, M. Alric, J.F. Brugere, 2008. A putative new order of methanogenic archaea inhabiting the human gut revealed by molecular analyses of the mcrA gene, Res Microbiol in press.
 [2] P.D. Scanlan, F. Shanahan, J.R. Marchesi, 2009. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis, BMC Microbiol 8: 79.
 [3] M.J. Hopkins, R. Sharp, G.T. Macfarlane, 2002. Variation in human intestinal microbiota with age, Dig Liver Dis 34 Suppl 2: S12-8.
 [4] A.E. Maczulak, M.J. Wolin, T.L. Miller, 1989. Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats, Appl Environ Microbiol 55 (10): 2468-73.

Annexe VII : 1^{ère} Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Juin 2008, Clermont-Ferrand

DIVERSIFICATION DE LA FLORE MÉTHANOGENÈ COLIQUE ET PRÉVALENCE D'UN NOUVEL ORDRE D'ARCHÉES MÉTHANOGENÈS CHEZ LES SENIORS



A. MIHAJLOVSKI¹, J. DORE², M. ALRIC¹ and J.F. BRUGERE¹
¹ ERT CIDAM, Faculté de Pharmacie, Université Clermont-Fd I, CRNH Auvergne, IFR Santé 79
² Unité d'Écologie et de Physiologie du Système Digestif, INRA Jouy-en-Josas



CONTEXTE ET OBJECTIFS

Biodiversité établie de la flore méthanogène humaine :



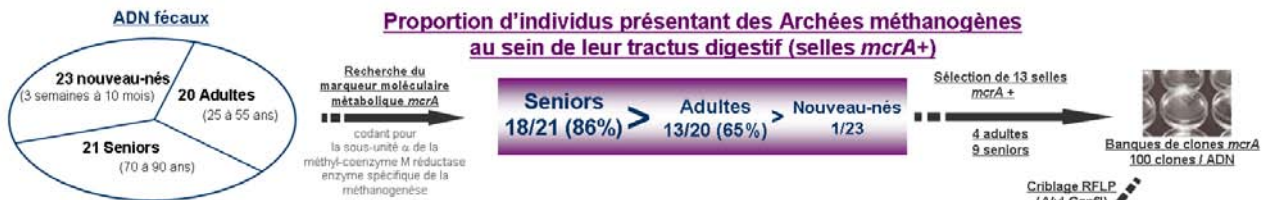
30 à 50% d'humains méthano-excréteurs
 ⇔ >10⁸ Archées méthanogènes/g de selles

Mise en évidence récente d'une nouvelle Archée méthanogène dans le tractus digestif de l'homme : *Mx-01* [1,2]

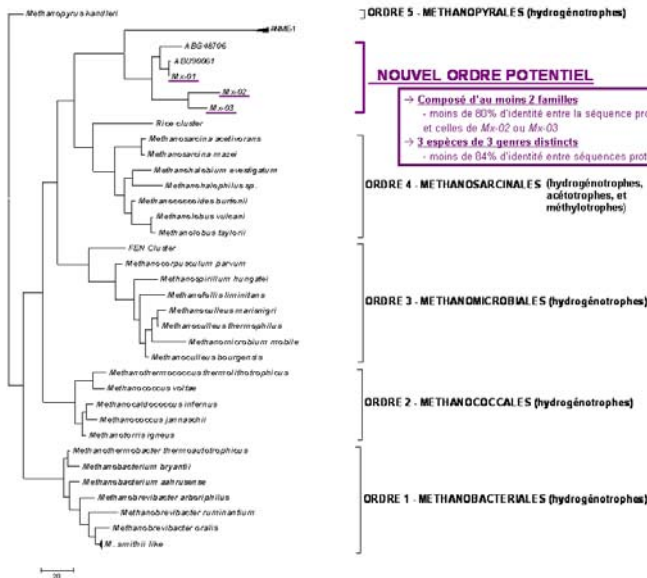
- Est-ce que d'autres Archées méthanogènes colonisent le tractus digestif de l'homme?
- Est-ce que leur distribution et leur biodiversité augmentent avec l'âge tel que cela a été démontré pour d'autres microorganismes et chez d'autres hôtes? [3, 4]

Objet de l'étude : Caractériser la biodiversité et la distribution de la flore méthanogène chez 63 individus d'âge variable

METHODE ET RESULTATS



Phylogénie MCR des séquences Mx (PhyML)



Diversité au sein des 13 selles mcrA+ sélectionnées

OTU*	Nombre d'échantillons	Taxon valide le plus proche (Numéro d'accèsion)	% identité de séquence
Mx-02	1/13	<i>M. kandleri</i> (Ordre 6) (NP-613940)	61%
Mx-03	2/13	<i>M. kandleri</i> (Ordre 6) (NP-613940)	63%
<i>M. smithii</i>	13/13	<i>M. smithii</i> (Ordre 1) (AB977886)	>99%
<i>M. stadmanae</i>	4/13	<i>M. stadmanae</i> (Ordre 1) (CA548305)	>88%

*OTU (Unité taxonomique opérationnelle) : séquences protéiques ayant une identité > 98%

Distribution des espèces dans les selles mcrA+

Seniors						
<i>M. smithii</i>	<i>M. stadmanae</i>	Mx-01	Mx-02	Mx-03	Ordre MX	
18/18	4/18	1/18	3/18	8/18	9/18 (50%)	
Adultes						
<i>M. smithii</i>	<i>M. stadmanae</i>	Mx-01	Mx-02	Mx-03	Ordre MX	
13/13	2/13	1/13	1/13	1/13	3/16 (23%)	
Nouveau-nés						
<i>M. smithii</i>	<i>M. stadmanae</i>	Mx-01	Mx-02	Mx-03	Ordre MX	
0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	

CONCLUSIONS

- Augmentation de la proportion d'individus porteurs de méthanogènes avec l'âge
- Biodiversité des Archées méthanogènes colonisant le tractus digestif humain supérieure à celle établie à ce jour
- Forte prévalence d'un nouvel ordre d'Archées méthanogènes chez les seniors
 Ordre composé d'au moins 2 familles et 3 genres différents
 Ordre présent chez 50% des seniors porteurs d'Archées méthanogènes (23% des adultes)

PERSPECTIVES

- Caractéristiques morphologiques et métaboliques de *Mx-01*, *Mx-02* et *Mx-03*
- Culture et/ou isolement de ces trois nouvelles espèces
- Impact de ce nouvel ordre sur la physiologie intestinale humaine

REFERENCES

[1] A. Mihajlovski, M. Alric, J.F. Brugere, 2008. A putative new order of methanogenic archaea inhabiting the human gut revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene, *Res Microbiol* 159 (516-521).
 [2] P.D. Scanlan, F. Shanahan, J.R. Marchesi, 2008. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis, *BMC Microbiol* 8: 79.
 [3] M.J. Hopkins, R. Sharp, G.T. Macfarlane, 2002. Variation in human intestinal microbiota with age, *Dig Liver Dis* 34 Suppl 2: S12-8.
 [4] A.E. Maczulak, M.J. Wolin, T.L. Miller, 1989. Increase in colonic methanogens and total anaerobes in aging rats, *Appl Environ Microbiol* 55 (10): 2468-73.

