THESE

Pour l'obtention du Grade

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National – Arrêté du 25 mai 2016)
Ecole Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biochimie, Biologie Moléculaire

Présentée par :

Florine Ecale

****

Mise en place de modèles de microbiotes intestinal et cutané *in vitro* pour l'étude de leur interaction avec les xénobiotiques

****

Directeurs de Thèse :

Marie-Hélène RODIER, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Poitiers, HDR
Alexandre CREPIN, Maître de Conférences, Université Poitiers

****

Soutenue le 12 février 2021

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Rapporteurs :

Laurence DELHAES, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Bordeaux, HDR
Vincent THOMAS, Responsable du projet de recherche Microbiome, BIOASTER, HDR

Examinateurs :

Stéphanie BLANQUET-DIOT, Maître de Conférences, HDR, Université Clermont Auvergne
Jean-Marc BERJEAUD, Professeur des Universités, Poitiers, HDR
Marie-Hélène RODIER, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Poitiers, HDR
Alexandre CREPIN, Maître de Conférences, Université Poitiers

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées

Marie Curie (1867 – 1934)

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, dans l'équipe de Microbiologie De l'Eau en collaboration avec l'entreprise Eurofins Discovery Cerep. Je tiens à remercier ***Manilduth Ramnath****, manager du projet,* ***Benoit Fouchaq****, initiateur du projet et* ***Jean-Marc Berjeaud****, chef d'équipe puis directeur du laboratoire et coordinateur scientifique du projet pour m'avoir fait confiance pour ce travail.*

Je souhaite remercier ***Laurence Delhaes*** *et* ***Vincent Thomas*** *de me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse.*

Je remercie également ***Stéphanie Blanquet*** *et* ***Jean-Marc Berjeaud****, pour me faire l'honneur d'être jury de ces travaux.*

Je tiens à remercier sincèrement, ***Marie-Hélène Rodier*** *et* ***Alexandre Crépin****, mes directeurs de thèse sans qui tout ce travail n'aurait pas été aussi agréable.*

Marie-Hélène*, je ne vous connaissais pas bien avant de commencer ma thèse, juste en tant que chef d'équipe. J'ai appris à connaitre une chercheuse et une femme formidable. Vos multiples fonctions ont fait que vous n'étiez pas tout le temps présente au laboratoire mais quand même toujours disponible pour moi quand il le fallait. Notre bureau commun nous a permis de nous rapprocher et d'apprendre un peu plus à nous connaitre. Un petit glissement de tête sur le côté de nos ordinateurs et une discussion scientifique ou personnelle émergeait. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi et vous souhaite le meilleur pour la retraite : les champignons, la broderie, la maison de campagne ou juste ne rien faire.*

Alexandre*, on a démarré ce projet de thèse sans trop savoir comment ça allait se passer avec un nouveau sujet pour le laboratoire. Tout n'a pas toujours été facile mais on y est arrivé ! Tu as toujours été disponible pour moi-même quand je me suis posé des questions parfois bizarres. Tu m'as aussi laissé faire mes propres choix tout en me conseillant et je t'en remercie. Je pense que c'est de cette manière qu'on apprend et qu'on avance. Je suis fière d'avoir été ta première doctorante. Je sors de cette expérience grandie et tout cela c'est grâce à vous deux. Merci !*

Jean-Marc*, je crois que sans vous, Erwan et Alexandre E, je ne serais pas là. Je vous suis reconnaissante de m'avoir fait confiance pour ce stage de L3 qui m'a fait comprendre que je voulais travailler dans le monde de la recherche. Je suis arrivée dans un laboratoire rempli de bonne humeur où il fait bon vivre et je n'ai plus voulu partir. Je voudrais encore vous remercier d'avoir pensé à moi et de m'avoir fait confiance pour lancer un nouveau projet au laboratoire avec cette thèse.*

Manil*, je te remercie pour m'avoir fait confiance dans ce projet et pour ta bonne humeur lors de nos réunions. Grâce à ce projet j'ai acquis de nouvelles compétences et ce fut un réel plaisir de travailler sur ce beau projet.*

Aziz*, malgré le peu de temps que tu as passé au laboratoire, tu as grandement fait avancer le projet. Tu t'es investi pour finir tes dernières manips avant de partir et je t'en remercie. Après ton départ tu as toujours été réactif pour répondre aux nombreuses questions que je me suis posée sur la métagénomique. Merci pour tes réponses claires. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir.*

***Stéphanie**, tu es arrivée dans mon projet au milieu de ma thèse mais ton arrivée a été une véritable bouffée d'air frais pour moi tant sur le plan professionnel que personnel. Tu m'as tellement aidé pour la culture des anaérobies, sans toi je n'aurais pas pu tout faire. Je ne t'en remercierai jamais assez. On en a passé du temps autour de cette enceinte (au bureau aussi d'ailleurs) à refaire le monde et après mon départ je te confie mon jouet. Ta soif d'apprendre et d'aider est admirable. Steven m'avait prévenu et il n'avait pas tort ! Surtout ne change pas, garde ta bonne humeur à toute épreuve, elle est tellement agréable ! Tu vas vraiment me manquer, j'espère retrouver une collègue en or comme toi un jour.*

***Nicolas**, l'acquisition des données de spectrométrie de masse n'a pas été une mince affaire pour les parabènes mais vous avez toujours été présent pour recommencer et recommencer encore. Merci beaucoup !*

***Jérôme**, je voudrais te remercier pour tout le travail que tu as fourni sur les analyses en spectrométrie de masse pour les échantillons du microbiote intestinal. Il y en avait beaucoup (beaucoup), mais promis c'est presque terminé ! Merci pour tes petits mots d'encouragements sur la fin de cette thèse, c'est toujours agréable.*

***Julien**, sans toi je ne rédigerais pas ces remerciements de thèse. Je voudrais te remercier d'avoir donné sa chance à la petite étudiante de L3 assise par terre devant les TP qui n'avait pas de stage et d'avoir réitéré l'expérience plusieurs années de suite. Il fallait être un peu fou ^^. Plusieurs années sont passées depuis et je t'en suis toujours aussi reconnaissante. Merci de m'avoir fortement conseillé de choisir le master recherche dans lequel je me suis épanouie et qui m'a permis d'arriver là où j'en suis actuellement. Tu m'as transmis cette passion que tu portes pour la recherche. C'est assez difficile de coucher sur le papier toute la gratitude que je te porte, alors un seul mot MERCI !*

***Clément**, tellement de chose à te dire. La vague de départ de 2019, nous a mis un petit coup au moral à tous les deux. Mais on a su surmonter ça ! On a passé des heures à papoter en salle de pause, sur ces merveilleux fauteuils verts tout moches ! Nos goûters / apéros me manquent déjà. Notre dernier paquet de cacahuètes remonte à quelques jours avant l'annonce du premier confinement, ça fait beaucoup trop longtemps ! Ta maison (et le PLB) a été notre QG pour grands nombres de nos soirées jeux, raclettes, sushi, apéros dinatoires, pizzas et j'en passe. Tout cela va drôlement me manquer. Ton aide avec les méandres de word, R et insckape a été plus que précieuse pour moi. Grâce à toi maintenant je suis capable de naviguer en solo pour beaucoup de taches ^^ Prends soin de toi, je te souhaite le meilleur pour la suite et de t'épanouir comme tu le mérites.*

***Steven**, mon cher enquiquineur préféré. Je sais que j'ai été une personne récalcitrante et j'en suis très fière ! Maintenant, je m'ennuie sans toi mais bon j'ai Dropi pour me tenir compagnie ! Tu sais depuis que tu es parti il n'y a plus personne pour combler les blancs à table et on se surprend tous à penser à toi dans ces moments-là. Donc tu vois même à des milliers de kilomètres et un océan qui nous séparent on pense toujours à toi. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour les bons moments qu'on a passé ensemble, tu as grandement participé à la bonne humeur qui régnait dans notre petit groupe.*

***Yoann et Lena**, merci d'avoir égayé mes longues soirées en solo avec vos invitations à partager un bon repas. Je sais que je peux toujours compter sur vous, merci beaucoup. Lena, merci pour ces sorties, soirées à parler de tout et de rien. Finalement, on n'aura pas été beaucoup au sport ensemble mais je promets d'y retourner dès que ça sera possible. Vous m'avez permis de me changer les idées à de nombreuses reprises en m'écoutant me plaindre dans les mauvais moments. Je sais que je peux toujours compter sur vous, merci !*

***Aurélien**, merci de voir toujours le bon côté des choses. C'est agréable de discuter avec toi, tu es franc et c'est une énorme qualité. Ces derniers moments n'ont pas toujours été faciles mais tu as toujours été là pour m'écouter et me donner de bons conseils, j'espère pouvoir te rendre la pareille si tu as besoin un jour ! Tu seras le prochain du laboratoire à soutenir, alors je te donne tout mon courage !*

***Meg**, ton départ avec Steven a laissé un grand vide. Je me souviens de nos séances de sophrologie qui nous ont fait tant de bien. C'était chouette de partager tous ces moments en ta compagnie. J'espère que ton retour en terre sacrée te comble autant sur le plan personnel que professionnel.*

***MHC**, je te remercie pour ton accueil et ta bienveillance. On a beaucoup discuté de Legio durant mon master. Tu es une personne très à l'écoute et grâce à toi j'ai découvert le développement personnel et la sophrologie. Je t'en remercie car ça m'a beaucoup aidé à prendre du recul dans ma thèse et dans ma vie personnelle.*

***Audrey**, je voudrais te dire que tu as toutes les capacités pour mener à bien une excellente thèse. N'hésite pas à t'écouter si tu as une intuition et garde des forces pour les déployer tout au long de ces 3 années. **Guillaume**, tu verras en science tout n'avance pas comme on le souhaiterait mais quand ça fonctionne enfin on est vraiment les plus heureux. Persévère et n'oublie pas que la science (et la thèse par la même occasion) c'est un échange constant. Une petite idée peut tout débloquer. **Roukaya**, tu es sur la dernière ligne droite, courage pour la rédaction du manuscrit. On s'en sort tous, non sans mal, mais on y arrive. Vous êtes une partie de la relève, je vous souhaite de prendre autant de plaisir que j'en ai pris.*

***Anne**, je te remercie pour toute l'aide et l'expertise que tu as apportée au projet. Tu as passé beaucoup de temps avec moi pour me faire comprendre les analyses en métagénomique et tu es toujours disponible si j'ai une question. Nous avons partagé beaucoup de discussions tant professionnelles que personnelles dans ce bureau. **Willy**, nous n'avons pas beaucoup travaillé ensemble durant cette thèse mais je te remercie de tous les petits conseils que tu m'as donnés tout le long de mon parcours (M1-M2 puis thèse). Ce fut un réel plaisir de partager ton bureau. **Vincent D**, tu es un chercheur tellement enthousiaste que c'est un réel plaisir de discuter avec toi. Grâce à toi, j'ai compris un peu plus la métagénomique, et je t'en remercie. Ta bonne humeur à toute épreuve, les parties de molki durant les pauses déjeuners des deux derniers étés, les verres aux bars vont me manquer. Et promis, si j'arrive à faire un pot pour fêter ma thèse je n'apporterai pas de concombre ! **Ascel**, nous n'avons pas travaillé ensemble durant cette thèse (un peu en master), pourtant tu as toujours été là dans mes petits coups de mou avec les bons mots. Il est très facile de discuter avec toi, ne change pas ! **Romain**, tu n'es pas arrivé au laboratoire depuis très longtemps mais ça m'a fait un bien fou de discuter avec quelqu'un qui avait une expertise dans le microbiote, je me sens maintenant un peu moins seule sur ce sujet ! **Yann**, je te remercie pour m'avoir donné goût à la microbiologie lors de ma première année à la fac, sans toi je ne serais peut-être pas là. **Marion**, j'ai apprécié toutes nos discussions au détour d'un couloir. **Christine**, merci pour nos interactions autour d'un café ou durant les repas. **Christophe**, merci pour tes petites blagues et nos discussions dans le P2. **Estelle**, merci pour ces conversations concernant le microbiote cutané et les parabènes.*

***Laurence**, **Sylvie**, je vous remercie énormément pour votre aide administrative mais également pour tous ces petits moments de discussion qui permettent de sortir du laboratoire pour quelques minutes. Grâce à vous, je connais un peu plus les rouages administratifs.*

***Camille**, nos longues conversations scientifiques à propos de spectrométrie de masse ou plus personnelles me manque. Merci de m'avoir expliqué plusieurs fois la spectrométrie de masse, c'est grâce à toi et MH que j'ai appris et compris plusieurs petites combines. **Vincent R**, tes petites chansons sous le PSM me manquent si tu savais. Dès que j'entends « je joue de la musique … » je pense à toi ! On en a passé des heures à discuter sous les PSM à faire nos dilutions. Merci pour ta bonne humeur. Merci à toi et à Julie pour toutes ces soirées.*

*Merci à tous ceux qui sont passé par le laboratoire : **Marion R**, **Marine V**, **Laettitia**, **Marie Laure**, **Sceinde**, **Manon B**, **Petit bouchon**, **Virginie**, **Morgane**, **Mégane**.*

*Merci à tous mes stagiaires : **Pauline H**, **Marine C**, **Tatiana A**, **Morgane B**, **Lucas V**. Grâce à vous j'ai pu apprendre à apprendre aux autres et ce n'est pas une tâche facile ! Vous m'avez permis de me remettre en question, vous avez été d'une grande aide technique et surtout vous m'avez permis de comprendre que j'aime partager les quelques connaissances que je possède.*

Je laisse aux prochains membres du laboratoire la joie de s'épanouir comme je me suis épanouie durant ces 6 dernières années. Merci à tous ! Ce satané Coronavirus vole mes derniers instants au laboratoire mais je compte bien fêter ça avec vous quand la situation le permettra.

*Je voudrais également remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer de prêt ou de loin : **Michael** et **Clarisse** pour m'avoir enseigné la pratique de l'anaérobiose et pour notre collaboration avec le peptide, **Daniel** (Dada pour les intimes) merci pour toutes ces analyses de séquences et pour toutes nos conversations, **Joanne** pour ton aide sur les essais avec l'apotome, **Alexia** et **Charles** pour les essais avec S. aureus, **Mohammed** pour nos discussions sur les parabènes, **Guillaume** et **Guillaume** pour leur aide à la Vie la Santé et tous ceux que j'aurais pu oublier dans ces remerciements.*

***Alexia**, je suis tellement contente que l'on se soit rencontré. Grâce à toi, j'ai pu extérioriser quand ça n'allait pas au labo. On a vécu les mêmes galères en même temps. Nos coups de blues et aussi les bonnes nouvelles. Sans oublier nos sorties shopping qui m'ont fait un bien fou. Au moment de l'écriture de ces remerciements tu viens juste de devenir le Dr Damour alors encore toutes mes félicitations.*

***Céline**, un petit mot pour te remercier de rendre les TP si agréables. Ce fut toujours un plaisir de travailler en ta compagnie.*

*Je voudrais également remercier tous mes **amis** qui sont resté durant ces 3 années de thèse. C'est une période pas facile que beaucoup ne comprennent pas alors merci à ceux qui sont restés. **Claire**, promis dès que c'est possible je viens te rendre visite !*

*Je tiens également à remercier ma belle-famille **Serge**, **Anick**, **Nicolas**, **Caroline** et maintenant **Baptiste** et **Charlie** pour m'avoir soutenue lors de ces trois années.*

***Alexandre**, merci d'être le plus merveilleux des frères. Bon c'est facile pour toi tu es le seul mais quand même !*

***Papa**, **Maman**, je vous dédie cette thèse. Vous avez toujours fait en sorte que je puisse faire ce que je voulais dans la vie. Vous m'avez laissez faire mes propres choix, me tromper, me relever sans jamais rien me dire. Sans vous je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui... Merci d'être là pour moi, je vous aime.*

***Antoine**, mon amour, ma moitié, que dire… Je pense que sans ta rencontre je ne serais pas là. Tu m'as fait prendre confiance en moi et tu m'as toujours poussé, accompagné, soutenu dans tous mes projets. Maintenant je pense que tu connais par cœur mon pitch de MT180, et également toutes mes figures ainsi que tout mon manuscrit ^^. Merci d'avoir été présent dans tous mes coups de blues, toi seul les connaissait et je pense que ça n'a pas été évident pour toi de les gérer. Malgré la distance notre couple tient et nous allons en ressortir plus forts. Nous avons survécu à la distance, à deux confinements, à une fin de thèse confinée et bientôt à la fin de la tienne (non je ne te mets pas la pression ^^). Je ne sais pas où le vent nous portera mais je suis fière et heureuse de faire ce chemin avec toi. C'est maintenant à mon tour de t'épauler dans cette dernière année de thèse. Bon, comme tu le vois ces remerciements ne font pas une page comme tu me l'avais expressément demandé mais je pense que tu sais déjà tout ce que j'ai à te dire. Merci pour tout, je t'aime !*

Abréviations

°C : Degré Celsius

µL : Microlitre

µM : Micromolaire

µm : Micromètre

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGCC : Acides Gras à Courtes Chaines

AMP : Peptides Antimicrobiens (Anti Microbial Peptides)

ARN : Acide RiboNucléique

ATCC : American Type Culture Collection

AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux

Bp : Paire de Base

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO_2 : Dioxyde de Carbone

CUR : Gaz Curtain

DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate

DO_{600nm} : Densité Optique à 600 nm

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ESI : Ionisation par ElectroSpray

FODMAP : Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols

GS : Gaz Source

H_2 : Hydrogène

HGMM : Human Gut Microbiota Model

HMP : Human Microbiome Project

Ig : Immunoglobuline

INRA : Institut National de la recherche Agronomique

LB : Lysogeny Broth

LPS : Lipopolysaccharides

m/z : Rapport masse sur charge

MAMP : Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes

MeIQx : 2-amino-3,8 diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline

MetaHit : METAgenomics of the Human Intestinal Tract

mGam : Modified Gifu anaerobic medium

Min : Minute

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MRM : Reaction monitoring mode