Annexe VIII : Article issu de travaux réalisés au Rowett Research Institute (M1R-2005)

British Journal of Nutrition (2007), 98, 364–372
© The Authors 2007

doi: 10.1017/S0007114507709091

Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man

Zoë Fuller^{1,2*}, Petra Louis², Agnès Mihajlovski², Vanessa Rungapamestry³, Brian Ratcliffe³ and Alan J. Duncan¹

¹Macaulay Institute, Craigiebuckler, Aberdeen AB15 8QH, UK

²Rowett Research Institute, Greenburn Road, Bucksburn, Aberdeen AB21 9SB, UK

³The Robert Gordon University, St Andrew Street, Aberdeen AB25 1HG, UK

(Received 26 September 2006 – Revised 7 February 2007 – Accepted 12 February 2007)

Glucosinolate consumption from brassica vegetables has been implicated in reduction of cancer risk. The isothiocyanate breakdown products of glucosinolates appear to be particularly important as chemoprotective agents. Before consumption, brassica vegetables are generally cooked, causing the plant enzyme, myrosinase, to be denatured, influencing the profile of glucosinolate breakdown products produced. Some human intestinal microflora species show myrosinase-like activity (e.g. bifidobacteria). We aimed to increase bifidobacteria by offering a prebiotic (inulin) in a randomised crossover study. Six volunteers consumed inulin (10 g/d) for 21 d followed by a 21 d control period (no inulin). Treatment periods were reversed for the remaining six volunteers. During the last 5 d of each period two cabbage-containing meals were consumed. Total urine output was collected for 24 h following each meal. Cabbage was microwaved for 2 min (lightly cooked) or 5.5 min (fully cooked). Faecal samples were collected at the start and after the inulin and control treatments. Bifidobacteria were enumerated by real-time PCR. Allyl isothiocyanate production was quantified by measuring urinary excretion of allyl mercapturic acid (AMA). Bifidobacteria increased following prebiotic supplementation ($P < 0.001$) but there was no impact of this increase on AMA excretion. AMA excretion was greater following consumption of lightly cooked cabbage irrespective of prebiotic treatment ($P < 0.001$). In conclusion, the most effective way to increase isothiocyanate production may be to limit the length of time that brassica vegetables are cooked prior to consumption.

Isothiocyanate: Prebiotic: Bifidobacteria: Cooking

Increased intake of brassica vegetables and brassica-containing foods (e.g. mustard, horse radish) may be of benefit for cancer prevention^{1,2}. This is thought to be partly due to the presence of glucosinolates (thioglucoside phytochemicals) in brassica vegetables. They are accompanied in the plant by the thioglucosidase enzyme, myrosinase (thioglucoside glucosyltransferase, EC 3.2.3.1). Following tissue disruption (during cutting or chewing), glucosinolates come in contact with myrosinase and the resulting hydrolysis yields a range of active aglycone products including isothiocyanates, nitriles and cyano-epithioalkanes³. Isothiocyanates influence xenobiotic metabolising enzyme expression and apoptosis^{4–6} and may explain the cancer-protective effect of brassica vegetable consumption⁷. However, not all epidemiological studies demonstrate a protective role for brassica vegetables^{8,9} and this may be due to differences in release of breakdown products in different situations.

In general, man consumes brassica vegetables following processing. Myrosinase is denatured by the application of heat during cooking¹⁰ and this has implications for the amount and composition of breakdown products available to man. Consumption of raw vegetables containing plant-derived

myrosinase activity produces rapid hydrolysis of glucosinolates and the release of isothiocyanates may primarily occur in the upper digestive tract¹¹. The isothiocyanates are absorbed and rapidly excreted as conjugates in the urine. Consumption of cooked brassica with denatured myrosinase permits intact glucosinolates to pass through the upper digestive tract and enter the colon^{12,13} where they may be hydrolysed by the gut microbiota. The different sites of release and absorption of hydrolysis products of glucosinolates may have implications for the cancer-protective properties of brassica vegetables.

Apoptosis was increased in the colon crypts of dimethylhydrazine-treated rats following absorption of allyl isothiocyanate from fresh Brussels sprout juice or raw sprouts in the upper intestine. Therefore a systemic delivery of glucosinolate metabolites to the colonic epithelium may be effective for chemoprotection⁶. However, the release of allyl isothiocyanate from purified sinigrin (with no plant myrosinase) into the colon has also been shown to enhance apoptosis and reduce the formation of aberrant crypt foci in dimethylhydrazine-treated rats, indicating that a localised production of allyl isothiocyanate may also be of benefit¹⁴. The most effective route

Abbreviations: AMA, allyl mercapturic acid.

* Corresponding author: Dr Zoë Fuller, Rowett Research Services, Rowett Research Institute, fax +44 (0)1224 715760, email z.fuller@tesco.net

of delivery of glucosinolate metabolites is not yet clear. Indeed it is probable that both systematic and luminal delivery are important for maximising the chemoprotective effect of brassica vegetables.

Some genera of the human intestinal microflora (e.g. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Bacteroides*) possess myrosinase-like activity^{15,16}. Three species of bifidobacteria of human origin have been shown to be capable of degrading the glucosinolates sinigrin and glucotropaeolin *in vitro*¹⁷. *Lactobacillus agilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*, isolated from human faeces, have also been reported to convert sinigrin to allyl isothiocyanate *in vitro*^{16,18}. Incubation of human faeces with cooked watercress (in which plant myrosinase had been denatured) *in vitro* also yielded isothiocyanates¹⁹. Bacteria may hydrolyse glucosinolates consumed in a cooked vegetable meal and release hydrolysis products directly into the lumen of the colon. Enhancement of selected microbial populations in the colon of human faecal flora-associated rats alters the biological effects of glucosinolates consumed in rapeseed meal and may also alter vegetable glucosinolate effects²⁰. Bifidobacteria residing in the colon may be enhanced following the consumption of prebiotics²¹. Prebiotics are fermentable, indigestible food ingredients that selectively stimulate growth and/or activity of a limited number of bacterial species resident in the colon²². Given the availability of pre- and probiotic supplements and the potential for myrosinase-like activity in lactobacilli and bifidobacteria, an investigation into the effect of enhanced microflora populations on glucosinolate metabolism in man is needed.