MRM : Réactions multiples

N_2 : Azote

ng : Nanogramme

NGS : Séquençage de Nouvelle Génération

NO_2 : Dioxyde d'azote

NOD : Nucleotide Oligomerization Domain

O_2 : Oxygène

O_3 : Ozone

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle

PAMP : Pathogens Associated Molecular Patterns

PCA : Analyse en Composantes Principales

PCR : Réaction en Chaine par Polymérase

pH : Potentiel hydrogène

ppm : Partie par million

PRR : Pathogen Recognition Receptors

PSI : Pounds per Square Inch

PY : Yeast-Peptone

rpm : Rotation Par Minute

s : Seconde

SHIME : Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem

SSC : Surface Sous la Courbe

TEM : Température

TIM : TNO gastro-Intestinal Model

TLR : Toll-Like Receptors

TMA : Triméthylamine

TMAO : Oxide Triméthylamine

TSA : Troubles du Spectre Autistique

TSB : Bouillon Tryptone Soja

UFC : Unité Formant Colonie

UHPLC-MS/MS : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance couplé à la Spectrométrie de Masse

UV : UltraViolet

V : Volt

Vcap : Tension capillaire

Table des matières

I. Introduction ____ *1*

A. Microbiote ____ **1**

1. Généralités ____ 1
   a) Définitions ____ 1
   b) Chez les humains ____ 1
   c) La chronologie de sa découverte ____ 2
2. Le microbiote intestinal ____ 3
   a) Le tube digestif et son microbiote ____ 4
      (1) Les organes digestifs et l'épithélium intestinal ____ 4
      (2) La notion de core microbiote intestinal ____ 5
      (3) Evolution au cours de la vie ____ 6
      (4) Dysbiose et résilience ____ 7
   b) Rôle ____ 9
      (1) Défenses et système immunitaire ____ 9
      (2) Fonctions métaboliques ____ 10
         (a) Le métabolisme des glucides ____ 10
         (b) Le métabolisme des gaz ____ 10
         (c) Métabolisme des protéines ____ 11
         (d) Métabolisme des lipides ____ 11
   c) Pathologies associées ____ 11
      (1) Maladie de Crohn, Syndrome du côlon irritable ____ 12
      (2) Diabète, Obésité ____ 12
      (3) Pathologies neuro- dégénératives : Parkinson, Alzheimer, troubles du spectre autistique ____ 13
      (4) Maladies auto immunes : La sclérose en plaque, diabète de type 1 ____ 14
      (5) Cancers ____ 15
      (6) Maladies cardiaques ____ 16
3. Le microbiote cutané ____ 16
   a) La peau ____ 16
   b) Composition ____ 17
      (1) Core microbiote cutané ____ 17
         (a) Flore résidente ____ 18
         (b) Flore transitoire ____ 19
      (2) Son évolution au cours de la vie ____ 20
      (3) Dysbiose et pathologies associées ____ 21
         (a) La dysbiose ____ 21
         (b) L'acné ____ 22
         (c) Dermatite atopique ____ 23
         (d) Le psoriasis ____ 23
         (e) L'hydrosadénite suppurée ____ 24
   c) Rôle ____ 24
      (1) Aide à la barrière cutanée ____ 25
      (2) Régulateur du système immunitaire ____ 26

B. Les techniques de culture et d'étude des différents microbiotes ____ **27**

1. L'approche par métagénomique ____ 27
   a) Les différentes techniques de séquençage nouvelle génération ____ 27
      (1) Le pyroséquençage ROCHE 454 ____ 27

(2) La technique Illumina® 28
(3) Le séquençage par ligation SOLiD 29
(4) Le séquençage Ion Torrent 30
(5) Le séquençage par nanopores 30
b) L'application à l'étude des microbiotes intestinal et cutané 31
2. L'approche par culture 32
a) Microbiote intestinal et modèles in vitro 32
(1) La culture sur gélose 32
(2) Les fermenteurs uniques 33
(3) Les modèles de fermenteurs continus 33
(4) Les systèmes de digestion artificielle 34
(a) Le modèle SHIME® 34
(b) Le TNO intestinal model 35
(5) Les modèle de l'épithélium intestinal 36
(a) Le modèle HMI™ 37
(b) Le modèle Gut on a chip 37
b) Microbiote cutané et modèles in vitro 38
(1) Les modèles de peaux *in vitro* en 2D 38
(a) Les modèles en monocouche avec un seul type cellulaire 38
(b) Les modèles en monocouche et en co-culture 39
(2) Les modèles de peau en 3D *in vitro* 40
3. Les modèles animaux 41
a) Microbiote intestinal 41
(1) Les modèles animaux simples 41
(a) Les invertébrés 42
(b) Le vertébré : le poisson zèbre 43
(2) Les modèles animaux complexes 43
b) Microbiote cutané 45

C. Microbiotes et xénobiotiques 46
1. Effets des xénobiotiques sur le microbiote 47
a) Les molécules pharmaceutiques 47
b) Les molécules alimentaires 49
c) Les molécules environnementales 49
d) Les cosmétiques 50
2. Effet des microbiotes sur les xénobiotiques 51

D. Les buts de la thèse 58

II. Matériels et méthodes 59

A. Souches, milieux, conditions de culture et réactifs utilisés 59
1. Souches, milieux et conditions de culture 59
a) Souches 59
b) Milieux et conditions de culture 60
(1) Microbiote intestinal 60
(2) Microbiote cutané 61
2. Réactifs utilisés 61

B. Sensibilité des souches aux xénobiotiques 64
1. Microbiote intestinal 64
2. Microbiote cutané 65

C. Analyse des surnageants de culture par UHPLC-MS/MS 66
1. Microbiote intestinal 66

2. Microbiote cutané ____ 67

D. Réalisation d'un microbiote intestinal reconstitué ____ 69

1. Mise en culture des 39 souches ____ 69
2. Sensibilité *in vitro* du consortium représentant le microbiote reconstitué vis-à-vis des molécules ____ 70
3. Séquençage par la technique Illumina MiSEQ ____ 71
   a) Extraction de l'ADN génomique et séquençage à haut débit ____ 71
   b) Traitement des données de séquençage du MiSEQ d'Illumina, analyses statistiques et relation phylogénétique ____ 72

III. Résultats ____ 73

A. *In vitro* sensitivity of 30 anaerobic bacterial strains of the human intestinal core microbiota to antibiotics: culture and LC-MS/MS approaches ____ 73

B. Combination of molecular and culture-dependent approaches for studying the interactions with xenobiotics and an *in vitro* model of human intestinal microbiota ____ 82

C. Effect of parabens on commensal and pathogenic staphylococci of the aerobic skin microbiota and reciprocal effect: culture and HPLC-MS/MS approaches ____ 131

IV. Discussion générale et perspectives ____ 146

V. Conclusion générale ____ 159

VI. Bibliographie ____ 161

VII. Annexes ____ 187

A. Figures et Tableaux ____ 187

1. Matériels et méthodes ____ 187
2. *In vitro* sensitivity of 30 anaerobic bacterial strains of the human intestinal core microbiota to antibiotics: culture and LC-MS/MS approaches ____ 190
3. Combination of molecular and culture-dependent approaches for studying the molecular stress of *in vitro* human gut microbiota model ____ 195

B. Autres publications ____ 201

1. Mycobiote et parabènes ____ 201
2. *In* vitro and intracellular activities of frog skin temporins against *Legionella pneumophila* and its eukaryotic host ____ 219

C. Affiches ____ 234

1. Société Française de microbiologie, octobre 2019 ____ 234
2. Federation of European Microbiological Societies, octobre 2020 ____ 235

Table des illustrations

Figure 1 : Historique du microbiote intestinal 3
Figure 2 : Système digestif, épithélium intestinal et microbiote intestinal, (d'après M. T. Abreu 2010) 5
Figure 3 : Facteurs pouvant créer une dysbiose du microbiote intestinal 8
Figure 4 : Structure de la peau et emplacement du microbiote cutané (Grice et Segre 2011b) 17
Figure 5 : Représentation des microorganismes du microbiote cutané selon les zones corporelles (Grice et Segre 2011b) 19
Figure 6 : Facteurs pouvant entrainer une dysbiose du microbiote cutané (Schommer et Gallo 2013a) 22
Figure 7 : Principales activités du microbiote cutané (Sanford et Gallo 2013b) 25
Figure 8 : Schéma représentatif du pyroséquençage Roche 454 (Dortet, Bonnin, et Naas 2017) 28
Figure 9 : Représentation schématique du séquençage Illumina® (Dortet, Bonnin, et Naas 2017) 29
Figure 10 : Représentation schématique du séquençage SOLiD (Dortet, Bonnin, et Naas 2017) 30
Figure 11 : Modèle SHIME® (Williams et al. 2015) 35
Figure 12 : Schéma représentant le modèle TNO (Rehman et al. 2012) 36
Figure 13 : Effet des antibiotiques sur le microbiote intestinal (Modi, Collins, et Relman 2014) 48
Figure 14 : Métabolisme de la digoxine par la bactérie *E. lenta* 51
Figure 15 : Schéma expérimental pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes du core microbiote intestinal vis-à-vis différents xénobiotiques testés 64
Figure 16 : Schéma expérimental pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes du core microbiote cutané vis-à-vis différents xénobiotiques testés 65
Figure 17 : Schéma expérimental pour le dosage des xénobiotiques dans les surnageants de culture bactériens des souches du microbiote intestinal 66
Figure 18 : Schéma expérimental du dosage des parabènes dans les surnageants de cultures bactériens des souches du microbiote cutané 68
Figure 19 : Schéma expérimental de la construction du mélange de 39 souches représentant de core microbiote intestinal 70
Figure 20 : Schéma expérimental pour déterminer l'effet de xénobiotiques sur un mélange des 39 souches du core microbiote intestinal 71

Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau regroupant les microorganismes présents au niveau de la flore résidente et transitoire du microbiote cutané (Mokni et Abdelhak 2014) 20
Tableau 2 : Tableau regroupant les xénobiotiques métabolisés par le microbiote intestinal (d'après Sousa et al. 2008 ; Klaassen et Cui 2015 ; Lu, Mahbub, et Fox 2015 ; Enright et al. 2016 ; Jourova, Anzenbacher, et Anzenbacherova 2016 ; Koppel, Maini Rekdal, et Balskus 2017 ; Currò 2018 ; Clarke et al. 2019 ; Sun, Chen, et Shen 2019) 54
Tableau 3: Souches utilisées lors de cette étude 59
Tableau 4 : Tableau des xénobiotiques utilisés durant cette étude 62
Tableau 5 : Gradients chromatographiques utilisés pour chaque composé quantifié en Q-TRAP 187
Tableau 6 : Gradient chromatographique utilisé pour les composés quantifiés en Q-TRAP avec une méthode spécifique 188
Tableau 7 : Méthode de surveillance des réactions multiples pour chaque composé en Q-TRAP 189

INTRODUCTION

I. Introduction

A. Microbiote

1. Généralités

a) Définitions

Le terme microbiote n'est apparu dans le langage scientifique courant que très récemment, on parlait précédemment plus volontiers de « flore ». Etymologiquement parlant, le mot est composé du terme « micro », qui en grec ancien signifie « petit » et du terme « bios » qui signifie « vie ».

Un microbiote se définit comme un ensemble de microorganismes vivant dans un environnement spécifique en interaction avec son écosystème. Il est généralement composé de bactéries, virus, champignons et archées **(Blaser 2014a)**. Cette symbiose est retrouvée chez les humains mais également chez les animaux ou bien les plantes.

En français, le microbiome se définit comme l'environnement biotique dans lequel évolue le microbiote. Cependant, en anglais, ce terme est employé pour désigner l'ensemble des génomes associé au microbiote. Cela sera le cas dans ce manuscrit de thèse.

b) Chez les humains

On retrouve chez l'humain plusieurs microbiotes, parmi lesquels on peut citer le microbiote intestinal, le microbiote cutané, le microbiote pulmonaire, le microbiote buccal ou encore le microbiote urinaire et le microbiote vaginal chez la femme.

Le microbiote intestinal est impliqué dans plusieurs fonctions, en particulier métabolique et immunitaire. Il va par exemple permettre de synthétiser certaines vitamines essentielles que le corps ne peut pas produire **(Barko et al. 2018)**. Le microbiote cutané, quant à lui, représentera la première barrière vis-à-vis du milieu extérieur protégeant par exemple des UV et de la pollution **(Grice and Segre 2011)**. Le microbiote de l'arbre respiratoire n'est reconnu que depuis quelques années. Son rôle précis n'est pas encore élucidé mais il semblerait que sa composition soit différente entre un patient présentant une pathologie respiratoire et un individu sain **(Dickson et al. 2016)**. Le microbiote buccal est quant à lui plus largement étudié. Son rôle principal va être la défense contre les micro-organismes pathogènes. Certaines études mentionnent qu'une altération de ce microbiote indiquerait la présence

de pathologies allant des carries au diabète voire même au cancer **(Belstrøm 2020)**. Le microbiote urinaire n'a été que très récemment mis en évidence. Les scientifiques ont comparé les microbiotes retrouvés dans les urines d'individus sains et dans les urines de patients atteints de différentes affections urinaires, telles que des cystites, et ont montré une différence au niveau de la diversité bactérienne **(Whiteside et al. 2015)**. Le microbiote vaginal va lui aussi jouer un rôle protecteur contre les micro-organismes pathogènes et limiter ainsi les maladies sexuellement transmissibles **(Ma, Forney, et Ravel 2012**).

c) La chronologie de sa découverte

La découverte du microbiote tel qu'on le connaît actuellement est récente **(FIGURE 1)**. Cependant, les premières observations bactériennes remontent au 17ème siècle. En 1683, Antoine Van Leeuwenhoek constate la présence des premières bactéries dans de l'eau, chez des animaux ou même dans des matières fécales. Il les nommera « animalicules ». Il faudra attendre le 19ème siècle pour revivre une avancée majeure en microbiologie avec la découverte de la bactérie *Escherichia coli* par Theodor Escherich en 1886 dans des selles d'enfants **(Escherich 1886)**. En 1887, la boite de Petri est inventée par Julius Richard Petri et permet la culture des bactéries qui étaient jusqu'alors simplement observées. C'est durant ces années (1850-1900) que la microbiologie est née. Au début du 20ème siècle, Elie Metchnikoff émet l'hypothèse du bénéfice des bactéries responsables de la fermentation du lait sur la santé humaine. Il introduit ainsi la notion de probiotique **(Anukam et Reid 2007)**. En parallèle de ces recherches, il sera co-lauréat du prix Nobel de Médecine en 1908 pour avoir découvert la phagocytose. Au milieu du 20ème siècle, les découvertes en rapport avec le microbiote s'enchaînent. Les premières cultures de bactéries anaérobies sont réalisées dans les années 1940. Les premiers travaux sur le microbiote intestinal voient le jour dans les années 1970-1980 avec l'apparition des chambres de Freter (culture en anaérobiose simplifiée) et des premiers travaux sur les animaux axéniques (dépourvus de microorganismes). La première transplantation fécale a lieu en 1958 pour lutter contre une infection récidivante à *Clostridium difficile* **(Eiseman et al., 1958)**. Il faudra attendre les années 2000 pour voir apparaître le terme « microbiote ». En effet, jusque-là, le terme utilisé était celui de flore intestinale. Le début du 21ème siècle voit naître différents projets visant à étudier plus globalement les microbiotes humains. Le *Human Microbiome Projec*t (HMP) lancé en 2008 est un projet de l'Institut National de la Santé américain qui a pour but d'étudier l'ensemble des microorganismes vivant en association avec les humains afin de tenter de les associer à différentes pathologies. En 2008 également, un projet européen voit le jour afin d'étudier le lien entre les microorganismes du microbiote intestinal, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et

l'obésité. En 2012, le site de l'Institut National de la recherche Agronomique (INRA) à Jouy-en-Josas a développé « MétaGénoPolis », un centre de métagénomique permettant l'étude du microbiote intestinal humain.