In the current study we sought to enhance colonic bifidobacterial populations in human subjects by the use of a commercially available prebiotic to investigate the influence of changes to the colonic bacterial population on the hydrolysis of glucosinolates. We hypothesised that any changes to glucosinolate hydrolysis brought about through prebiotic supplementation would be manifest following consumption of cooked cabbage but not after consumption of cabbage retaining myrosinase activity.

Experimental methods

Subjects

Twelve healthy, Caucasian, non-smoking adult volunteers (three male, nine female; mean age 38.1 (SEM 2.43), range 25–51 years; mean BMI 25.0 (SEM 1.09), range 19.8–31.5 kg/m²) were recruited from academic institutions in Aberdeen. After discussion with the study investigator the volunteers provided a record of informed consent. The volunteers did not consume medical drugs or supplements during the study period. The protocol and all procedures were approved by the NHS Trust Grampian Research Ethics Committee.

Study design

The subjects were randomly split into two groups prior to participating in a crossover study design. Group 1 consumed the recommended amount of a commercially available prebiotic formulation (92% inulin-oligofructose + 8% glucose-fructose-sucrose; Beneo™, DKSH/Orafti Great Britain Ltd, Beckenham, Kent, UK) for a 21 d treatment period which included a test meal period during the last 5 d. A 21 d control period, during which no supplement was consumed, followed immediately and this control period also concluded with a 5 d test meal period. The second group completed the control and treatment periods in reverse order (Fig. 1). During the prebiotic treatment period, volunteers were provided with sachets of pre-weighed quantities (5 g) of the prebiotic supplement. The contents of each sachet were dissolved in 100 ml water immediately prior to consumption. One prebiotic sachet was consumed twice daily (at breakfast and evening meal) for 21 d. This level of consumption represented 50% of the maximum daily dose rate recommended by the manufacturers. The 10 g daily prebiotic dose contained approximately 0.04 MJ (10.7 kcal) which could lead to an increase in energy intake of 0.5% assuming a normal energy intake of 8.3 MJ/d (2000 kcal/d). This increase in energy intake was much lower than the natural day-to-day variation in energy intake of 20–30%²³ and was not considered sufficient to challenge

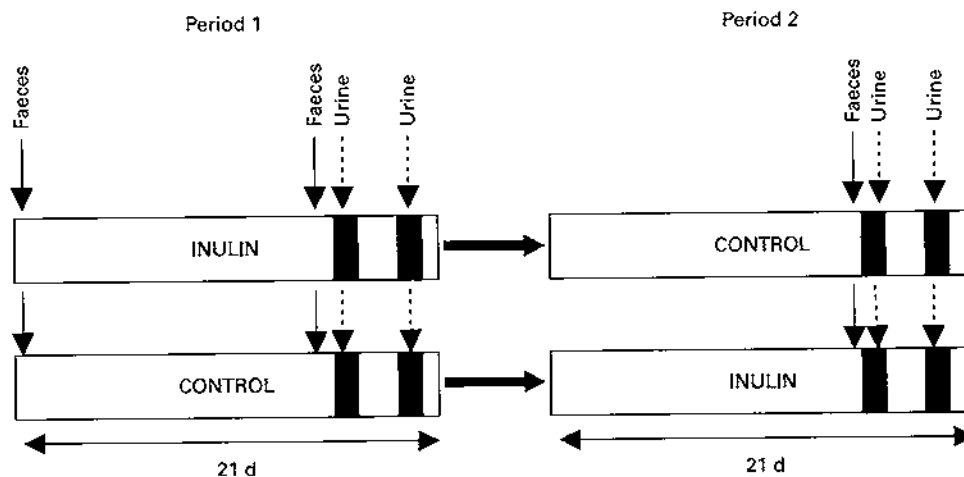


Fig. 1. Study design indicating the timing of cabbage meals and faecal and urine collections. Black rectangles indicate the consumption of a cabbage-containing meal.

the interpretation of the results. In general, compliance to the study protocol was good. Out of the forty-two inulin doses one volunteer missed four and two volunteers each missed two doses.

Vegetable treatments

Within each 5 d test meal period each volunteer was offered a test meal on day 1 and again on day 4 at 12.30 hours. The second test meal was consumed 72 h after the first to permit clearance of urinary metabolites between the cabbage meals. Clearance has been shown to occur within 24 h in previous work¹³. For 2 d prior to consumption of the first test meal and until the end of each test meal period, subjects were asked to avoid consumption of potential sources of glucosinolates. A list of glucosinolate-containing vegetables and food-stuffs was provided at the outset of the study and verbal reminders were given at each test meal. To check volunteer compliance, a simple food diary was completed for 2 d prior to, and during, each test meal period.

Each test meal consisted of a 150 g portion of white cabbage with a standard meal of chicken and rice (containing no glucosinolates), followed by a glucosinolate-free dessert course (summer fruit and ice cream). Alongside each cabbage meal each volunteer was provided with a 70 ml drink consisting of an extract made from 50 ml water and 9 g ground broccoli seeds (GEO organic broccoli seeds; UK Juicers Ltd, York, UK), in which myrosinase had been denatured by heating (80°C for 10 min¹³). Solid matter was removed by sieving the seed and water mixture before 20 ml fresh orange juice and 10 g Canderel (aspartame) artificial sweetener were added to improve palatability. The drink contained high concentrations of the nitrile hydrolysis product of glucoraphanin, the metabolism of which is being investigated in a further study.

A homogeneous source of large white cabbage (var. Colmar; Kettle Produce, Cupar, UK) was used. Each cabbage was divided into a series of nine longitudinal wedges. Each wedge weighed 150 g and contained consistent proportions of inner and outer leaves. Residual cabbage was discarded. Each cabbage wedge was roughly chopped. Four portions were microwave cooked for 2 min (750 W; Whirlpool UK Ltd, Croydon, Surrey, UK) in a dish containing 16 ml water and covered with pierced PVC cooking film while a further four were microwave cooked for 5.5 min under the same conditions. Cooking times were chosen to provide meals with similar sinigrin content but different myrosinase activities (2 min – lightly cooked, retaining active, naturally available plant myrosinase; 5.5 min – fully cooked, containing denatured natural myrosinase) and were chosen based on the results of a previous study²⁴. Cabbage treatments were offered in a randomised order to each individual. One portion from each cooking treatment per cabbage along with the remaining raw portion was reserved for subsequent analysis. These portions were placed on a plate and left at room temperature for the duration of the volunteers' meal. At the end of each meal, these cabbage portions were snap-frozen in liquid nitrogen and maintained at –20°C for analysis of glucosinolate concentrations and myrosinase activity. As the type and quantity of active ingredients may vary between individual cabbage heads, the identity of the cabbage head consumed by each

volunteer was recorded to permit accurate determination of the intake of glucosinolates and myrosinase by each volunteer.

Cabbage samples were freeze-dried, ground and maintained at –20°C prior to glucosinolate and myrosinase analyses. The glucosinolate content of the cabbage samples was determined using HPLC by the methods^{25,26} described in Rungapamestry *et al.*²⁴. The myrosinase activity of the cooked cabbage was determined using a UV visible spectrophotometer (Cary 50; Varian Ltd, Yarnton, Oxford, UK) to measure the rate of disappearance of sinigrin from a test mixture²⁷. Standard curves were run each day using commercially prepared myrosinase isolated from *Sinapis alba* (white mustard seed; Sigma Aldrich, Poole, UK). One unit of myrosinase activity is defined as that which will produce 1.0 µmol glucose/min from sinigrin at pH 6.0 and 25°C.

Urine collection and analysis

Prior to consumption of the test meal each volunteer provided a spot sample of urine to enable the determination of background concentrations of glucosinolate metabolites. Total urine collections were obtained for 24 h after each cabbage test meal. The 24 h collection was separated into four time periods (0–4, 5–9, 10–19 and 20–24 h). Since volunteers were free-living, urine samples were kept in insulated bags containing cool blocks to reduce possible degradation of the compounds of interest during the collection period. The pH of the urine was not modified. For each collection period, urine volume was measured by a study investigator and recorded. Four 20 ml aliquots from each collection receptacle were placed in sealed tubes (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) and maintained at –20°C until analysis.

Urinary metabolites of isothiocyanates derived from glucosinolates contained in the cabbage meals were quantified in the urine samples. The major aliphatic glucosinolate in cabbage is sinigrin which, on hydrolysis by myrosinase, forms allyl isothiocyanate. Allyl isothiocyanate is metabolised by the mercapturic acid pathway prior to urinary excretion as *N*-acetyl (allylthiocarbamoyl)-L-cysteine (hereafter referred to as allyl mercapturic acid; AMA). AMA excreted in the urine was measured using the method¹³ as adapted from Mennicke *et al.*²⁸ AMA and *N*-acetyl (phenylthiocarbamoyl)-L-cysteine (phenyl mercapturic acid) were synthesised according to Mennicke *et al.*²⁹ for use as standards in the analysis. Phenyl mercapturic acid (dissolved in deionised water–ethanol, 50:50, v/v) was used as an internal standard and calibration curves for AMA (R^2 0.9993 (SEM 0.0002)) were analysed within each batch of samples for quantification of the amount of AMA excreted. Each sample was analysed in duplicate. Discrepancy between duplicate samples was always less than 5%.

Faecal collection and analysis

At three points during the study volunteers provided a faecal sample to enable changes in bifidobacterial numbers relative to the total bacteria population to be monitored. Faecal samples were obtained at the outset of the study for determination of baseline bifidobacterial population ratios and also at day 16 of both the prebiotic treatment and control periods (Fig. 1). At each time-point, the subjects placed a 10 g

sub-sample of faeces into a collection tube. Samples were further aliquoted before being maintained at -20°C for later analysis by real-time PCR.

Quantitative real-time PCR

Standard template DNA was prepared from the 16S rRNA gene of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 20438 by amplification with primers 27F and RP2 and purification as described previously³⁶. Standard curves were prepared as described previously³¹ with either universal primers UniF (GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA³², modified) and UniR (ACGTCRTCCMCNCTTCCTC³², modified), or *Bifidobacterium*-specific primers BifF (TCGCGTCYGGTGTGAAAG³³) and g-Bifid-R (GGTGTCTTCCCGATATCTACA³⁴). Both primer sets resulted in very similar standard curves (PCR efficiency 95.9 (SEM 0.92) % for universal primers and 96.7 (SEM 1.34) % for *Bifidobacterium*-specific primers).

DNA from faecal samples was extracted using the DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France). DNA concentrations were determined with a NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). DNA was diluted to 0.5 ng/ μl in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ herring sperm DNA for amplification with universal primers UniF and UniR and 5 ng/ μl in 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ herring sperm DNA for amplification with *Bifidobacterium*-specific primers BifF and g-Bifid-R. Herring sperm DNA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used for all DNA dilutions as carrier DNA, as it significantly increased the accuracy of the data, especially at low DNA concentrations. The absence of cross-reactivity with either primer pair was confirmed by real-time PCR under the same conditions as described later.

PCR reactions were performed as described previously³¹. Starting quantities of all bacterial and bifidobacterial 16S rRNA genes were determined using the iCycler IQ software version 3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) to calculate the percentage of bifidobacterial genes. The detection limit was 0.01 % of total bacterial 16S rRNA genes.

Statistical analyses

Data are expressed as means and their standard errors. One volunteer withdrew from the study after completion of the control period and prior to data collection for the prebiotic period. Total glucosinolate concentrations, sinigrin concentrations and myrosinase activity in lightly and fully cooked cabbage were subjected to general ANOVA with cooking treatment as the main effect. Samples from the same cabbage head were treated as a block in the ANOVA to correct for background variation between heads of cabbage.

Changes in faecal bifidobacterial populations were assessed by ANOVA using individual as a block to account for inter-individual variation. Orthogonal contrasts were used to compare bifidobacterial populations in faecal samples collected at the three time-points, day 0 (baseline), day 16 and day 37 (Fig. 1). The potential effect of baseline bifidobacterial population on the stimulatory effect of inulin was investigated using analysis of covariance on bifidobacterial populations after 16 d of inulin supplementation using the background population (day 1) of bifidobacteria as a covariate. As the two groups of volunteers experienced the

inulin and control treatments in different orders, the effect of order of treatment was investigated using ANOVA to detect the interaction between group of volunteers and prebiotic treatment.

AMA output over 24 h was used as a variate to assess the effect of cooking treatment and prebiotic treatment on allyl isothiocyanate production. Each individual's total AMA excretion was expressed as a proportion of the individual's intake of sinigrin in the cabbage meal to derive a recovery for AMA. The main effects of cooking treatment and prebiotic treatment together with their interaction, on AMA recovery, were assessed within individuals. Individuals were used as blocks and AMA excretion in different time periods was compared using orthogonal contrasts. The interaction between cooking time and AMA excretion in each time period was also investigated.

To determine if the extent of change in the bifidobacterial population recorded after the inulin treatment was related to the extent of change in AMA excretion after the differently cooked cabbage meals, a correlation analysis was performed.