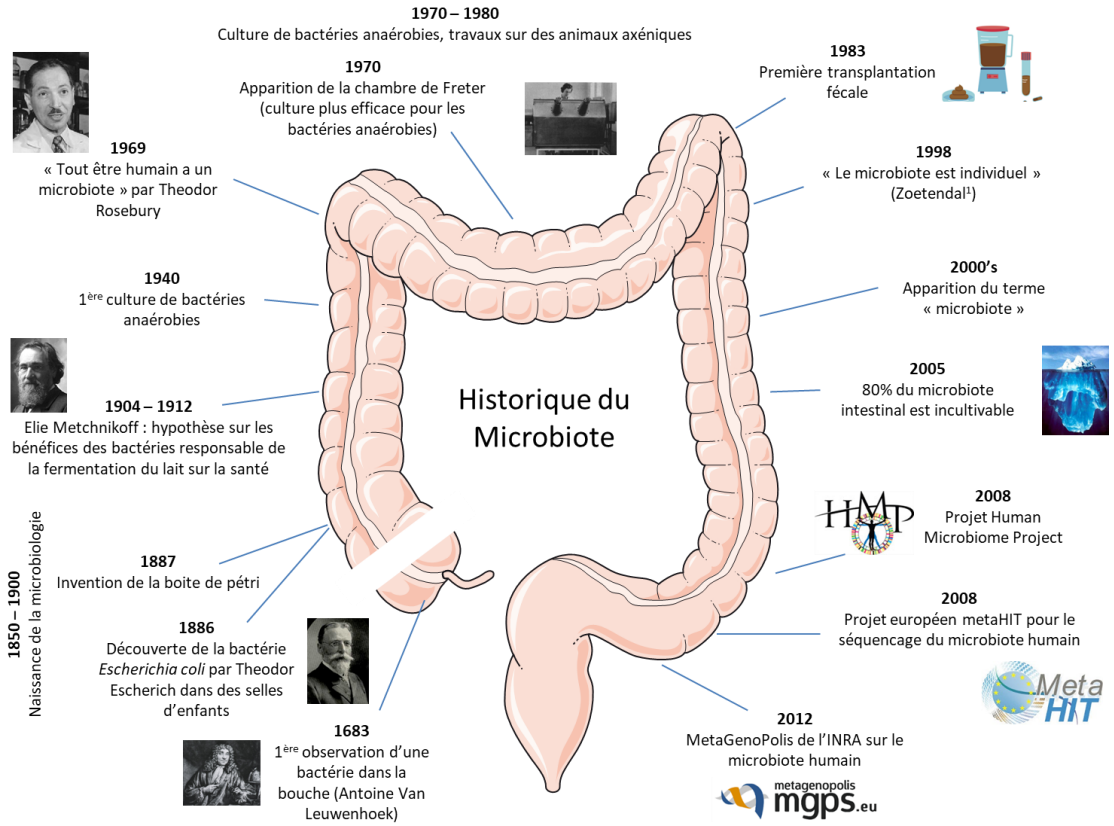


Figure 1 : Historique du microbiote intestinal

2. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal représente l'ensemble des micro-organismes comprenant les bactéries, virus, champignons et archées contenus dans le tractus digestif. Ces micro-organismes résident principalement dans l'intestin grêle et le colon et sont impliqués dans des fonctions métaboliques telles que la synthèse de certaines vitamines, et dans des fonctions immunitaires, en permettant la défense contre les pathogènes. Une altération de la composition de ce microbiote peut ainsi être impliquée dans certaines pathologies telles que des maladies psychiatriques ou métaboliques **(Järbrink-Sehgal et Andreasson 2020 ; Fan et Pedersen 2020)**.

Dans cette partie du manuscrit, nous nous focaliserons sur l'étude des bactéries qui composent le microbiote intestinal.

a) Le tube digestif et son microbiote

(1) Les organes digestifs et l'épithélium intestinal

Le tractus digestif est composé de la bouche, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (composé lui-même du duodénum, du jéjunum et de l'iléon), du gros intestin encore appelé côlon, du rectum et de l'anus **(FIGURE 2)**. La digestion commence dès lors que les aliments entrent dans la bouche, grâce à l'action de la salive et à la mastication. Par la suite, les aliments pré-broyés descendent dans l'œsophage pour atteindre l'estomac où une deuxième digestion plus efficace va avoir lieu. L'action des sucs gastriques et des enzymes digestives sur les aliments va aboutir à la formation d'une sorte de « broyat » nommé chyme, qui va alors se déverser dans le duodénum. C'est dans l'intestin grêle, mesurant entre 5 et 7 mètres, que les nutriments extraits vont être absorbés. Les nutriments non absorbés vont continuer leur chemin et arriver ainsi dans le côlon. Le rôle de ce dernier, mesurant entre 1 et 2 mètres, est de compacter les matières non digestibles pour former les selles et également de récupérer l'eau présente dans celles-ci. Les selles seront alors évacuées via le rectum une fois qu'elles auront parcouru tout le tractus colique.

Le microbiote intestinal se retrouve principalement dans la partie finale de l'intestin grêle et tout le long du colon. En effet, le pH de l'estomac se trouvant être très acide (pH 2) ne permet pas la survie de la majorité des bactéries. Plus on descend dans le tractus digestif, plus le pH va tendre vers la neutralité jusqu'à atteindre une valeur de 7 dans le côlon où seront retrouvées la plupart des bactéries. Cependant, plus le pH va augmenter plus le taux d'oxygène va diminuer. Ainsi les bactéries présentes seront plus nombreuses et anaérobies.

Les bactéries vont être principalement retrouvées sur la muqueuse intestinale. Les rôles principaux de cette muqueuse, composée de cellules épithéliales, sont d'absorber les différents nutriments produits au préalable et d'empêcher les agressions (acidité, micro-organismes pathogènes). Elle constitue donc une barrière chimique et physique aidée par les microorganismes et notamment par les bactéries la recouvrant **(M. T. Abreu 2010)**. Cette muqueuse est composée de cryptes et de villosités permettant d'augmenter d'une part sa longueur et d'autre part sa surface, sans toutefois augmenter son volume, permettant un contact prolongé avec les nutriments qui seront alors mieux absorbés.

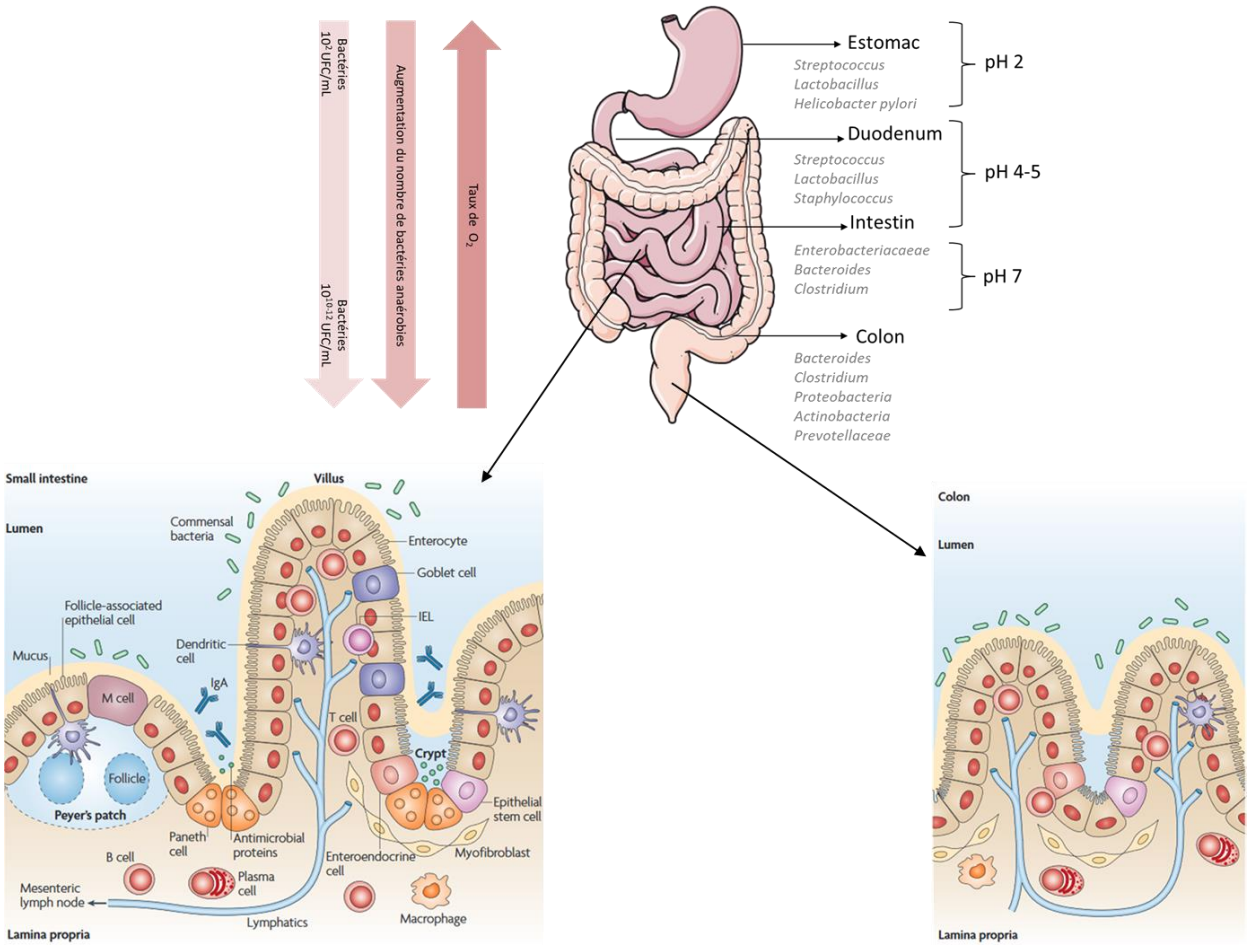


Figure 2 : Système digestif, épithélium intestinal et microbiote intestinal, (d'après M. T. Abreu 2010)

(2) La notion de core microbiote intestinal

Le core microbiote se définit comme l'ensemble d'une communauté de microorganismes présente chez une cohorte de patients sains.

Avec l'avènement des nouvelles techniques de séquençages (développées plus loin dans ce manuscrit), les connaissances sur le microbiote intestinal ne font qu'augmenter. Nous savons maintenant que toute la population humaine possède un ensemble de bactéries communes, appelé core microbiote intestinal. Cependant ce terme n'est apparu que depuis une dizaine d'années, car les chercheurs s'intéressaient peu aux individus sains mais plutôt aux porteurs de pathologies. Depuis que les travaux ont concerné également les personnes sans affections particulières, il a pu être démontré

que toute la population avait un socle commun intestinal d'environ 50 espèces **(Turnbaugh et al. 2009; Tap et al. 2009 ; Huse et al. 2012).**

En 2010, Qin et son équipe ont séquencé 124 échantillons de fèces d'humains européens et ont montré que parmi les 1000 espèces bactériennes détectées, 18 sont retrouvées chez tous les individus et 57 chez plus de 90% des individus. Ces espèces font partie des genres *Bacteroides*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacteria*, du phylum Proteobacteria et des groupes de Streptocoques et Lactobacilles **(Qin et al. 2010)**. En 2013, Schloissnig et son équipe ont analysé 252 métagénomes fécaux de 207 individus provenant du continent Nord-Africain et d'Europe **(Schloissnig et al. 2013a)**. Ils ont montré un socle commun de 66 espèces retrouvées chez tous les individus. Ces espèces sont également décrites dans la publication de Qin et son équipe **(Qin et al. 2010)** et dans celle de Maier et son équipe, qui ont analysé l'impact de plus de 1 000 médicaments sur 40 souches bactériennes du core microbiote intestinal **(Maier et al. 2018)**.

(3) Evolution au cours de la vie

Le microbiote intestinal évolue tout au long de la vie, de la naissance à la mort. Le premier contact avec des bactéries qui vont peupler le microbiote des nouveaux nés a lieu lors de l'accouchement. Les premières bactéries qui vont coloniser les intestins sont des bactéries aérobies, telles qu'*E. coli*. Cependant, selon le mode de naissance, ces premières bactéries seront différentes. Shao et son équipe ont montré que les bactéries du genre *Bacteroides* étaient beaucoup plus abondantes chez les enfants mis au monde par voie basse alors qu'elles étaient en très faible nombre ou même absentes dans 99% des cas quand les enfants naissaient par césarienne **(Shao et al. 2019)**. Ils en ont déduit que le microbiote des enfants nés par voie basse provenait de la mère alors que celui des enfants nés par césarienne plutôt de l'environnement. Cependant, cette différence ne perdure pas avec le temps. Une étude a montré qu'à l'âge de 6 semaines, le microbiote des enfants était identique en termes de composition et de fonctionnalité qu'ils soient nés par voie basse ou par césarienne **(Chu et al. 2017)**. A l'âge adulte, la diversité du microbiote intestinal sera plus ou moins stable en fonction des prises de médicaments, des régimes alimentaires, du stress et d'autres facteurs qui seront détaillés plus tard dans cette introduction. Avec le vieillissement, la diversité microbienne va avoir tendance à chuter **(Mueller et al. 2006)** et d'autres genres bactériens vont alors être retrouvés. Les *Bifidobacterium* vont diminuer pour laisser place à une augmentation des Streptocoques, des Staphylocoques ou bien des Entérocoques **(Mueller et al. 2006 ; Mariat et al. 2009)**.

(4) Dysbiose et résilience

Le terme dysbiose se définit comme le déséquilibre d'un écosystème. Une dysbiose du microbiote intestinal se caractérise par une diminution ou une augmentation d'un ou de plusieurs genres bactériens. Les facteurs provoquant une dysbiose peuvent être aussi nombreux que variés et induire plusieurs types de pathologies. Les principaux facteurs de risque pouvant être responsables d'une dysbiose chez une personne adulte en bonne santé vont être : le stress, le style de vie, l'alimentation, le tabagisme, les maladies infectieuses et la prise de médicaments tels que les antibiotiques **(G. Clarke et al. 2019)** (FIGURE 3).

Bien que tous ces facteurs perturbent l'équilibre de cet écosystème, le microbiote intestinal est capable de revenir à son état normal. C'est ce que l'on nomme le phénomène de résilience. Cela signifie qu'après un déséquilibre, par exemple dû à l'effet d'antibiotiques, le microbiote est capable de se reconstruire. En effet, après la prise d'amoxicilline durant 5 jours, le microbiote de 6 volontaires est redevenu à 89% identique à celui des volontaires contrôles qui n'avaient pas pris d'antibiotique **(De La Cochetière et al. 2005)**. Malgré ce phénomène, il arrive parfois que la dysbiose s'installe plus durablement. Par exemple, une diminution des espèces bactériennes dites anti-inflammatoires telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* ou *Faecalibacterium. prausnitzii* peut provoquer une augmentation de certaines espèces opportunistes pouvant être pathogènes, conduisant à une inflammation des muqueuses, puis à une augmentation de la perméabilité intestinale ou « leaky gut » **(Drago, Valentina, et Fabio 2019)**. Par ailleurs, si la dysbiose s'installe, certaines infections peuvent s'instaurer dont notamment celles dues à la bactérie *C. difficile*.

Le mode de vie des pays occidentaux comprenant le stress, la sédentarité, la « malbouffe » et la prise de médicaments peut favoriser cette dysbiose. Cependant, dans les pays en développement, la population peut également souffrir de déséquilibre du microbiote mais dont les causes seront différentes. En effet, les populations concernées seront plus touchées par des maladies infectieuses provoquant des diarrhées potentiellement mortelles **(Pop et al. 2014)**, une malnutrition avec carences alimentaires ou bien un accès difficile à l'eau potable. En 2015, Martinez et son équipe ont étudié le microbiote intestinal d'une population américaine occidentale et l'ont comparé à celui d'une population de Papouasie-Nouvelle-Guinée. Ils ont montré une diversité plus abondante chez les sujets de Papouasie-Nouvelle-Guinée avec une augmentation des *Prevotella*, des *Propionibacterium*, des *Streptococcus*, des *Enterobacteriaceae*, des *Helicobacteriaceae* et une diminution des *Feacalibactcerium* et des *Blautia*. En revanche, chez les sujets américains, ils ont observé une majoration des *Alistipes*, des Bacteroidetes, *Parabacteroidetes*, *Odoribacter*, *Barnesiella*, *Eggerthella*, *Gondonibacter*, *Bilophila*, *Aquabacterium* et *Acidovorax* **(Martínez et al. 2015)**. Outre le pays de

résidence, le style de vie va lui aussi induire une variation au niveau des espèces présentes dans le microbiote intestinal. En effet, des recherches ont montré que chez une femme en bonne santé et active, on retrouvait une augmentation d'espèces bactériennes favorables telles que *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia hominis* ou bien *Akkermansia muciniphila,* alors que chez une femme sédentaire, on notait une augmentation de *Paraprevotella* et de *Desulfovibrionacea* **(Pushpanathan et al. 2019)**. Le tabagisme actif est également un facteur pouvant déséquilibrer le microbiote intestinal. Il a été démontré qu'il provoquait une augmentation des phyla Proteobacteria et Bacteroidetes (notamment des genres *Bacteroides* et *Prevotella*) alors que les phyla des Actinobacteria et des Firmicutes (des genres *Bifidobacteries*, *Lactococcus* et *Clostridium*) étaient diminués **(Savin et al. 2018).** Le régime alimentaire peut lui aussi être un facteur de dysbiose intestinale. Rinninella et son équipe ont effectué une revue de la littérature sur les régimes alimentaires en listant leur impact sur la composition du microbiote intestinal. Ainsi, on apprend que le régime sans gluten diminue l'abondance des « bonnes » bactéries. Le régime cétogène, où l'apport en glucide est très réduit, diminue l'abondance totale et la diversité bactérienne du microbiote intestinal. Le régime FODMAP (Fermentable Oligo-, Di-, Mono-saccharides And Polyols), utilisant des aliments sans glucides fermentescibles, utilisé par certains patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable, diminue l'abondance totale des bactéries du microbiote intestinal. Seul le régime méditerranéen augmente la diversité microbienne et la stabilité du microbiote intestinal **(Rinninella, Cintoni, et al. 2019)**.

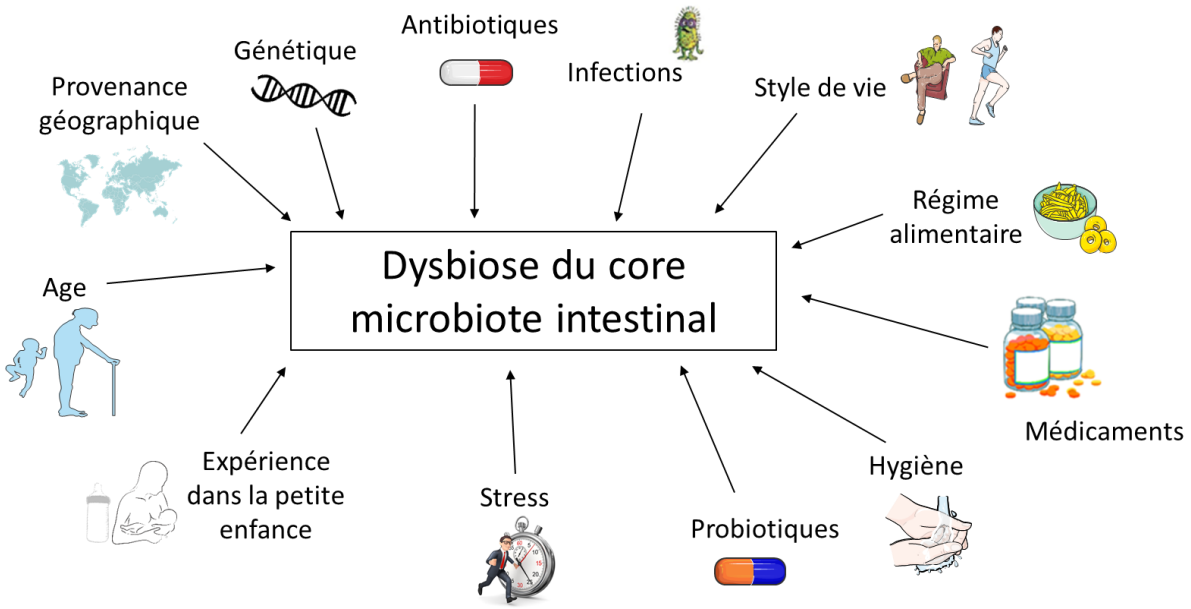


Figure 3 : Facteurs pouvant créer une dysbiose du microbiote intestinal

b) Rôle

Les bactéries du microbiote intestinal sont impliquées dans plusieurs fonctions essentielles de l'organisme.

(1) Défenses et système immunitaire

Dans un premier temps, le microbiote intestinal va participer à la maturation du système immunitaire. En effet, une étude publiée par Macpherson et son équipe, a montré que des souris axéniques présentaient une réduction du nombre de lymphocytes, une hypoplasie des plaques de Peyer, une diminution des immunoglobulines (Ig) et des cytokines par rapport aux souris possédant un microbiote intestinal. De plus, en introduisant le microbiote des souris saines dans le tractus digestif des souris axéniques, les auteurs ont observé une restauration du nombre de lymphocytes, du taux des Ig et des cytokines et de la taille normale des plaques de Peyer au bout de quelques semaines **(Macpherson et Harris 2004)**. Ainsi, le microbiote intestinal va stimuler le système immunitaire intestinal en participant au développement des réponses cellulaires et humorales vis-à-vis des pathogènes (virus, bactéries ou parasites entéropathogènes). Les cellules présentatrices d'antigènes vont activer les lymphocytes T qui vont alors se différencier en lymphocytes Th1 pour une réponse cellulaire, dite innée, ou bien en lymphocytes Th2 pour une réponse humorale. La réponse humorale, dite adaptative, va alors produire des anticorps sécrétoires telles que les IgA.

En plus de leur implication dans la maturation du système immunitaire, les bactéries composant le microbiote intestinal vont jouer un rôle de barrière. Effectivement, grâce à la présence de ces micro-organismes, une bactérie exogène et/ou pathogène ne va pas pouvoir s'implanter ni se multiplier, c'est la concurrence de niche. Les bactéries du microbiote intestinal vont entrer en compétition pour éviter l'implantation de la bactérie pathogène mais aussi au niveau nutritionnel **(Reid, Howard, et Gan 2001).** Elles vont également combattre cette bactérie en produisant des substances toxiques telles que des bactériocines. En parallèle, lorsqu'une bactérie pathogène est identifiée comme telle par les bactéries commensales, ces dernières vont produire des *Microbial Associated Molecular Patterns* (Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes ou MAMPs) qui vont être reconnus par des récepteurs spécifiques se trouvant sur l'épithélium intestinal, les PRRs, pour *Pathogen Recognition Receptors*. En retour, la muqueuse va alors produire de la mucine, des IgA et des peptides antimicrobiens, le but final étant de limiter le contact des pathogènes avec l'épithélium et empêcher leur implantation **(Khosravi et Mazmanian 2013)**.

(2) Fonctions métaboliques

Nous avons vu que la digestion effectuée au niveau de l'intestin grêle n'étant pas complète, une partie des aliments arrive donc dans le côlon sans être intégralement modifiée. Le microbiote intestinal va alors se charger de réduire les derniers aliments et ainsi former des gaz, des métabolites et des acides gras à courtes chaines (AGCC) essentiels à notre organisme (source d'énergie pour les colonocytes) mais également aux bactéries le peuplant **(Kaoutari et al. 2014)**.

(a) Le métabolisme des glucides

Les fibres alimentaires constituent les principaux glucides retrouvés dans le côlon. La dégradation de ces polyosides en métabolites fermentaires tels que les AGCC est réalisée par les bactéries hydrolytiques incluant les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. La fermentation des glucides en pyruvate passe essentiellement par la glycolyse. Le pyruvate est alors transformé en acétate, en propionate ou bien en butyrate, ensuite absorbés au niveau de la muqueuse intestinale et transportés jusqu'aux organes (foie, muscle, cœur) qui vont les métaboliser à leur tour. L'acétate est métabolisé principalement par les genres majeurs du microbiote intestinal à savoir *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* ou bien *Eubacterium*. Le propionate sera lui principalement produit grâce aux *Bacteroides*, *Propionibacterium* et *Veillonella,* alors que le butyrate le sera grâce aux *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* ou bien *Butyrivibrio* **(Gérard et Bernalier-Donadille 2007)**.

(b) Le métabolisme des gaz

De nombreux phénomènes de fermentation ont lieu dans le côlon enfermant alors une grande quantité d'hydrogène. Ce gaz étant toxique pour les bactéries résidentes du microbiote intestinal, l'organisme est pourvu de trois voies pour l'éliminer. Les voies pulmonaires et rectales ne sont pas les plus utilisées. En effet, la plus grande quantité d'hydrogène est métabolisée par les bactéries du microbiote. Cependant, son élimination dépend du genre bactérien. Les archées méthanogènes vont métaboliser l'hydrogène en méthane, les bactéries sulfatoréductrices en sulfure et les bactéries acétogènes en acétate **(Gérard et Bernalier-Donadille 2007)**.

(c) Métabolisme des protéines

Les protéines d'origine exogènes (aliments non digérés dans l'intestin grêle) ou endogènes (enzymes) arrivant dans le côlon vont dans un premier temps être hydrolysées en peptides par certaines bactéries dites protéolytiques. Ces bactéries sont des *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* **(Cummings et Macfarlane 1997)**. Les peptides issus de la protéolyse seront alors réduits par certaines bactéries en acides aminés, utilisés comme source d'énergie par les bactéries ne fermentant pas le glucose ou dégradés en AGCC et en ammoniaque. L'ammoniaque formé étant toxique, il va être absorbé par la muqueuse intestinale et transporté vers le foie, converti en urée et excrété par les urines. Cependant une partie de l'ammoniaque généré est utilisée comme source d'azote par un grand nombre de bactéries pour synthétiser leurs acides aminés grâce à leur fonction aminotransférase.

(d) Métabolisme des lipides

Les lipides, sous forme de triglycérides, arrivant dans le côlon sont en faible quantité car ils ont été absorbés dans l'intestin grêle. Les bactéries du microbiote intestinal vont alors les prendre en charge et les transformer en cholestérol grâce à des processus d'oxydation, d'hydrolyse, de réduction et d'hydroxylation. Le cholestérol sera ensuite transformé en coprostanol et par la suite éliminé dans les fèces. Cependant, une partie du cholestérol passe par le foie où il va se transformer en sels biliaires, eux-mêmes métabolisés par les bactéries du microbiote (en particulier du genre *Clostridium)* en acides biliaires secondaires (acides désoxycholique et lithocholique) **(Ridlon, Kang, et Hylemon 2006)**.

c) Pathologies associées

Depuis quelques années, de plus en plus de recherches ont concerné l'implication du microbiote intestinal dans certaines pathologies. Cependant, il est à ce jour encore difficile de conclure si c'est la pathologie qui entraîne une dysbiose de ce microbiote ou bien l'inverse. Malgré cette incertitude, plusieurs pathologies ont été reliées au microbiote intestinal telles que des pathologies intestinales (syndrome de côlon irritable, maladie de Crohn), des maladies métaboliques (diabète, obésité), des maladies neurologiques (Alzheimer, Parkinson, autisme, sclérose en plaque), certains types de cancers ou même des maladies cardiaques.

(1) Maladie de Crohn, Syndrome du côlon irritable

La maladie de Crohn, pathologie auto-immune, est une inflammation chronique pouvant toucher tous les segments de l'intestin, caractérisée par des crises de diarrhées et de douleurs abdominales. Malgré son caractère multifactoriel (génétique, immunitaire, facteurs environnementaux), le microbiote intestinal semble jouer un rôle dans son apparition puisque cette pathologie est précédée d'un déséquilibre de la composition de ce microbiote **(Khanna et Raffals 2017)**. Chez les malades, le microbiote est moins riche en termes de diversité et possède un indice de dysbiose plus élevé que la normale. Des chercheurs comparant le microbiote intestinal de patients atteints de la maladie de Crohn à celui d'individus sains ont mis en évidence qu'avant une crise, l'abondance en Bacteroidetes et en Firmicutes était réduite alors que celle des *Gemellaceae*, appartenant au phylum des Firmicutes, était augmentée **(Braun et al. 2019).**

Le syndrome du côlon irritable ou de l'intestin irritable se caractérise par des douleurs abdominales et des troubles du transit avec une alternance diarrhée-constipation. Le microbiote intestinal jouerait un rôle dans cette pathologie avec une diversité du phylum des Firmicutes diminuée et à l'inverse, une augmentation de la diversité des *Enterobacteriaceae* appartenant au phylum des Proteobacteria. En effet, des études de métagénomique et de culturomique ont permis de montrer que les espèces *Ruminococcus gnavus* et *E. coli* étaient liées à l'inflammation intestinale et donc, potentiellement à ce syndrome **(Schirmer et al. 2019)**.

(2) Diabète, Obésité

L'obésité se caractérise par un excès de masse grasse et une modification du tissu adipeux. Les obèses seront plus enclins à développer des maladies cardiovasculaires, hépatiques, rénales, respiratoires, articulaires ou même dermatologiques **("Obésité" n.d. Inserm, le 01/04/2020)**. Les patients obèses ont un microbiote intestinal de faible diversité mais qui, en collaboration, avec l'intestin est capable d'extraire et de stocker de manière plus efficace les aliments qu'une personne de poids "normal". On retrouve dans le microbiote de ces patients une diminution des Bacteroidetes, et une augmentation des Firmicutes. Les chercheurs ont également retrouvé une abondance plus élevée de la bactérie *E. coli* et des *Lactobacillus* **(Klancic and Reimer 2020)**. Enfin, à terme l'obésité peut induire un diabète de type 2 **(B. Kim, Choi, et Yim 2019)**.

Le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperglycémie constante dont l'incidence augmente avec l'âge. En France, on considère que 90% des diabétiques ont un diabète de type 2 **("Le**

diabète en France en 2016 : état des lieux" n.d.Santé publique France, le 01/04/2020). Bien que des facteurs génétiques, le surpoids, la sédentarité, le tabagisme soient impliqués dans ce type de diabète, le microbiote lui aussi joue un rôle dans son apparition. En effet, ces facteurs de risques peuvent entraîner à terme une dysbiose et ainsi induire ce diabète. Un régime non adapté peut avoir un effet négatif sur le microbiote intestinal, provoquant une dysbiose, induisant un risque accru d'obésité qui, à son tour peut provoquer une inflammation, une résistance à l'insuline et des métabolites induisant le diabète de type 2 **(Sikalidis et Maykish 2020)**. Les genres bactériens connus pour être corrélés négativement avec ce type de diabète sont : *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* et *Roseburia,* les genres protecteurs étant les *Ruminococcus*, les *Fusobacterium* et les *Blautia* **(Gurung et al. 2020)**.

(3) Pathologies neuro- dégénératives : Parkinson, Alzheimer, troubles du spectre autistique

La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative détruisant les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*. Cette pathologie, dont les causes exactes restent à ce jour inconnues, est caractérisée par une lenteur des mouvements, une rigidité et des tremblements au repos. Cependant, à côté de facteurs génétiques et environnementaux, une dysbiose du microbiote intestinal pourrait être mise en cause. En effet, il semblerait que le microbiote produise des endotoxines qui pourraient ensuite pénétrer le système nerveux central et provoquer la symptomatologie **(Baizabal-Carvallo et Alonso-Juarez 2020)**. Les patients atteints possèderaient un microbiote perturbé avec notamment une augmentation de l'abondance des *Lactobacillaceae*, des *Barnesiellaceae*, des *Enterococceae*, des *Verrucomicrobiaceae* et des *Lachnospieceae* et une diminution des *Prevotellaceae* **(Elfil et al. 2020)**. En 2015, Hasegawa et son équipe ont également montré une diminution des espèces *Clostridium coccoides* et *Bacteroides fragilis* dans le microbiote des patients parkinsoniens **(Hasegawa et al. 2015)**.

La maladie d'Alzheimer, première cause de démence chez l'Homme, est une pathologie neuro-dégénérative débutant au niveau de l'hippocampe et pouvant s'étendre à tout le tissu cérébral, provoquant des troubles et/ou pertes de la mémoire et des difficultés d'orientation dans l'espace et dans le temps. Cette pathologie se caractérise par l'apparition de plaques amyloïdes et d'agrégats de protéine Tau provoquant une dégénérescence des neurones. Les causes de la maladie restent encore incomprises, cependant quelques facteurs de risques ont été mis en avant, tels que l'âge, le sexe (on retrouve plus de cas chez les femmes) ou certains facteurs génétiques. L'hypothèse du rôle du microbiote intestinal dans cette maladie a également été soulevée. En effet, les bactéries du

microbiote pourraient sécréter de la protéine amyloïde et des lipopolysaccharides qui pourraient moduler certaines voies de signalisation impliquées dans l'inflammation accompagnant la maladie **(Jiang et al. 2017).**

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles neurodéveloppementaux. Ils sont caractérisés par des problèmes de communication, d'interactions sociales et comportementales. Diagnostiqués durant l'enfance, les TSA comprennent plusieurs pathologies telles que le syndrome d'Asperger, les troubles envahissants du développement, l'autisme ou bien le syndrome de Rett. Bien que les patients atteints présentent tous des symptômes différents, les problèmes gastro-intestinaux leur sont communs, indiquant un lien avec le microbiote intestinal. En 2010, Finegold et son équipe ont mis en évidence, par une approche de pyroséquençage, que les altérations du microbiote intestinal sont corrélées aux différentes gravités des TSA. Ils ont montré chez les patients présentant des formes sévères, une augmentation des Bacteroidetes et une diminution des Firmicutes, la dysbiose étant moins marquée chez les sujets montrant une forme légère **(Finegold et al. 2010a)**. Cette dysbiose intestinale va avoir pour conséquence d'augmenter la perméabilité intestinale et de permettre la diffusion d'endotoxines pro-inflammatoires et de lipopolysaccharides (LPS). Ces molécules vont participer à la production de cytokines pro-inflammatoires modifiant l'activité cérébrale **(Mangiola et al. 2016)**.

(4) Maladies auto immunes : La sclérose en plaque, diabète de type 1

La sclérose en plaque est une maladie inflammatoire dégénérative du système nerveux central, la gaine de myéline étant détruite par les cellules immunitaires. Les symptômes de cette pathologie sont très variables avec des paresthésies, des troubles de la vision ou de la motricité ou des douleurs à type de décharges électriques. La maladie évolue par poussées, laissant au fil des années des séquelles de plus en plus lourdes pouvant aboutir à la paralysie et au décès. L'apparition de cette maladie résulterait d'une combinaison de facteurs environnementaux, mais une dysbiose du microbiote intestinal pourrait également jouer un rôle. Les patients présentant la maladie ont une abondance accrue dans le phylum Verrucomicrobia et notamment dans le genre *Akkermansia* alors que les genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Sutterella* sont, eux, diminués. Les espèces *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus salivarius* seraient en plus grand nombre dans le microbiote intestinal des patients atteints par rapport aux patients contrôles. L'espèce *F. prausnitzii* serait, elle, retrouvée en plus faible abondance **(Noto et Miyake 2020).**

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par une destruction progressive des cellules bêta des ilots de Langerhans du pancréas, cellules produisant normalement l'insuline. Cette maladie, qui se manifeste le plus souvent dans l'enfance quand toutes les cellules bêta sont détruites, est mortelle sans traitement. L'interaction entre le système immunitaire et le microbiote intestinal semble jouer un rôle dans cette pathologie. Les malades possèderaient un microbiote avec une diversité plus faible et une diminution de certains Firmicutes (*Streptococcus*, *Lactococcus*) et de *Verrucomicrobia*. En revanche, certains genres ont une abondance plus grande chez les patients, tels que des *Bifidobacterium*, des *Roseburia*, des *Alistepes*, des *Parabacteroides*, des *Streptococcus*, des *Blautia*, des *Ruminococcus* ou même des *Bacteroides* **(Dedrick et al. 2020)**. Une telle dysbiose serait à l'origine d'un déséquilibre du système immunitaire et notamment de l'interleukine 2 jouant un rôle prépondérant dans cette maladie **(Mullaney et al. 2018)**.