All statistical analyses were performed using GenStat version 8.1 (Lawes Agricultural Trust, Harpenden, Hertfordshire, 2005).

Results

Glucosinolate concentrations in cabbage

Raw cabbage contained the following glucosinolates (mean $\mu\text{mol}/\text{g DM}$): sinigrin, 9.54 (SD 4.01); glucoiberin, 4.97 (SD 3.14); glucobrassicin, 2.56 (SD 0.91); progoitrin, 1.39 (SD 0.47); gluconapin, 0.89 (SD 0.28); 4-methoxyglucobrassicin, 0.69 (SD 0.22); 4-OH glucobrassicin, 0.24 (SD 0.06); gluconapoleiferin, 0.07 (SD 0.02); neoglucobrassicin, 0.05 (SD 0.05); glucoraphanin, 0.02 (SD 0.02). Glucosinolate concentrations in cooked cabbage did not differ from raw values (Fig. 2). The proportion of sinigrin to total glucosinolates did not differ between the 2 and 5.5 min cooking treatments (2 min = 43.7 %; 5.5 min = 43.1 %).

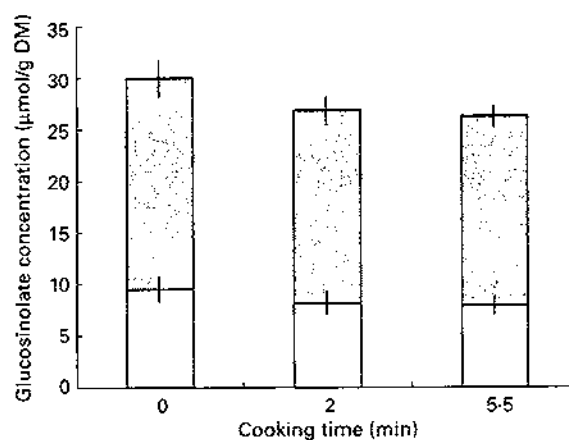


Fig. 2. Total glucosinolate (\square) and sinigrin (\square) concentrations in raw (0 min), lightly cooked (2 min) and fully cooked (5.5 min) cabbage. Values are means with their standard errors depicted by vertical bars (n 9 for lightly cooked and fully cooked cabbage; n 5 for raw cabbage).

Myrosinase activity in cabbage treatments

Myrosinase activity was reduced from 21.5 (SEM 13.29) units/g DM (291.8 units/150 g fresh weight portion consumed) in raw cabbage to 2.44 (SEM 0.25) (35.5 units/150 g fresh weight portion consumed) and 0.87 (SEM 0.05) units/g DM (17.67 units/150 g fresh weight portion consumed) in cabbage cooked for 2 and 5.5 min, respectively. Myrosinase activity was higher in cabbage following a 2 min period of microwave cooking than following the 5.5 min cooking period ($P=0.043$).

Faecal bifidobacterial population

Inulin supplementation increased the relative proportion of bifidobacteria in faecal samples by approximately two-fold ($P<0.001$, Fig. 3). In two volunteers the percentage of bifidobacterial 16S rRNA genes was below the detection limit in baseline samples. The presence of a small population of bifidobacteria was detected in one volunteer after inulin supplementation but no change was noted for the other. Although retained in the analysis these results were not sufficient to eliminate the increase shown overall. Baseline bifidobacterial populations varied markedly between individuals as indicated by a large range in values (the minimum population was below detection and maximum was 4.6% of the total bacterial genes) and standard error (mean 1.80 (SEM 0.45) bifidobacterial genes as a percentage of total genes) but the stimulatory effect of inulin supplementation was not dependent on the baseline population ($P=0.236$) or the order in which the prebiotic and control periods were experienced ($P=0.162$).

Urinary excretion of glucosinolate metabolites

All mercapturic acid excretion data were corrected for individual glucosinolate intakes. Following the 48 h period of abstinence from brassica vegetables and glucosinolate-containing foods immediately prior to each cabbage meal, mercapturic acid concentrations in baseline urine samples were essentially zero (Fig. 4). AMA excretion in the 24 h following the meal

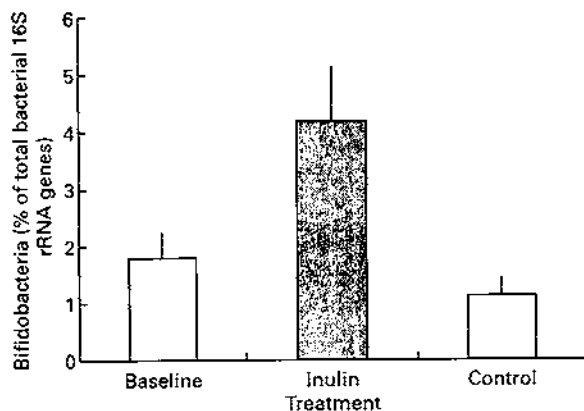


Fig. 3. Faecal bifidobacterial population prior to (baseline, $n=12$), after 16 d of inulin supplementation (inulin, $n=11$) and following a 16 d control period (control, $n=12$). Values are means with their standard errors depicted by vertical bars.

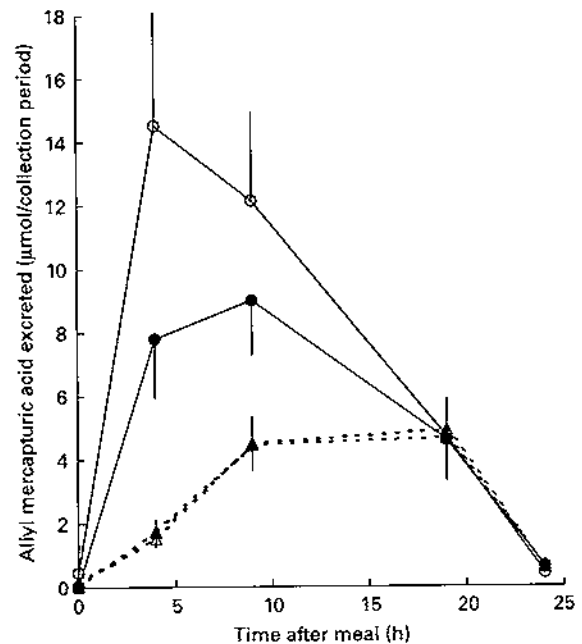


Fig. 4. Excretion of allyl mercapturic acid ($\mu\text{mol/collection period}$) during the 24 h following meals containing lightly cooked (2 min) cabbage during prebiotic treatment (●, $n=11$) and control (○, $n=12$) periods or fully cooked (5.5 min) cabbage during prebiotic treatment (▲, $n=11$) and control (△, $n=12$) periods. Values are means with their standard errors depicted by vertical bars.

was greater following consumption of lightly cooked cabbage (mean recovery 23.3 (SEM 1.9) %) than fully cooked cabbage (mean recovery 7.7 (SEM 0.76) %, $P<0.001$). Prebiotic supplementation did not significantly influence AMA excretion after either cabbage cooking treatment (prebiotic treatment mean recovery 14.6 (SEM 2.01) %, control mean recovery 15.8 (SEM 2.40) %, $P=0.880$). The pattern of AMA excretion over time was different between the cooking treatments ($P<0.001$). Consumption of lightly cooked cabbage resulted in a peak of mercapturic acid excretion between 4 and 9 h following the cabbage meal in contrast to the excretion after consumption of cooked cabbage which peaked between 9 and 19 h (Fig. 4). Excretion of AMA in the urine was negligible by the end of the 24 h period irrespective of prebiotic treatment or cabbage cooking time.