(5) Cancers

Le microbiote intestinal joue un rôle métabolique important. C'est pourquoi son implication dans l'apparition de certains cancers colorectaux a été étudiée. Il semblerait que le microbiote des patients souffrant d'un cancer colorectal soit plus riche en espèces, des bactéries à l'origine présentes dans la bouche étant retrouvées au niveau du microbiote intestinal **(Thomas et al. 2019)**. Par ailleurs, une dysbiose du microbiote intestinal peut induire des inflammations chroniques et la production de métabolites carcinogènes menant à l'apparition de tumeurs cancéreuses. Des analyses d'échantillons fécaux de patients atteints de cancers colorectaux ont montré une plus grande abondance de *Fusobacterium nucleatum*, *B. fragilis* enterotoxigène et *E. coli*. *F. nucleatum* est associée aux tumeurs à un stade avancé et à risque de récidive accrue. *E. coli* va envahir les muqueuses coliques et devenir intracellulaire participant ainsi à l'inflammation **(M. Song, Chan, et Sun 2020)**. L'alimentation va également jouer un rôle dans l'apparition de ces tumeurs colorectales. Un régime riche en viande rouge et/ou transformée va conduire à une production d'acides biliaires secondaires. Ces acides biliaires secondaires vont alors diminuer la fonction de barrière intestinale induisant une perméabilité accrue et des dommages à l'ADN. La consommation de viande va également permettre la production de composés soufrés qui vont être réduits en soufre par les bactéries du microbiote intestinal induisant des dommages à l'ADN, une inflammation et une diminution de la fonction barrière de l'intestin (**M. Song, Chan, et Sun 2020**).

(6) Maladies cardiaques

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des premières causes de décès dans le monde. Elles sont le plus souvent dues à la présence de plaques d'athérome sur la paroi des artères. En s'épaississant, elles peuvent réduire la circulation du sang et former des sténoses (coronaires). Les plaques d'athérome peuvent alors se détacher formant des caillots. Ils peuvent par conséquent bloquer la circulation sanguine occasionnant des infarctus ou des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ischémiques. Les principaux facteurs de risques sont l'alimentation, la sédentarité, le tabac et l'alcool. Ces pathologies multifactorielles peuvent également avoir un lien avec le microbiote intestinal. Il a été démontré qu'une diversité du microbiote intestinal plus faible, avec une diminution des *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* et *Prevotella*, augmente le risque de développer une pathologie cardiovasculaire. Les chercheurs ont également mis en évidence qu'une augmentation des LPSs induit une augmentation de l'inflammation et donc un risque plus élevé de développer des maladies cardiovasculaires **(Fei et al. 2019)**. De manière semblable, une production trop abondante de triméthylamine N-oside (TMAO) par le microbiote induit un risque élevé d'accident cardiovasculaire. Le TMAO est synthétisé à partir d'aliments tels que la viande rouge, les œufs ou bien le fromage et est donc un facteur corrélé négativement à la survenue des plaques d'athérome. Cependant, il existe des facteurs pouvant être corrélés positivement, c'est le cas des acides biliaires qui vont être synthétisés par le foie à partir du cholestérol retrouvé dans l'alimentation puis métabolisés par le microbiote intestinal en acides désoxycholique et lithocholique. Les récepteurs de ces acides, une fois activés, vont produire des cytokines anti-inflammatoires et réduire la taille des plaques **(Chong-Nguyen, Duboc, et Sokol 2017)**. De la même manière, Kasahana et son équipe ont montré qu'un régime riche en fibres diminue l'inflammation et les symptômes de l'athérosclérose. Ce type de régime alimentaire permet la production en plus grande quantité, notamment par la bactérie *Roseburia intestinalis*, du butyrate, acide gras à courte chaine. Ce dernier sollicite alors plus le métabolisme des acides gras et moins la glycolyse, diminuant le risque de maladies cardiovasculaires **(Kasahara et al. 2018)**.

3. Le microbiote cutané

a) La peau

La peau est l'organe le plus étendu chez l'Homme (environ $2m^2$), elle peut représenter de 3 à 5 kg du poids total du corps **(Grice and Segre 2011),** est imperméable et constitue ainsi la première barrière de l'organisme contre les agressions extérieures. Elle se compose de 3 structures : l'hypoderme, le derme et l'épiderme **(FIGURE 4)**.

L'hypoderme, constitué de tissu conjonctif, est la couche la plus profonde de la peau. Il est relié au derme par des fibres de collagène et d'élastine. Cette couche, la plus épaisse, va permettre le stockage des réserves énergétiques et jouer un rôle dans le maintien de la température corporelle. Elle permet également d'amortir les chocs entre le derme et les os. Juste au-dessus de l'hypoderme, se trouve le derme, impliqué dans la tenue de la peau, dans son élasticité et sa solidité. Il est constitué de fibroblastes, richement vascularisé et est composé du derme superficiel (terminaisons nerveuses sensitives) et du derme profond (naissance des follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares). Pour finir, la couche la plus superficielle et également la plus fine est l'épiderme. Son rôle sera multiple, il va servir de barrière aux agressions extérieures tels que les UV ou les pathogènes, il est également imperméable et joue un rôle important dans l'immunité cutanée. La couche la plus superficielle de l'épiderme, le *stratum corneum* ou couche cornée, maintient le film hydrolipidique de la peau et participe ainsi à la barrière cutanée. C'est également dans cette couche que sont retrouvés les microorganismes, principalement sous forme de biofilm **(Grice et Segre 2011b)**.

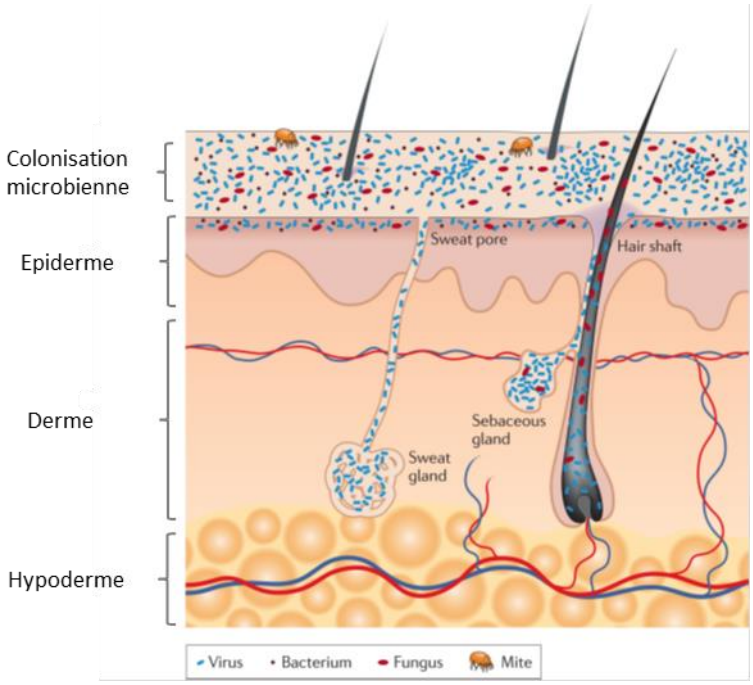


Figure 4 : Structure de la peau et emplacement du microbiote cutané (Grice et Segre 2011b)

b) Composition

(1) Core microbiote cutané

Il est possible de distinguer deux types de flore, la flore résidente et la flore transitoire. Les microorganismes les composant évoluent constamment, en fonction des facteurs environnementaux

(UV, microorganismes de l'environnement), des produits d'hygiène corporelle, des hormones, du sébum et de la sueur **(Ramasamy et al. 2019a)**.

(a) Flore résidente

La flore résidente est celle présente à la surface de la peau et au niveau des follicules pileux de manière permanente. Elle est composée de microorganismes commensaux, aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs, principalement Gram positif. Cette flore habituelle est capable de se reconstituer après une perturbation. Les bactéries qui la composent sont principalement des *Staphylococcus*, des *Corynebacterium*, et des *Propionibacterium*. Cependant des *Brevibacterium*, des Microcoques ou bien des *Acinetobacter* sont également retrouvées. Elle est également composée de parasites, de levures comme *Malassezia furfur* et de virus **(Grice and Segre 2011)** (FIGURE 5). Parmi les bactéries du genre *Staphylococcus*, trois espèces sont largement retrouvées au niveau de la peau : *S. epidermidis*, qui représente 90% de la flore cutanée aérobie, *S. hominis* et S. *haemolyticus* **(Cogen, Nizet, et Gallo 2008a)**.

Selon les zones corporelles, les micro-organismes présents diffèrent. En effet, les communautés bactériennes seront différentes en fonction de la température, du pH, des contenus lipidiques et du taux d'humidité de la peau. Ainsi, trois types de microenvironnements sont définis : les zones « humides », « sèches » et celles dites « grasses ». Les zones humides, riches en glandes sudoripares, sont retrouvées au niveau des aisselles, de la voûte plantaire ou bien au niveau du nombril. Les zones sèches, pauvres en glandes sudoripares et sébacées, se situent au niveau des bras ou des paumes des mains. Quant aux zones grasses, riches en glandes sébacées, elles sont retrouvées au niveau du visage, du cuir chevelu et du dos **(Grice et al. 2009)**.

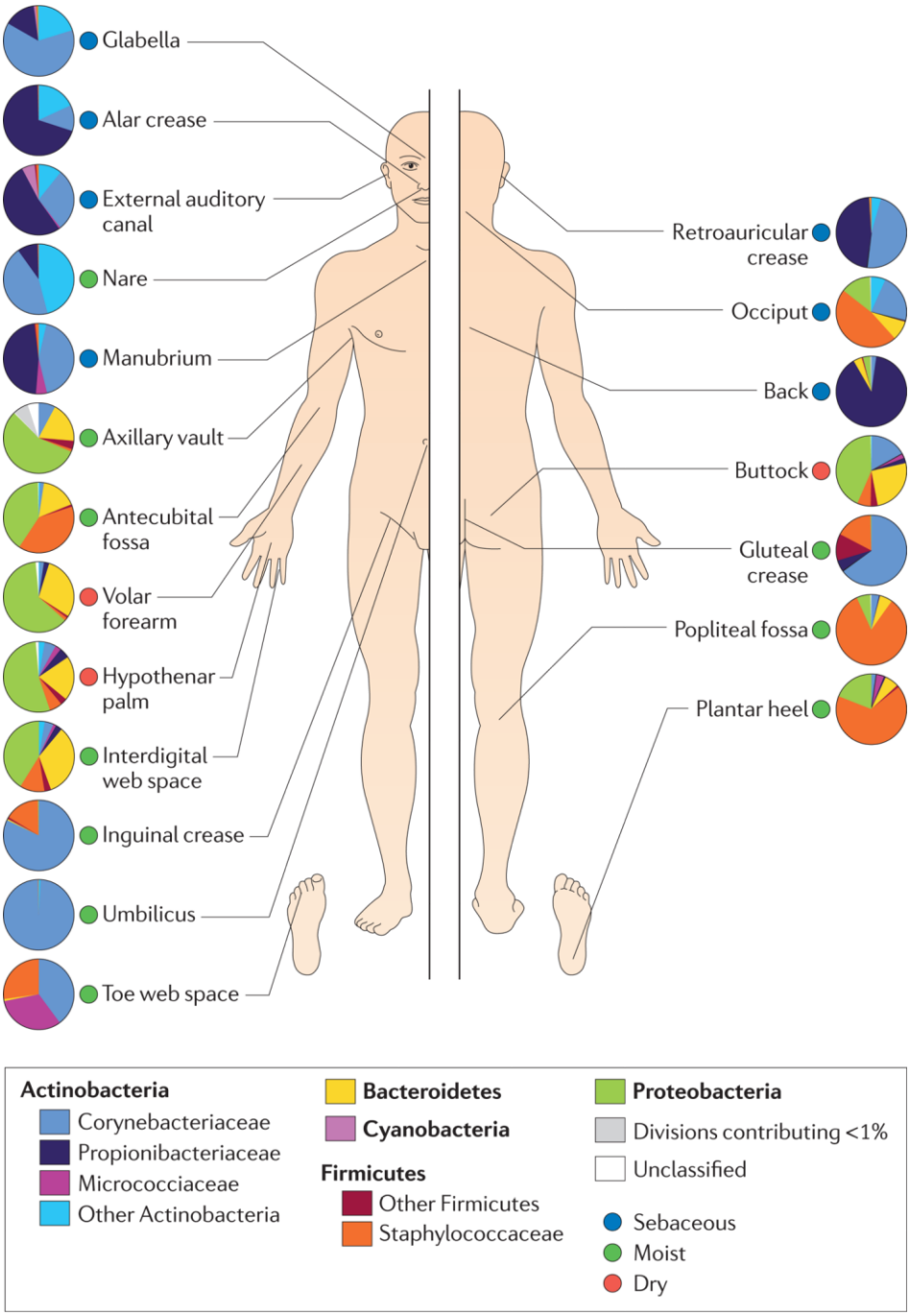


Figure 5 : Représentation des microorganismes du microbiote cutané selon les zones corporelles (Grice et Segre 2011b)

(b) Flore transitoire

La flore transitoire se différencie de la flore résidente par les bactéries la composant mais également par le temps de contact de ces dernières sur la peau. N'étant pas adaptées aux conditions physiologiques de notre peau, elles ne vont pas réussir à s'implanter. Par ailleurs, les bactéries commensales de la flore résidente vont éliminer toute bactérie extérieure à leur voisinage proche par

compétition de niche. Les microorganismes composant cette flore transitoire sont des bactéries de l'environnement extérieur, du microbiote digestif ou ORL et peuvent être pathogènes. Ces bactéries peuvent être par exemple des *Staphylococcus aureus* dont 20 à 50 % de la population est porteuse saine. Cependant, des Streptocoques, des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas*) ou bien des levures (*Candida albicans*) peuvent également être retrouvées **(Dunyach-Remy, Sotto, and Lavigne 2015)**. Le TABLEAU 1 présente les différents micro-organismes décrits au niveau des flores résidente et transitoire du microbiote cutané.

Tableau 1 : Tableau regroupant les microorganismes présents au niveau de la flore résidente et transitoire du microbiote cutané (Mokni et Abdelhak 2014)

Tableau 1.1. Flore cutanée résidente et transitaire.

Flore résidente	Germe		
	Bactéries	Cocci Gram positif	Staphylocoques à coagulase négative – *S. epidermidis* – *S. hominis* – *S. haemolyticus*
		Germes corynébactériformes	– Corynebactéries – *Brevibacterium* – Propionibactéries – Micrococques
		Bactéries Gram négatif	– *Acinetobacter*
	Parasites	Acariens	– *Demodex*
	Levures		– *Malassezia*
	Virus		– Papillomavirus humains
Flore transitaire	Bactéries		– *Staphylococcus aureus* – Streptocoques – *Bacillus* – *Neisseiria*
		Bacilles Gram négatif	– *Pseudomonas*
	Levures		– *Candida albicans* – *Candida parapsilopsis*

(2) Son évolution au cours de la vie

Le microbiote cutané va lui aussi évoluer depuis la naissance jusqu'à la mort. L'acquisition de ce microbiote va essentiellement se faire par la mère lors de l'accouchement. Les premières bactéries à coloniser le corps du nouveau-né seront des Firmicutes, avec principalement des Lactobacilles s'il est né par voie basse **(Dominguez-Bello et al. 2010 ; Cho and Blaser 2012).** Par la suite les Actinobactéries, telles que les *Propionibacterium* et les *Corynebacterium*, suivies des Proteobacteria et des Bacteroidetes viendront coloniser la peau des bébés. Cette colonisation chez les enfants est différente de celle retrouvée chez les adultes, car leur peau est également différente. Plus l'enfant va grandir,

plus son microbiote cutané va tendre à ressembler à celui des adultes avec principalement la présence de Proteobacteria. Cependant, quelques variations peuvent être retrouvées chez les adolescents. En effet, une dérégulation de la production de sébum, due aux hormones, peut augmenter le développement de la bactérie déjà présente *Cutibacterium acnes*, notamment au niveau du visage, avec pour conséquence une inflammation et une augmentation des comédons **(Y. B. Lee, Byun, et Kim 2019),** pathologie plus connue sous le terme « acné ». La diversité microbienne se rétablira progressivement chez l'adulte avant de diminuer avec l'âge.

(3) Dysbiose et pathologies associées

(a) La dysbiose

Tout comme pour le microbiote intestinal, certains facteurs peuvent influencer le microbiote cutané et créer une dysbiose. A terme, un déséquilibre trop important et/ou trop long dans la durée peut induire des pathologies cutanées. Cette dysbiose peut également diminuer la diversité microbienne de la peau **(Wallen-Russell et Wallen-Russell 2017b).** Les facteurs de risques sont variés. On retrouve par exemple le style de vie, l'âge, le stress, l'environnement, les prédispositions génétiques, l'alimentation, l'hygiène de vie, les cosmétiques, la prise de médicaments ou d'antibiotiques **(Schommer et Gallo 2013a)** (FIGURE 6).

Cependant, le microbiote cutané est capable de se régénérer à l'identique après une perturbation. Après s'être lavé les mains, et donc avoir détruit une partie de la flore cutanée, les bactéries ont la capacité de venir recoloniser la peau à l'identique et cela en quelques minutes/heures.

Malgré cette capacité, il arrive qu'une dysbiose s'installe sur le long terme et provoque des pathologies telles que l'acné, le psoriasis, la dermatite atopique ou bien l'hydrosadénite suppurée.

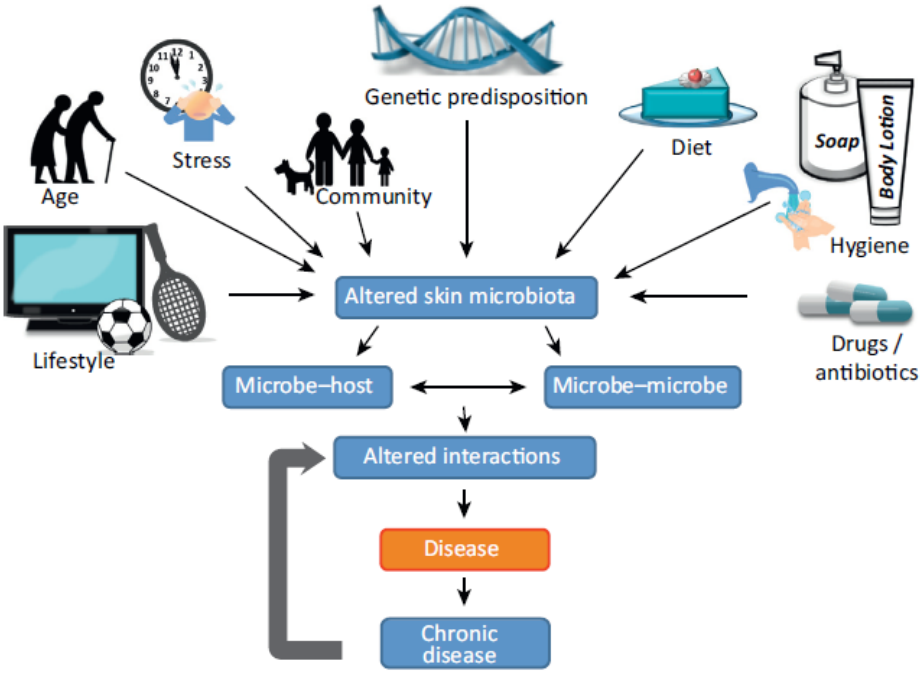


Figure 6 : Facteurs pouvant entrainer une dysbiose du microbiote cutané (Schommer et Gallo 2013a)

(b) L'acné

L'acné est une maladie inflammatoire de la peau affectant 85 % de la population mondiale âgée de 11 à 30 ans **(Dagnelie et al. 2019)**. Cette inflammation se caractérise par l'apparition de comédons et de lésions pouvant devenir kystiques. Elle est présente sur le visage, mais il est aussi possible de retrouver des lésions dans le cou ou dans la partie supérieure du dos. A l'adolescence, sous l'action des hormones, les glandes sébacées produisent un surplus de sébum. Ce dernier va obstruer les conduits des glandes sébacées conduisant à la prolifération anarchique de certaines bactéries du microbiote cutané. *C. acnes*, bactérie anaérobie lipophile, est souvent associée à l'acné. Cependant, cette bactérie fait partie de la flore cutanée résidente participant à maintenir un pH acide en sécrétant de l'acide propionique **(Ramasamy et al. 2019b).** Bien que les mécanismes moléculaires de cette pathologie multifactorielle restent peu connus, la connaissance des fonctions du microbiote cutané ne cesse d'évoluer depuis quelques années. Ainsi, les chercheurs ont amorcé de nouvelles découvertes sur le lien entre l'acné et la flore commensale de la peau. En effet, il semblerait que *C. acnes* ne soit pas la seule bactérie impliquée dans cette pathologie. De plus en plus de chercheurs s'intéressent à la bactérie *Staphylococcus epidermidis* et un déséquilibre entre *C. acnes* et *S. epidermidis* serait une des causes possibles de l'acné **(Claudel et al. 2019).**

(c) Dermatite atopique

La dermatite atopique, ou eczéma atopique, est une maladie inflammatoire chronique de la peau. Elle se caractérise par une sécheresse cutanée intense, un prurit et des plaques érythémateuses. Cette pathologie évolue par poussées et les lésions sont retrouvées principalement au niveau du visage, du cou et des plis du coude ou du genou **(Sala-Cunill et al. 2018)**. La dermatite atopique est due à une altération d'origine génétique de la barrière cutanée. La peau ne faisant plus office de barrière, les agressions extérieures sont plus intenses. Les produits chimiques, les polluants ou bien les bactéries peuvent venir se loger dans la peau provoquant alors une inflammation au niveau de l'épiderme. La sévérité de la dermatite atopique est liée à la présence en surabondance de la bactérie *S. aureus* sous forme de biofilm **(J. E. Kim et Kim 2019)**. Cette bactérie est capable d'induire toute une cascade de réactions immunes telles que la libération de cytokines et de lipoprotéines pro-inflammatoires et l'induction des lymphocytes B indépendants des lymphocytes T **(Wan et Chen 2020)**. La dégranulation des mastocytes, elle, va conduire à la production de l'interleukine 31 connue pour être liée au prurit **(Geoghegan, Irvine, et Foster 2018)**.

(d) Le psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau caractérisée par la formation de plaques rouges très épaisses se détachant sous forme de squames blanchâtres. Ces plaques bien délimitées peuvent être retrouvées partout sur la peau. De plus, des atteintes articulaires peuvent également être retrouvées, c'est le rhumatisme psoriasique. On estime que 2 à 3% de la population mondiale serait atteinte par cette affection. Le psoriasis est une maladie multifactorielle avec des causes génétiques, immunitaires et environnementales. Une dysbiose du microbiote cutané pourrait avoir un rôle dans l'apparition de cette pathologie. Cependant, les résultats des différents travaux menés sur ce sujet sont contradictoires. Dans toutes les peaux psoriasiques, l'abondance en Firmicutes serait augmentée. Toutefois, les résultats diffèrent quand il s'agit des Proteobacteria et des Actinobacteria **(Visser, Kell, et Pretorius 2019)**. Gao et son équipe ont montré une augmentation des genres *Streptococcus* et *Staphylococcus* alors que Fahlén et son équipe ont mentionné une augmentation des *Streptococcus* et une diminution des *Staphylococcus* **(Gao et al. 2008 ; Fahlén et al. 2012)**. Néanmoins, ces résultats différents pourraient s'expliquer par le fait que les sites de prélèvement des patients de chaque étude ne soient pas identiques. Les pistes de recherches de l'impact du microbiote cutané sur le développement du psoriasis sont donc encore nombreuses.

(e) L'hydrosadénite suppurée

L'hydrosadénite suppurée, ou maladie de Verneuil, est une maladie cutanée inflammatoire à caractère chronique. Elle se caractérise par des nodules et des abcès douloureux au niveau des plis cutanés où se logent les glandes sudoripares. L'évolution de la maladie passe par un écoulement de pus et des fistules. Les causes exactes de cette pathologie ne sont pas encore élucidées. Cependant, un lien avec les bactéries composant le microbiote cutané semble être une piste. Des études menées sur cette affection ont montré que la peau des patients, au niveau des sites d'infections, était porteuse de *S. aureus* et de Staphylocoques à coagulase négative. Par ailleurs, des bactéries anaérobies telles que des *Peptostreptococcus* et *C. acnes* ont également été retrouvées au niveau des sites lésionnels **(Ring and Emtestam 2016 ; Balato et al. 2019 ; Langan et al. 2020)**.

c) Rôle

Le microbiote cutané joue un rôle fondamental dans l'homéostasie entre le milieu extérieur et notre corps. Il est impliqué dans le rôle de barrière chimique et physique de l'organisme mais aussi dans le développement du système immunitaire et dans la mise en place d'une réponse immunitaire innée et adaptative à la suite d'une agression par un pathogène **(Sanford et Gallo 2013b)** (FIGURE 7).

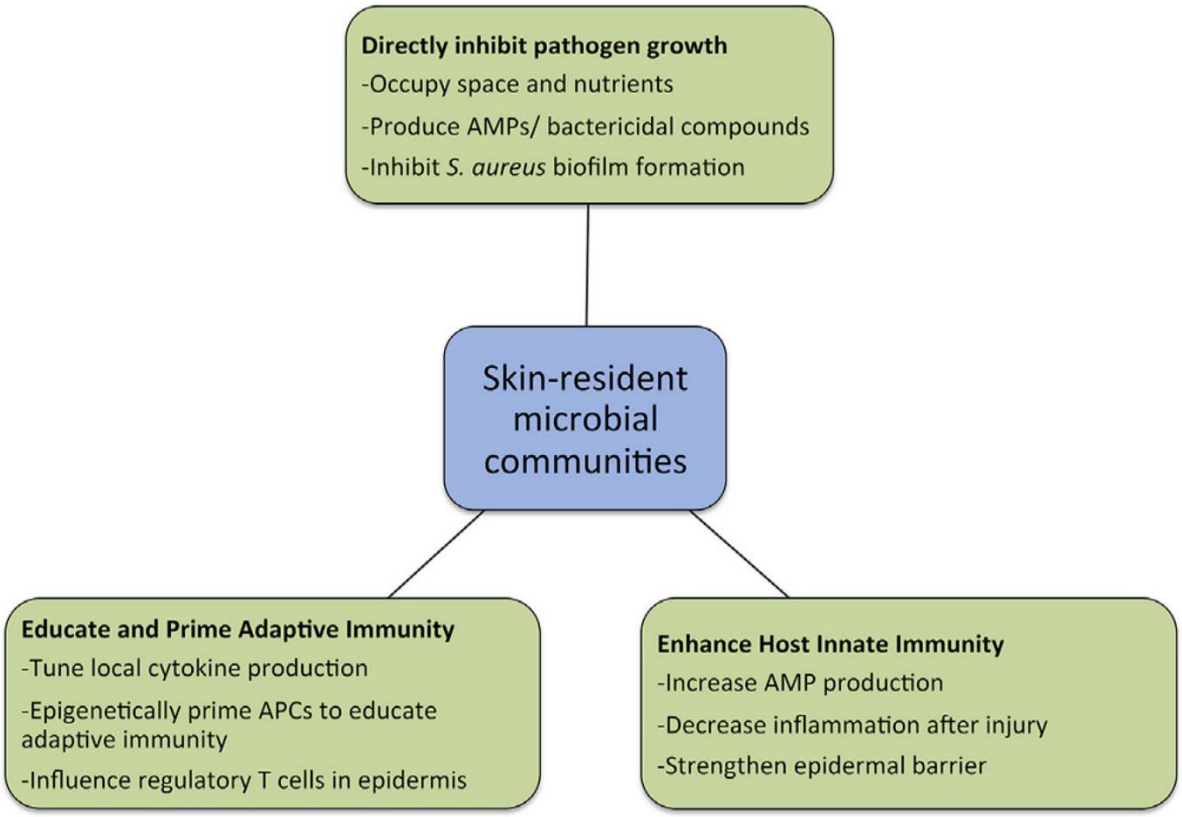


Figure 7 : Principales activités du microbiote cutané (Sanford et Gallo 2013b)

(1) Aide à la barrière cutanée

Le microbiote cutané joue un rôle essentiel de barrière face aux microorganismes pathogènes et aux produits toxiques tout en maintenant une bonne hydratation cutanée **(Grice et Segre 2011b).** Les bactéries commensales du microbiote luttent contre les microorganismes pathogènes pour les empêcher de s'implanter **(Sanford et Gallo 2013b)** en entrant en compétition pour les substrats nutritifs et pour les niches **(Krutmann 2009)**. A côté de ce rôle de barrière physique, il joue également un rôle de barrière chimique en aidant à lutter contre l'installation et à la prolifération des pathogènes **(Coates et al. 2019).** L'acide sapiénique, acide gras composant du sébum, inhibe la croissance de *S. aureus,* qui peut être pathogène, mais pas de *S. epidermidis* qui est une bactérie commensale nécessaire au bon équilibre du microbiote cutané (**Moran, Alorabi, and Horsburgh 2017)**. De même, les conditions de pH peuvent aider à lutter contre l'agression par des bactéries pathogènes. En effet, le pH de la peau est acide, favorisant un milieu adéquat pour les bactéries commensales mais défavorable pour les bactéries pathogènes **(Ali et Yosipovitch 2013)**. La composition en lipides de la peau est régie par le pH cutané. Un pH acide est nécessaire pour leur production et également pour leur maintien. Ces lipides, tels que le cholestérol ou les triglycérides, sont hydrolysés par les bactéries

et levures commensales du microbiote cutané en acide gras libres. Ce sont ces derniers qui maintiennent un pH acide, favorisant le développement des bactéries commensales telles que les *Staphylococcus* et les *Corynebacterium* mais inhibant la croissance des pathogènes telles que *S. aureus* (**Fluhr et al. 2001 ; Eyerich et al. 2018**).

(2) Régulateur du système immunitaire

En plus de son rôle de barrière, le microbiote cutané est essentiel au système immunitaire de la peau, de nombreux acteurs comme les cellules épithéliales et le microbiote communiquant ensemble **(Byrd, Belkaid, et Segre 2018b)**.

Le microbiote cutané participe à l'éducation du système immunitaire durant la période post natale. En effet, chez les nouveaux nés, il n'y a pas encore de réponse immunitaire, ce qui permet une colonisation par de nombreuses bactéries **(Coates et al. 2019)**. Ce phénomène de tolérance permet au système immunitaire d'apprendre à vivre avec des microorganismes et à ne pas répondre de façon intense aux microorganismes commensaux de la peau **(Scharschmidt et al. 2015).** Une fois éduqué, le système immunitaire est à même de réagir en cas d'invasion de pathogènes. Dans un premier temps, les kératinocytes de la peau détectent les pathogènes en reconnaissant les PAMPs. Ces derniers vont activer les PRRs se trouvant à la surface des cellules immunitaires comme les *Toll-Like Receptors* (TLRs), les récepteurs au mannose ou bien les récepteurs de type Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) **(Grice et Segre 2011b)**. Chez les bactéries, les PAMPs sont de différente nature, lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif ou peptidoglycanes des bactéries à Gram positif. La liaison des PAMPs sur les PRRs déclenche une réponse immunitaire innée avec la synthèse de peptides antimicrobiens (AMPs) et de cytokines. Les peptides antimicrobiens peuvent être sécrétés de manière constitutive par le système immunitaire ou bien de manière transitoire contrôlée par le microbiote cutané **(Nagy et al. 2006 ; Gallo et Hooper 2012 ; Naik et al. 2015)**. C'est le cas par exemple de *S. epidermidis*. Cette bactérie commensale du microbiote cutané sécrète des agonistes des PRRs (EGFR ou TLR2) induisant la production d'AMPs ayant une activité contre *S. aureus* ou les streptocoques de groupe A **(Lai et al. 2009 ; Wanke et al. 2011 ; Li et al. 2013).** La bactérie participe également à la production de cytokines telles que l'interleukine 1 alpha contribuant à la défense cutanée ainsi qu'à son adaptation **(Byrd, Belkaid, et Segre 2018b)**. Dans les conditions normales d'équilibre, la réaction immunitaire de la peau envers les bactéries commensales est nulle, c'est l'immunité homéostatique **(Belkaid et Tamoutounour 2016 ; Belkaid et Harrison 2017)**.

B. Les techniques de culture et d'étude des différents microbiotes

Les techniques d'études du microbiote ont progressé avec l'apparition des techniques de séquençage. De plus, les techniques de culture ainsi que les expérimentations animales ont également beaucoup évolué. A ce jour, l'ensemble de ces méthodes concourt à l'étude et à la compréhension des microbiotes.

1. L'approche par métagénomique

L'avènement des techniques de séquençage a permis de grandes avancées dans les connaissances de la composition bactérienne des microbiotes ainsi que dans leurs fonctions. La métagénomique se caractérise par l'étude du contenu génétique d'un échantillon provenant d'une communauté complexe. De nos jours, cette approche est devenue plus accessible en termes de rapidité et de coût, ce qui en fait une technique de choix pour un grand nombre d'études du microbiote.

a) Les différentes techniques de séquençage nouvelle génération

Le séquençage à haut débit ou séquençage de nouvelle génération (NGS) est apparu dans les années 2000 avec des séquenceurs plus modernes et adaptés à l'étude de génomes moins complexes que le génome humain, donc plus rapides et moins coûteux. Parmi ces techniques, on retrouve le pyroséquençage ROCHE 454, la technique ILLUMINA® (Solexa), la technique SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) ainsi que celle de l'Ion torrent.

(1) Le pyroséquençage ROCHE 454

Le pyroséquençage ROCHE 454 (FIGURE 8) détermine la séquence ADN à analyser lors de son amplification par une réaction en chaine par polymérase (PCR) en émulsion **(Ronaghi et al. 1996)**. Pour cela, l'ADN est fractionné en fragments compris entre 300 et 800 paires de bases afin d'obtenir une banque d'ADN simple brin. Des adaptateurs sont ajoutés au mélange et viennent se fixer sur les extrémités des ADN. Puis chaque brin est immobilisé sur une bille. Les billes, contenant chacune un brin d'ADN, sont émulsionnées entre elles avec des réactifs d'amplification. Des microréacteurs vont alors se créer autour de chaque bille. Dans ces derniers, une PCR en émulsion va avoir lieu. Puis chaque

bille va être introduite dans un puits d'une plaque spéciale. Des enzymes de séquençage (sulfurylase et luciférase) sont ajoutées ainsi que des nucléotides individuels. L'ajout des différents nucléotides entraine une réaction enzymatique produisant un photon qui va être détecté, permettant de déterminer la séquence complète de l'ADN de départ **(Harrington et al. 2013)**. Cette méthode permet de séquencer de longs brins de manière très rapide. Cependant, elle est assez onéreuse et les erreurs de séquençage peuvent être importantes dues aux homopolymères (répétition de plusieurs nucléotides identiques à la suite).