Despite the significant increase in the proportion of faecal bifidobacteria during the prebiotic treatment period there was no association between the change in bifidobacteria and the change in AMA excretion after consumption of the fully cooked cabbage meal ($R=-0.416$; $P=0.179$). Although ten of the eleven volunteers that completed both the prebiotic and control periods demonstrated an increase in faecal bifidobacteria in response to inulin supplementation, the extent of change had no relation to either the extent or even direction of change of AMA excretion between periods (Fig. 5).

Discussion

Hydrolysis of glucosinolates in the colon or caecum has been known for some time¹². The gastrointestinal microflora of rats and poultry have the ability to hydrolyse glucosinolates^{15,35,36}

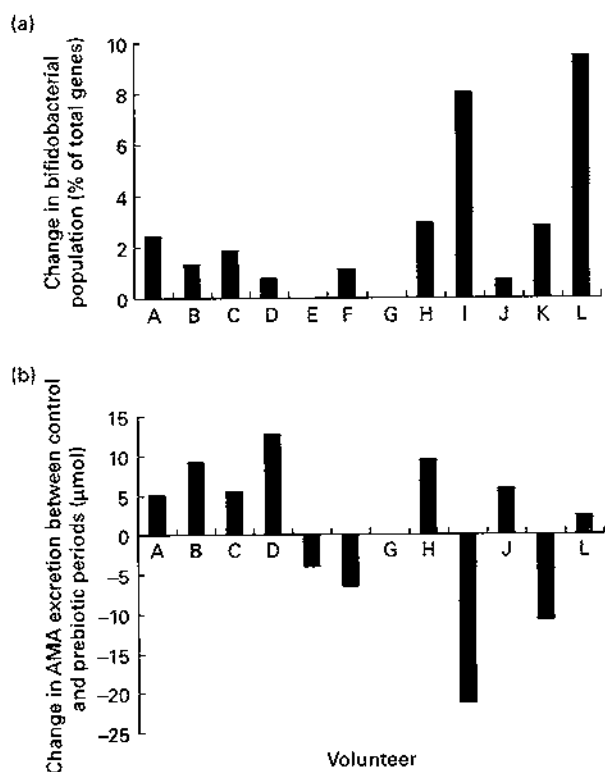


Fig. 5. Individual changes in (a) faecal bifidobacterial populations (% of total bacterial 16S rRNA genes) and (b) excretion of allyl mercapturic acid (AMA) after consumption of a fully cooked (5.5 min) cabbage meal, between control and prebiotic treatment periods. Volunteer G withdrew from the study before the start of the inulin consumption period.

as demonstrated by the development of negative side-effects of isothiocyanate exposure such as goitre following excessive progoitrin consumption even in the absence of dietary myrosinase. The myrosinase activity of the intestinal microflora is physiologically relevant as the biological effects of consumption of cruciferous vegetables do not occur when germ-free animals are provided with a glucosinolate-rich but myrosinase-free diet³⁶. This activity is not confined to laboratory animals; human microflora also show myrosinase-like activity as demonstrated when mechanical and antibiotic bowel cleansing in man decreased the isothiocyanate excreted following consumption of a cooked brassica homogenate from 11 to 1% of the dose³⁷. As the intake of cooked brassica (i.e. glucosinolate consumption) leads to a low delivery of isothiocyanates to the gastrointestinal tract relative to consumption of the raw vegetable (i.e. isothiocyanate consumption²⁷) but is a common form of ingestion, there could be advantages in maximising isothiocyanate production through manipulation of the microflora.

Although not fully investigated, several genera of the human colonic microflora such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Bacteroides* have been reported to possess myrosinase-like activity¹⁵⁻¹⁷. Enhancement of some or all of these species may reasonably be expected to increase excretion of mercapturic acids following the consumption of a cooked brassica meal. Ingestion of prebiotics (indigestible, fermentable oligosaccharides) such as inulin has been widely reported

to increase bifidobacterial populations in the human colon^{21,38,39}. A 16d period of inulin consumption was sufficient to increase faecal bifidobacterial populations significantly relative to the total bacterial microflora in the current study. Baseline faecal samples from two volunteers did not harbour a detectable population of bifidobacteria and little or no enhancement of the population was shown in these individuals. Large inter-individual variation in faecal bifidobacterial populations has been reported⁴⁰ and interestingly some rats do not display myrosinase-like activity in their colonic microflora¹². However, despite having undetectable populations of bifidobacteria, the two volunteers demonstrated evidence of colonic myrosinase-like activity due to their excretion of mercapturic acids after consumption of the fully cooked cabbage. This indicated that microbial glucosinolate breakdown does occur in the absence of high numbers of bifidobacteria, presumably through the action of other bacterial species, possibly lactobacilli or bacteroides, which have been shown to display myrosinase-like activity^{15,16}.

Despite the strong, positive influence of inulin consumption on faecal bifidobacteria there was no effect of this increase on urinary output of mercapturic acid following consumption of the fully cooked cabbage meal. This may have been because the additional fermentable carbohydrate (inulin) could have led to a decrease in colonic pH due to the increased production of fermentation acids by the gut microbiota. A reduction in pH has been demonstrated when human flora-associated rats were fed a diet containing 10% inulin in one study⁴¹, although not shown in a second study by the same group⁴². A decrease in the pH of the hydrolysis environment may be of importance since nitrile rather than isothiocyanate formation is favoured in an acidic environment⁴³⁻⁴⁵. It is possible that rather than forming isothiocyanate or nitrile breakdown products, glucosinolates could be hydrolysed to amines, or that isothiocyanates formed in the colon could be degraded to amines prior to absorption⁴⁶.

There is some evidence that inulin supplementation can influence liver detoxification enzyme activity⁴⁷. This appears to be associated with changes to the SCFA profile of the colon. Our use of urinary mercapturic acids as markers of isothiocyanate production in the digestive tract assumed consistent post-absorptive metabolism of isothiocyanates via the mercapturate pathway across treatments; treatment-related alterations in isothiocyanate metabolism could have undermined this assumption. Since we found no evidence that inulin altered urinary concentrations of mercapturic acids, this was not a major concern for this experiment but in further work this possible interference could be excluded by simultaneously monitoring post-absorptive metabolism of homologous isothiocyanates as has been done previously¹³.

Isothiocyanates are highly reactive compounds and could react rapidly with compounds present in the colon to form other derivatives¹⁷ or could have been metabolised to different final products by the microflora prior to absorption by the host¹¹. It is also likely that inulin has positive effects on other, perhaps currently unidentified, bacterial species within the complex colonic environment. However, as inulin supplementation did not lead to a statistically significant effect on AMA excretion, microbial changes in the microflora were not investigated further. Differences in glucosinolate-mediated toxic effects observed in different animal species

seem to be due to differences in their microfloral composition⁴⁸. Altering human microfloral composition may, therefore, have varied effects on glucosinolate metabolism. However, as the proportion of the total human microflora accounted for by the bifidobacteria (0.6–15.6%⁴⁰) is relatively small it is possible that even large increases in the population will have only negligible effects on glucosinolate metabolism.

In the current study, we have demonstrated that consumption of lightly cooked cabbage is associated with a large and rapid excretion of AMA (the digestive metabolite of allyl isothiocyanate, released upon breakdown of the glucosinolate sinigrin) similar to that which follows consumption of raw cabbage¹³. AMA output was significantly greater following consumption of lightly cooked than after consumption of fully cooked cabbage. It was also apparent that the production of allyl isothiocyanate was more rapid as excretion of AMA peaked between 4 and 9 h following ingestion of the lightly cooked cabbage meal compared to a peak at 9–19 h after consumption of fully cooked cabbage. This agrees with other studies which have compared mercapturic acid output following intake of cooked or raw brassica^{13,19,27,49}. Cooking treatment may also alter the proportions of breakdown products arising from plant myrosinase-catalysed breakdown of glucosinolates. A protein, called epithiospecifier protein, has been found in some brassicas and acts to direct glucosinolate breakdown towards epithionitrile rather than isothiocyanate formation in raw vegetables⁵⁰. However, short periods of heat treatment (2 min) denature epithiospecifier protein and result in maximal production of isothiocyanates²⁴. The greater output of AMA after consumption of lightly cooked rather than fully cooked cabbage indicates that brassica vegetables may be subjected to a short period of heat treatment, prior to consumption, which may enhance their palatability while retaining their maximum potential to deliver isothiocyanates to the digestive tract.

It is notable that after both cabbage treatments urinary mercapturic acid output was less than could be expected if all of the sinigrin ingested was transformed into allyl isothiocyanate and metabolised to AMA. Other authors have noted this phenomenon, reporting glucosinolate recoveries as mercapturic acids of 0.30–0.67 after intake of raw watercress⁵¹, 0.10 and 0.30 after consumption of steamed and raw broccoli, respectively⁴⁹, and 0.15 and 0.37 after consumption of microwaved and raw cabbage respectively¹³. There are several reasons why this may be the case. On hydrolysis, glucosinolates break down into a variety of products. The formation of nitrile breakdown products may be favoured in acidic conditions, such as in the stomach, but we have yet to identify a measurable urinary metabolite for glucosinolate-derived nitriles, so have no information on the extent and kinetics of nitrile metabolism. Intact glucosinolates may pass through the digestive tract and be excreted in the faeces but, to date, this has been demonstrated only in germ-free rats^{11,52}. This is unlikely to occur in a normal human digestive tract as glucosinolates are not recovered in rat faeces when a colonic microflora is present¹¹.

In conclusion, an increase in the relative faecal bifidobacterial population had no influence on the excretion of allyl isothiocyanate which we interpret as being reflective of their having no influence on production. It appears that the

most effective way of increasing isothiocyanate production is to limit the length of time of cooking for brassica vegetables prior to consumption.

Acknowledgements

Financial support for this project was provided by the Food Standards Agency (project code T01027, 'Influence of cooking and processing of brassica vegetables on the release of beneficial and harmful metabolites of glucosinolates in the digestive tract'). P. Louis is supported by the Scottish Executive Environment and Rural Affairs Department. The authors especially thank the volunteers for their participation in, and compliance with, the study protocol; Mrs Heather Scott for her help in serving the cabbage meals; M. Brewer and G. Holtrop from Biomathematics & Statistics Scotland for their statistical advice; and DKSH/Orafti Great Britain Ltd for supplying Beneo™.

References

- Steinmetz KA & Potter JD (1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* **96**, 1027–1039.
- Verhoeven DTH, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H & van den Brandt PA (1996) Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**, 733–748.
- Fenwick GR, Heaney RK & Mullin WJ (1983) Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* **18**, 123–201.
- Talalay P (1989) Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* **28**, 237–250.
- Zhang Y, Kensler TW, Cho C-G, Posner GH & Talalay P (1994) Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3147–3150.
- Smith TK, Mithen R & Johnson IT (2003) Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts *in vivo*. *Carcinogenesis* **24**, 491–495.
- Rose P, Faulkner K, Williamson G & Mithen R (2000) 7-Methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* **21**, 1983–1988.
- Michels KB, Giovannucci E, Kaumudi JJ, Rosner BA, Stampfer MJ, Fuchs CS, Colditz GA, Speizer FE & Willett WC (2000) Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *J Nat Cancer Inst* **92**, 1740–1752.
- Flood A, Velie EM, Chatterjee N, Subar AF, Thompson FE, Lacey JV, Schairer C, Troisi R & Schatzkin A (2002) Fruit and vegetable intakes and the risk of colorectal cancer in the Breast Cancer Detection Demonstration Project follow-up cohort. *Am J Clin Nutr* **75**, 936–943.
- Krui C, Humblot C, Philippe C, Vermeulen M, van Nuenen M, Havenaar R & Rabot S (2002) Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic *in vitro* large-intestinal model. *Carcinogenesis* **23**, 1009–1016.
- Rouzaud G, Rabot S, Ratcliff B & Duncan AJ (2003) Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *Br J Nutr* **90**, 395–404.