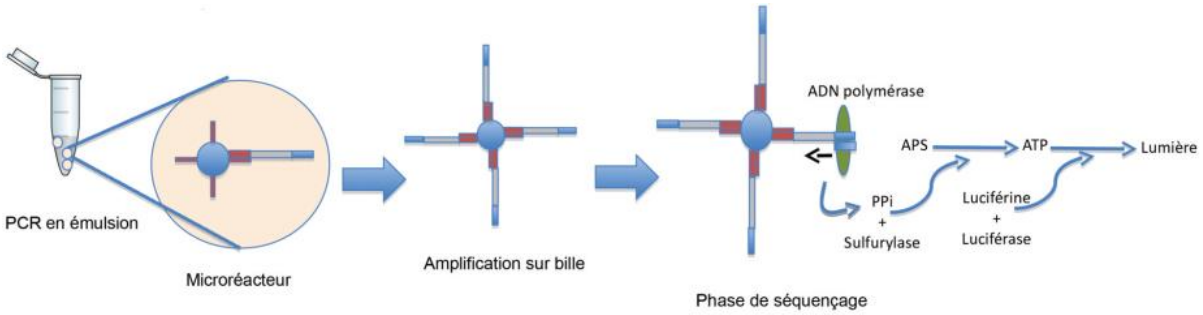


Figure 8 : Schéma représentatif du pyroséquençage Roche 454 (Dortet, Bonnin, et Naas 2017)

(2) La technique Illumina®

Le séquençage Illumina® (FIGURE 9), développé par Solexa, se base également sur la synthèse de l'ADN **(Bentley et al. 2008)**. L'ADN double brin est fractionné de manière aléatoire en fragments de 200 paires de bases. Des adaptateurs sont ensuite ajoutés aux extrémités, l'ADN est dénaturé en ADN simple brin et les adaptateurs viennent se fixer sur une surface du « flowcell ». Après une PCR pour amplifier les fragments, le séquençage peut commencer. Le premier cycle consiste en l'ajout de 4 terminateurs marqués, des amorces et de l'ADN polymérase. Après excitation par un laser permettant de différencier les 4 bases azotées, les signaux émis sont enregistrés. Le deuxième cycle permet de savoir quelle est la base qui est ajoutée en seconde position. A chaque cycle, il est donc possible de déterminer la base suivante et ainsi d'obtenir la séquence complète. Bien que les séquences soient plus courtes qu'avec la technique ILLUMINA® et donc plus difficiles à analyser, cette technique est bien moins coûteuse et possède une puissance de séquençage très supérieure, ce qui en fait à l'heure actuelle une technique de choix pour la recherche **(Panek et al. 2018 ; Rimoldi et al., 2018 ; Mas-Lloret et al. 2020)**.

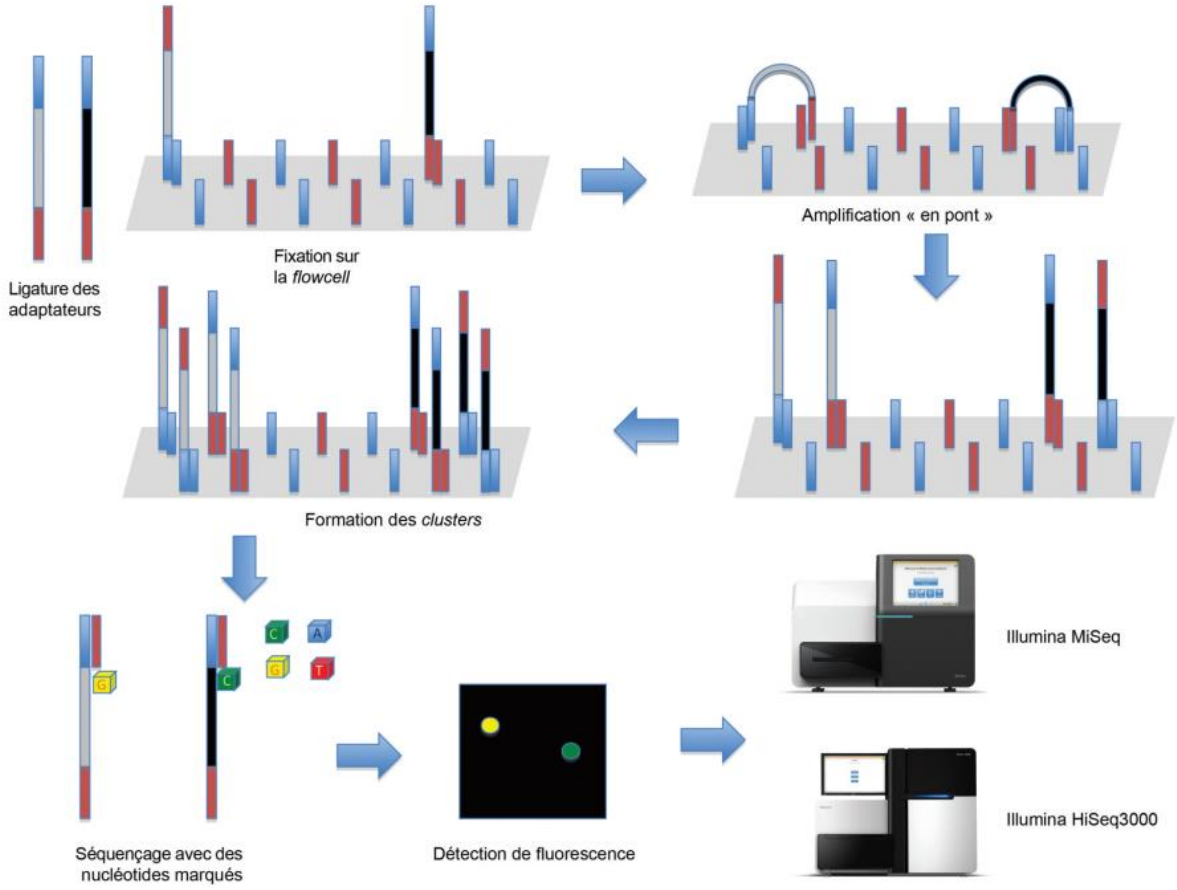


Figure 9 : Représentation schématique du séquençage Illumina® (Dortet, Bonnin, et Naas 2017)

(3) Le séquençage par ligation SOLiD

La technique du séquençage par ligation SOLiD est différente des deux techniques présentées ci-dessus. En effet, elle ne repose pas sur l'amplification de l'ADN mais sur la ligation à l'ADN d'oligomères fluorescents **(McKernan et al. 2009)**. Cependant, cette technique (FIGURE 10) débute de la même manière que le pyroséquençage. En effet, les brins d'ADN sont associés à une microbille à l'aide d'un adaptateur. Chaque brin est ensuite amplifié par PCR en émulsion. A la suite de la PCR, les billes sont fixées sur une plaque en verre puis chaque brin est associé à une amorce. La réplication peut alors débuter par la ligation, un processus différent de ceux vus jusqu'à maintenant. Pour cela, des oligomères de 8 nucléotides, dont deux marqués par fluorescence, vont s'associer aux amorces en présence d'une ADN ligase. Chaque étape de ligation est suivie d'une détection de la fluorescence, puis les produits d'extensions sont retirés et une nouvelle amorce est ajoutée en position n-1. A chaque nouveau cycle une base est séquencée. En répétant les opérations de ligation, le brin est séquencé entièrement **(Liu et al. 2012)**. Cette technique est abordable mais présente l'inconvénient d'être plus longue et d'avoir des biais de séquençage en présence de séquences palindromiques (séquence

identique lorsqu'elle est lue dans le sens 3'-> 5' et dans le sens 5' -> 3') **(Huang et al. 2012)**. Par ailleurs, la profondeur de séquençage est plus grande avec cette technique mais les tailles des séquences sont beaucoup plus petites rendant l'analyse difficile.

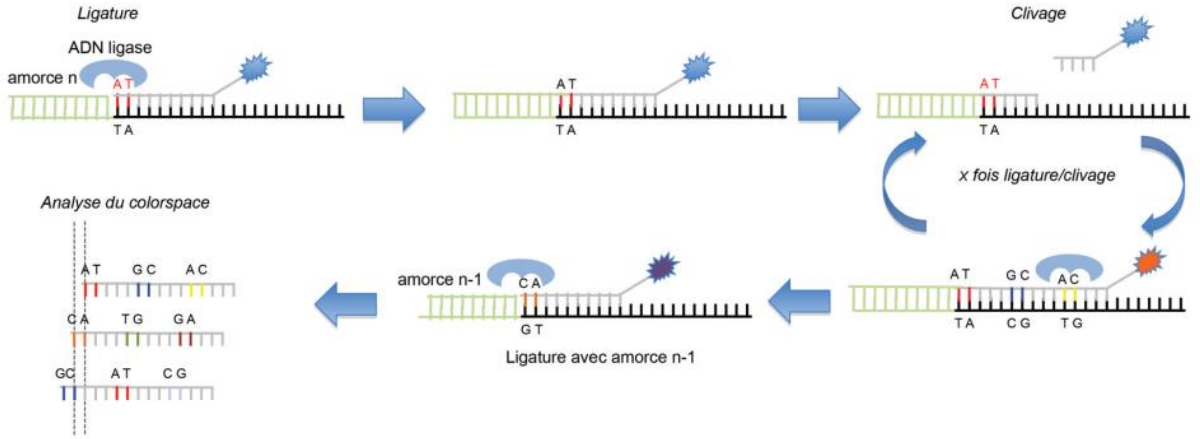


Figure 10 : Représentation schématique du séquençage SOLiD (Dortet, Bonnin, et Naas 2017)

(4) Le séquençage Ion Torrent

Le séquençage Ion Torrent se base sur la détection des ions H^+ produits lors de la polymérisation de l'ADN. Les brins d'ADN sont insérés dans des micro-puits et sont mis en contact avec des dNTP (désoxyribonucléotides triphosphate). A chaque incorporation de dNTP aux brins d'ADN, un ion H^+ est libéré et va faire varier le pH qui va être enregistré. Chaque variation de pH indique l'incorporation d'une base à l'ADN **(Rothberg et al. 2011)**. Cette méthode permet aux laboratoires de recherche ou clinique de réaliser leur propre séquençage. En effet, le prix abordable et la taille des appareils permet à n'importe quel laboratoire d'en faire l'acquisition (taille d'un thermocycleur). Cependant, la taille des séquences obtenues ne dépasse pas les 200-250 paires de bases rendant l'analyse plus fastidieuse.

(5) Le séquençage par nanopores

Le séquençage par nanopores est la dernière technique mise en œuvre pour le séquençage à haut débit. L'appareil est miniaturisé jusqu'à une dizaine de centimètres et branché à un ordinateur qui va lui fournir une alimentation électrique et des capacités de calculs. La technique consiste à introduire dans les pores les séquences ADN simple ou double brins. Le passage de ces ADN dans les pores va induire un changement de courant électrique différent selon les bases. Ce changement

permet de déterminer la séquence au fur et à mesure du passage de l'ADN dans le pore **(Kasianowicz et al. 1996)**. Cette technique, bien que nouvelle sur le marché, est très prometteuse. Les nouveaux appareils sont capables de séquencer le génome entier de bactéries avec un taux d'erreur pouvant descendre jusqu'à 0.05% **(Brown et al. 2017)**.

b) L'application à l'étude des microbiotes intestinal et cutané

Toutes ces méthodes ont permis l'apparition de projets tels que MetaHit et HMP visant à déterminer les espèces, sans passer par les étapes de culture, et à comprendre les mécanismes mis en jeu au sein du microbiote intestinal **(Peterson et al. 2009 ; MetaHIT Consortium et al. 2010)**. La première étude de séquençage du microbiote intestinal humain a été réalisée en 2006 par Gill et ses collaborateurs. Cette équipe américaine a amplifié l'ADN 16S d'échantillons fécaux provenant de deux donneurs en bonne santé qui n'avaient consommé ni médicaments ni antibiotiques durant l'année précédente. Ils ont ensuite comparé leurs résultats à ceux d'un génome humain et ont montré que le métabolisme humain bénéficiait d'un apport bactérien **(Gill et al. 2006)**. Les NGS ont également facilité l'étude du microbiote cutané en se dispensant des étapes de culture *in vitro*. La découverte de nouvelle espèces microbiennes a permis de comprendre l'importance des dysbioses dans certaines pathologies cutanées ou bien les mécanismes d'adaptation de ces espèces aux conditions chimiques particulières de la peau **(Mathieu, Vogel, et Simonet 2014)**.

Actuellement, le séquençage du microbiote intestinal est beaucoup plus facile. Néanmoins, les étapes préliminaires sont cruciales pour s'assurer que les différentes études réalisées peuvent être comparées entre elles. La première étape consiste en la collecte des échantillons fécaux. Pour cela, un échantillon de 5mm^2 de selles fraiches est collecté à l'aide d'un écouvillon stérile, inséré dans un tube à essai et stocké dans les 24h à -80°C jusqu'à utilisation (**Di Segni et al. 2018)**. En ce qui concerne le microbiote cutané, les prélèvements peuvent s'effectuer de trois manières différentes. La première consiste à prélever la biomasse à l'aide d'un écouvillon de manière non invasive, la deuxième consiste en un prélèvement par biopsie et la troisième permet le prélèvement après une éraflure à la surface de la peau **(Ferretti et al. 2017)**. La deuxième grande étape consiste en l'extraction des ADNs. Puis, deux grandes approches peuvent être utilisées, l'approche ciblée ou l'approche globale. La méthode ciblée consiste à déterminer la composition en espèces bactériennes dans l'échantillon, elle est appelée approche phylogénétique ou méta-taxonomique. Elle consiste à amplifier par PCR une région du gène codant l'ARN 16S. En fonction de l'expérimentation, différentes régions variables peuvent alors être ciblées **(Clooney et al. 2016)**. Une fois la PCR réalisée, les amplicons générés sont alors séquencés. Après le séquençage, des OTUs (Unité Taxonomique Opérationnelle) sont produits et

analysés. Une table des OTUs est alors obtenue avec une abondance relative de chaque OTU retrouvé dans l'échantillon. La méthode globale quant à elle consiste à obtenir des informations sur les fonctions du microbiome, c'est l'approche métagénomique globale ou encore shotgun. Elle consiste à séquencer l'ensemble des ADN extraits sans cibler de régions spécifiques **(Qin et al. 2010)**.

La métagénomique a permis la connaissance approfondie des espèces qui composent les microbiotes intestinal et cutané et notamment la mise en évidence de espèces jusqu'à présent non cultivables *in vitro* **(Tap et al. 2009 ; Qin et al. 2010 ; Huse et al. 2012 ; Schloissnig et al. 2013b)**.

2. L'approche par culture

La première technique d'étude des microbiotes intestinal et cutané, pour ce qui concerne la microbiologie, est la culture sur gélose utilisée depuis des décennies. Cependant, depuis quelques années, de nouvelles approches ont vu le jour et nous en citerons quelques-unes dans la suite de ce manuscrit. Seules les techniques les plus utilisées seront mentionnées de manière non exhaustive.

a) Microbiote intestinal et modèles in vitro

Les techniques *in vitro* consistent à mettre des prélèvements de selles en culture dans des milieux plus ou moins complexes mimant l'environnement digestif. Parmi les principaux modèles, on retrouve les modèles de fermenteur unique, les modèles de fermenteur en culture continue, les systèmes de digestion en continu ainsi que la culture sur simple milieu gélosé.

(1) La culture sur gélose

Pour l'étude du microbiote intestinal, des prélèvements de selles peuvent être ensemencés sur différents milieux gélosés permettant la croissance d'un grand nombre de micro-organismes. Cependant, l'écueil principal est représenté par le fait que de nombreuses bactéries composant le microbiote intestinal ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène. Il est donc nécessaire de s'affranchir de cet élément en utilisant des jarres (boites hermétiques où un sachet permettant de réduire l'oxygène est introduit), des rampes à azote ou des enceintes de travail en anaérobiose.

Cette technique est encore largement utilisée de nos jours mais de nouvelles approches plus complètes voient le jour et sont de plus en plus perfectionnées.

(2) Les fermenteurs uniques

Les fermenteurs uniques sont les premiers modèles d'étude du microbiote intestinal, mis en place dans les années 1990 **(X. Wang et Gibson 1993)**. Ils se caractérisent par un seul récipient nommé bioréacteur, qui contient un milieu unique, et est constamment maintenu à 37°C, à pH 6.8 et sous condition d'anoxie. Les fermenteurs uniques sont utilisés durant de courtes périodes, 72h au maximum, permettant de modéliser de manière très simple le colon distal **(Barry et al. 1995)**. Ce type de modèle a été utilisé pour comprendre la digestion. Les aliments ont été étudiés comme substrats de la croissance bactérienne et du métabolisme. En 2011, une étude a caractérisé la digestion du vin et étudié ses métabolites en utilisant la technique du bioréacteur **(Gumienna, Lasik, et Czarnecki 2011)**. De nos jours, ce modèle est le plus souvent utilisé pour mettre au point les conditions expérimentales préalables aux études utilisant plusieurs bioréacteurs en série.

(3) Les modèles de fermenteurs continus

Les modèles de fermenteurs en culture continue sont apparus dans les années 1960 **(Rufener, Nelson, et Wolin 1963 ; Slyter, Nelson, et Wolin 1964)**. Ils consistent en plusieurs bioréacteurs couplés les uns aux autres. Ces modèles d'études permettent d'apporter un flux constant de nutriments et d'évacuer les déchets. De la même manière que pour le fermenteur unique, le pH et les conditions d'anoxie sont contrôlés.

Un des modèles utilisant cette technique est le système à trois niveaux (*three stage colonic model system*) **(Gibson, Cummings, et Macfarlane 1988)**. Il permet de mimer les trois grandes parties du côlon. Le côlon proximal est modélisé grâce à un premier compartiment riche en nutriments et possédant un pH très acide. Ce premier compartiment est relié à un deuxième où le pH devient plus alcalin et où les nutriments se font plus rares. Il modélise le côlon transverse. Le deuxième compartiment est relié au troisième et dernier où le pH est neutre et représente le côlon descendant. Chaque compartiment est inoculé avec une suspension fécale humaine et incubé sur une nuit pour laisser le temps aux bactéries de se développer. Le lendemain, du milieu frais est ajouté dans le compartiment 1 et une pompe péristaltique, mimant le péristaltisme intestinal, est mise en route. Cette première phase dure en général 48h afin de représenter au mieux le début de la digestion. Une fois le premier compartiment rempli, l'excès de liquide va alors se déverser dans le compartiment 2 et ainsi de suite. Une fois le compartiment 3 rempli, un dernier compartiment se trouve en bout de chaine

et fait office de récipient à déchets **(McFarland 1998)**. Ce modèle est stable entre 8 et 16 jours après l'inoculation et permet alors de réaliser les tests désirés.