12. Michaelsen S, Otte J, Simonsen L-O & Sorensen H (1994) Absorption and degradation of individual intact glucosinolates in the digestive tract of rodents. *Acta Agric Scand Sect A Anim Sci* **44**, 25–37.
13. Rouzaud G, Young SA & Duncan AJ (2004) Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 125–131.
14. Smith TK, Lund EK & Johnson IT (1998) Inhibition of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and induction of apoptosis in rat colon following oral administration of the glucosinolate sinigrin. *Carcinogenesis* **19**, 267–273.
15. Nugon-Baudon L, Rabot S, Wal J-M & Szylit O (1990) Interactions of the intestinal microflora with glucosinolates in rapeseed meal toxicity: first evidence of an intestinal *Lactobacillus* possessing a myrosinase-like activity *in vivo*. *J Sci Food Agric* **52**, 547–559.
16. Elfoul L, Rabot S, Khelifa N, Quinsac A, Duguay A & Rimbault A (2001) Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Micro Lett* **197**, 99–103.
17. Cheng D-L, Hashimoto K & Uda Y (2004) *In vitro* digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food Chem Toxicol* **42**, 351–357.
18. Palop ML, Smiths JP & ten Brink B (1995) Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *Int J Food Microbiol* **26**, 219–229.
19. Getahun SM & Chung F-L (1999) Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 447–451.
20. Roland N, Rabot S & Nugon-Baudon L (1996) Modulation of the biological effects of glucosinolates by inulin and oat fibre in gnotobiotic rats inoculated with a human whole faecal flora. *Food Chem Toxicol* **34**, 671–677.
21. Kruse H-P, Kleessen B & Blaut M (1999) Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *Br J Nutr* **82**, 375–382.
22. Gibson GR, Beatty EB, Wang X & Cummings JH (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* **108**, 975–982.
23. Bingham SA (1987) The dietary assessment of individuals; methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Nutr Abstr Rev* **57**, 705–742.
24. Rungapamestry V, Duncan AJ, Fuller Z & Ratcliffe B (2006) Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cooked for different durations. *J Agric Food Chem* **54**, 7628–7634.
25. Minchinton I, Sang J, Burke D & Truscott RJW (1982) Separation of desulphoglucosinolates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **247**, 141–148.
26. EU (1997) Oil seeds – determination of glucosinolates. *Off J Eur Communities* **L170**, 28–34.
27. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK & Talalay P (2001) Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 501–508.
28. Mennicke WH, Kral T, Krumbiegel G & Rittmann N (1987) Determination of *N*-acetyl-*S*-(*N*-alkylthiocarbonyl)-*L*-cysteine, a principal metabolite of alkyl isothiocyanates, in rat urine. *J Chromatogr* **414**, 19–24.
29. Mennicke WH, Gorler K & Krumbiegel G (1983) Metabolism of some naturally occurring isothiocyanates in the rat. *Xenobiotica* **13**, 203–207.
30. Louis P, Duncan SH, McCrae SI, Millar J, Jackson MS & Flint HJ (2004) Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *J Bacteriol* **186**, 2099–2106.
31. Belenguer A, Duncan SH, Calder G, Holtrop G, Louis P, Lobley GE & Flint HJ (2006) Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3593–3599.
32. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F & Takashiba S (2003) Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *teiQ* and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* **39**, 81–86.
33. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L & Palva A (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **97**, 1166–1177.
34. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H & Tanaka R (2002) Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5445–5451.
35. Slominski BA, Campbell LD & Stanger NE (1987) Influence of cecectomy and dietary antibiotics on the fate of ingested intact glucosinolates in poultry. *Can J Anim Sci* **67**, 1117–1124.
36. Nugon-Baudon L, Szylit O & Raibaud P (1988) Production of toxic glucosinolate derivatives from rapeseed meal by intestinal microflora of rat and chicken. *J Sci Food Agric* **43**, 299–308.
37. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK & Talalay P (1998) Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 1091–1100.
38. Gibson GR (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr* **129**, 1438S–1441S.
39. Tuohy KM, Finlay RK, Wynne AG & Gibson GR (2001) A human volunteer study on the prebiotic effects of HP-inulin – faecal bacteria enumerated using fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). *Anaerobe* **7**, 113–118.
40. Lay C, Sutren M, Rochet V, Saunier K, Dore J & Rigottier-Gois L (2005) Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. *Environ Microbiol* **7**, 933–946.
41. Humblot C, Lhoste E, Knasmüller S, Gloux K, Bruneau A, Bensaada M, Durao J, Rabot S, Andrieux C & Kassie F (2004) Protective effects of Brussels sprouts, oligosaccharides and fermented milk towards 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxicity in the human flora associated F344 rat: role of xenobiotic metabolising enzymes and intestinal microflora. *J Chromatogr B* **802**, 231–237.
42. Humblot C, Bruneau A, Sutren M, Lhoste EF, Dore J, Andrieux C & Rabot S (2005) Brussels sprouts, inulin and fermented milk alter the faecal microbiota of human microbiota-associated rats as shown by PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis using universal, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* 16S rRNA gene primers. *Br J Nutr* **93**, 677–684.
43. VanEtten CH & Daxenbichler ME (1971) Formation of organic nitriles from progoitrins in leaves of *Crambe abyssinica* and *Brassica napus*. *J Agric Food Chem* **19**, 194–195.
44. Gil V & MacLeod AJ (1980) The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucosidase glucohydrolase preparation. *Phytochemistry* **19**, 2547–2551.

45. Uda Y, Kurata T & Arakawa N (1986) Effects of pH and ferrous ions on the degradation of glucosinolates by myrosinase. *Agric Biol Chem* **50**, 2735–2740.
46. Combourieu B, Elfoul L, Delort A-M & Rabot S (2001) Identification of new derivatives of sinigrin and glucotropaeolin produced by the human digestive microflora using ¹H NMR spectroscopy analysis of *in vitro* incubations. *Drug Metab Dispos* **29**, 1440–1445.
47. Roland N, Nugon-Baudon L, Andrieux C & Szylił O (1995) Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. *Br J Nutr* **74**, 239–249.
48. Nugon-Baudon L & Rabot S (1994) Glucosinolates and glucosinolate derivatives: implications for protection against chemical carcinogenesis. *Nutr Res Rev* **7**, 205–231.
49. Conway CC, Getahun SM, Liebes LL, Pusateri DJ, Topham DKW, Botero-Omary M & Chung F-L (2000) Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr Cancer* **38**, 168–178.
50. Matsheski NV, Juvik JA & Jeffery EH (2004) Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry* **65**, 1273–1281.
51. Chung F-L, Morse MA, Eklind KI & Lewis J (1992) Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1**, 383–388.
52. Kassie F, Rabot S, Kundi M, Chabicovsky M, Qin H-M & Knasmüller S (2001) Intestinal microflora plays a crucial role in the genotoxicity of the cooked food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ). *Carcinogenesis* **22**, 1721–1725.