Il existe d'autres modèles de fermenteurs continus, dont les applications sont plus restreintes. Le modèle PolyFermS ou *Polyfermentor intestinal model*, permet d'étudier l'effet de traitements sur le microbiote intestinal du côlon proximal. Il consiste à inoculer un échantillon de fèces dans un premier compartiment qui sera ensuite transféré dans un deuxième compartiment puis dans un troisième grâce à un flux constant. Les trois compartiments ont un pH maintenu à 5,5 qui permet de mimer celui du côlon proximal **(Berner et al. 2013)**.

L'EnteroMix® est un modèle possédant 4 compartiments en parallèle mimant le côlon ascendant, le transverse, le descendant et le côlon sigmoïde/rectum **(Mäkivuokko et al. 2005)**. Les compartiments possèdent les pH respectant les valeurs *in vivo*, respectivement 5, 6, 6.5 et 7. Les volumes utilisés dans ce modèle sont très faibles (entre 6 et 12 mL), l'échantillon fécal est mélangé au premier compartiment et seulement 10 mL sont prélevés pour être transférés aux compartiments suivants. Ce processus est répété toutes les 3 heures. Après 48h de culture, des échantillons dans chaque compartiment peuvent être prélevés et analysés **(Venema et van den Abbeele 2013)**. Ce modèle sert principalement à étudier les effets de la fermentation des carbohydrates sur le microbiote intestinal **(Williams et al. 2015)**.

(4) Les systèmes de digestion artificielle

Afin de rendre plus complets les modèles de biofermenteurs, de nouveaux modèles de digestion artificielle ont vu le jour. Ils permettent de recréer les conditions physico-chimiques retrouvées le long du tube digestif. En plus des microorganismes et du péristaltisme, ces modèles apportent des sucs gastriques, des sucs pancréatiques et des sels biliaires **(Williams et al. 2015)**. Parmi eux, on distingue le modèle SHIME® et le TNO.

(a) Le modèle SHIME®

Le SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) ou encore simulateur d'écosystème microbien intestinal humain a été mis en place dans les années 90 **(Molly, Vande Woestyne, et Verstraete 1993)**. Ce modèle (FIGURE 11) dynamique est composé de 5 bioréacteurs simulant le duodénum/jéjunum, l'iléon, le côlon ascendant, le côlon transverse et le côlon descendant. Un dernier compartiment a ensuite été ajouté mimant l'estomac **(Patrick De Boever 2001)**. Tous ces

compartiments sont maintenus à 37°C, en anaérobiose et agités constamment pour refléter le péristaltisme intestinal. Le pH est maintenu dans chacun des réacteurs de manière identique au pH humain des zones modélisées **(Van den Abbeele et al. 2010)**. Pour mettre en route le dispositif, il faut introduire des aliments permettant aux microorganismes de se nourrir, des liquides pancréatiques et biliaires en plus d'un inoculum fécal. Le milieu de culture est ajouté 3 fois par jour dans les deux premiers compartiments ainsi que du jus pancréatique et biliaire dans le compartiment représentant l'intestin grêle. Le milieu est composé de différents nutriments tels que des glucides, des protéines, des mucines, des minéraux et des vitamines **(Molly, Vande Woestyne, et Verstraete 1993)**. Une fois la première étape de digestion réalisée, le contenu du compartiment est pompé pour être versé dans le compartiment représentant le côlon ascendant. Le début de la digestion dans le côlon commence lors de cette étape. Les temps de rétention lors de la première partie de la digestion peuvent être modulés en jouant sur les volumes des compartiments **(Van de Wiele et al. 2015)**. Les applications de ce modèle sont nombreuses. Il est possible par exemple de déterminer les effets d'un nouveau probiotique ou bien d'étudier la biodisponibilité de certains composés.

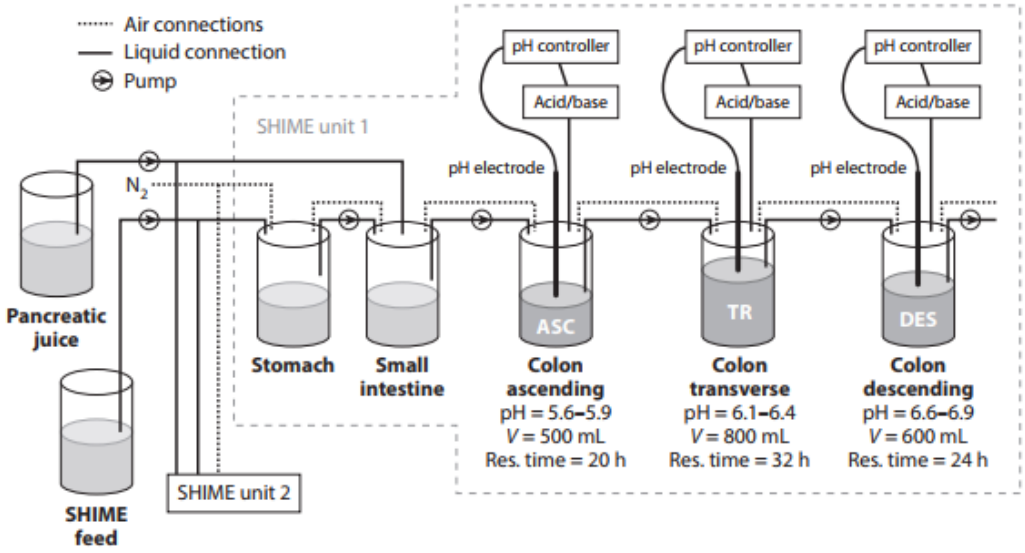


Figure 11 : Modèle SHIME® (Williams et al. 2015)

(b) Le TNO intestinal model

Le TNO intestinal model ou TIM a été mis au point par Minekus et son équipe au milieu des années 90 **(Mans Minekus et al. 1995)**. Ce modèle est le plus complet pour étudier le système digestif (FIGURE 12). Le TIM comporte 4 grands compartiments représentant l'estomac, le duodénum, le

jéjunum et l'ileon et reliés entre eux par une pompe péristaltique. Ce modèle permet de contrôler la température, le brassage du chyme, les vidanges gastrique et iléale mais aussi les sécrétions digestives. L'acidification au niveau de l'estomac et la neutralisation du pH au niveau de l'intestin grêle sont également mimées. Par ailleurs, ce modèle est doté d'un système de dialyse permettant de reproduire l'absorption d'eau **(Guerra et al. 2012)**. Il peut être utilisé pour simuler l'estomac, c'est le TIM-1 ou bien pour reproduire le côlon proximal, c'est le TIM-2 **(M. Minekus et al. 1999)**. Un inoculum fécal permet d'ensemencer le modèle qui se stabilise ensuite. Cependant, les expériences durent rarement plus de quelques jours (entre 1 et 3 jours) **(Venema et van den Abbeele 2013)**.

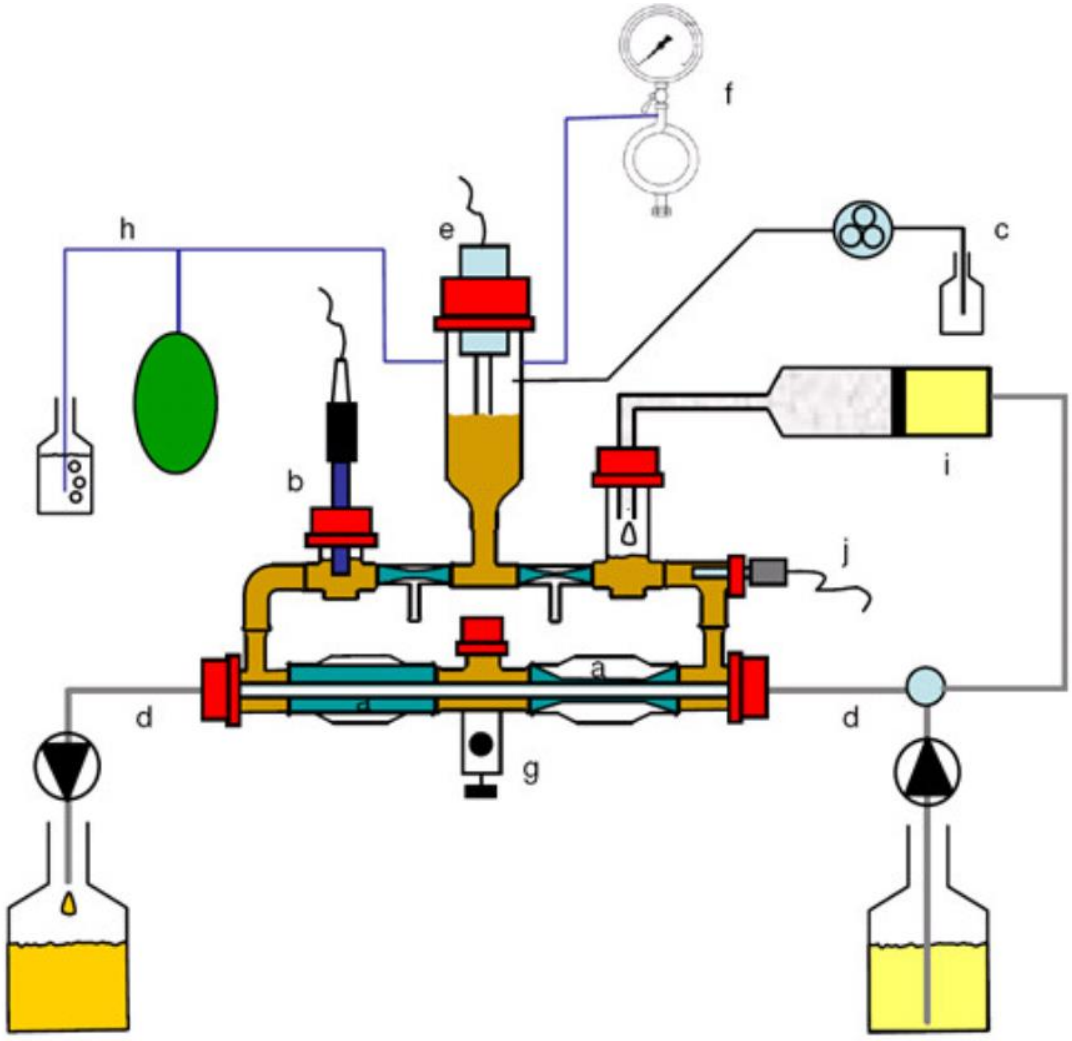


Figure 12 : Schéma représentant le modèle TNO (Rehman et al. 2012)

a) compartiment péristaltique contenant les matières fécales, b) électrode pH, c) pompe alkid, d) circuit de liquide de dialyse avec membrane à fibres creuses, e) capteur de niveau, f) entré du gaz N2, g) entré échantillon, h) sortie du gaz, i) conteneur de "flux iléal", j) capteur de température

(5) Les modèle de l'épithélium intestinal

Bien que les modèles de digestion artificielle soient très complets, il manque cependant l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales. C'est pourquoi des modèles permettant de prendre en compte ces cellules ont été élaborés.

(a) Le modèle HMI™

Le modèle HMI™ (*Host Microbiota Interaction Model*) se compose de deux compartiments séparés par une membrane semi perméable et une couche de mucus. Le compartiment supérieur est le compartiment luminal et l'inférieur contient les cellules épithéliales intestinales. Ce modèle permet l'étude de l'adhérence bactérienne et de l'échange des métabolites entre les deux compartiments **(Marzorati et al. 2014a)**. L'utilisation de deux compartiments séparés permet de maintenir des conditions d'aérobiose dans le compartiment luminal et des conditions d'anaérobiose dans le compartiment inférieur **(Williams et al. 2015)**.

(b) Le modèle Gut on a chip

Le modèle Gut on a Chip est basé sur la technique de microfluidique et a été mis en place dans les années 2000 **(H. J. Kim et al. 2012 ; H. J. Kim et Ingber 2013)**. Il permet de mettre en culture des cellules épithéliales, souvent des *Caco-2*, et de leur faire subir des mouvements pouvant s'apparenter au péristaltisme. Les cellules sont ensemencées sur des membranes créant deux chambres, une chambre supérieure et une chambre inférieure. Les micro-chambres où sont déposées les cellules sont reliées entre elles par des micro-canaux permettant de contrôler les différents flux et volumes **(« Technology and Application of Gut-on-Chip » 2020)**. Ainsi, les cellules vont se développer de manière similaire à ce qui se passe dans le tractus digestif. Elles vont former des microvillosités, être reliées par des jonctions serrées et recouvertes de bordure en brosse et de mucus **(Steinway et al. 2020)**. L'ensemble peut être placé en anaérobiose pour la survie des bactéries intestinales. Si tel est le cas, un flux de milieu de culture enrichi en oxygène est apporté en continu dans la chambre inférieure pour la survie des cellules épithéliales. Grâce à cette technique, il est possible d'analyser la structure des muqueuses formées en fonction du gradient d'oxygène représentant les différentes parties du tube digestif. Par ailleurs, grâce aux techniques d'imagerie *in situ*, les interactions entre les cellules épithéliales et les bactéries du microbiote peuvent être analysées en temps réel **(Poceviciute et Ismagilov 2019)**.

b) *Microbiote cutané et modèles* in vitro

L'étude du microbiote cutané par culture passe essentiellement par des modèles de peaux reconstituées où les bactéries peuvent ensuite être incubées pour étudier leur croissance ou bien leur effet sur les différents modèles. Ces modèles peuvent être simples, en 2D ou bien plus complexes, en 3D. Il est également possible, tout comme pour le microbiote intestinal, d'utiliser des milieux spécifiques pour cultiver les différentes espèces du microbiote cutané. Après un prélèvement de peau, les différentes espèces sont inoculées sur des milieux de culture gélosés spéciaux permettant la croissance d'une grande majorité de micro-organismes.

Les modèles de peaux présentés par la suite et la technique de culture des souches ne sont pas dissociables pour l'étude du microbiote cutané. Ils s'utilisent conjointement pour comprendre les interactions des bactéries avec la peau, la pathogénicité de certaines souches ou leur impact sur la cicatrisation.

(1) Les modèles de peaux *in vitro* en 2D

Les modèles de peaux reconstituées les plus simples sont les modèles en 2D, c'est-à-dire en monocouche et avec un seul type de cellules ou bien en monocouche mais cette fois avec une co-culture de plusieurs types cellulaires.

(a) Les modèles en monocouche avec un seul type cellulaire

Les premières méthodes de culture de la peau remontent aux années 1950, où l'équipe de Billingham a séparé le derme de l'épiderme d'une peau humaine pour isoler et cultiver des kératinocytes **(Billingham et Medawar 1951)**. Il faudra attendre 25 ans avant qu'une nouvelle grande découverte fasse avancer ces techniques d'étude. En 1975, des fibroblastes ont été tués par irradiation pour venir nourrir et faire proliférer des cultures de kératinocytes **(Rheinwatd et Green 1975)**. Depuis cette date, il est donc possible, à partir, d'un seul kératinocyte d'en produire en masse.

Les cellules sont cultivées en une seule couche dans des boites de Pétri contenant un milieu de culture adapté **(Kanwar et al. 2018)**. Il est possible de cultiver d'autre types de cellules que des kératinocytes. En 2016, une équipe a mis au point une technique de culture de *stratum corneum* humain pour étudier l'interaction entre microorganismes et couche cornée. Pour cela, une suspension

de callosité provenant d'un talon de donneur sain est déposée sur une gélose et après séchage, des bactéries sont inoculées pour étudier leur croissance par exemple **(Krieken et al. 2016)**.

Bien que ces modèles soient faciles et rapides à mettre en œuvre, ils ne représentent pas vraiment la réalité. En effet, il est important de prendre en compte les différents types cellulaires de la peau.

(b) Les modèles en monocouche et en co-culture

Les modèles de peau en 2D sont plus complexes. Ils sont eux aussi cultivés en monocouche mais avec différents types cellulaires et donc en co-culture. Ainsi, il est plus facile de reproduire une interaction spécifique.

En 2009, une équipe américaine a mis au point un modèle de co-culture afin d'étudier le rôle des biofilms de *S. aureus* dans la reconstitution de la peau après une blessure. Pour cela, ils ont cultivé des biofilms bactériens dans des inserts de culture ensuite placés sur une monocouche de kératinocytes humains **(Kirker et al. 2009)**.

Ce type de co-culture en monocouche peut notamment servir à l'étude de l'acné et de C*. acnes*. Ces différents modèles se basent sur la culture des sébocytes. Pour cela, différentes techniques peuvent être utilisées. La culture de sébocytes à la suite de dissection ou micro-dissection des glandes sébacées permet d'étudier les taux de lipides dans l'acné. Cependant, cette technique chronophage nécessite un approvisionnement en tissus viables important **(Xia et al. 1989)**. La culture en monocouche des sébocytes de rats permet aussi d'étudier l'acné. Les cellules des glandes préputiales de rats sont incubées sur une couche nutritive de fibroblastes. Ce modèle permet de comprendre les influences hormonales des cellules sébacées, leur développement ainsi que leur croissance **(Rosenfield et al. 1999)**. Pour étudier la relation entre les kératinocytes, les sébocytes et *C. acnes*, une co-culture des deux types cellulaires est réalisée dans une chambre de culture séparée par une membrane et les bactéries sont placées de l'autre côté de la membrane **(Kanwar et al. 2018)**.

L'avantage de la culture en monocouche est qu'elle est facile, rapide pour l'obtention de grandes quantités de cellules et est économique à mettre en place. Cependant, elle ne reflète pas toutes les caractéristiques de la peau **(Niehues et al. 2018)**. C'est pourquoi il a été nécessaire de trouver des modèles plus complexes et plus représentatifs.

(2) Les modèles de peau en 3D *in vitro*

Les modèles de peau en 3D sont des modèles reproduisant la structure de la peau. Ils ont commencé à être développés à la fin des années 1970 **(Freeman et al. 1976)** et sont de plus en plus utilisés depuis la loi de bioéthique de 2013 visant à minimiser au maximum l'utilisation de modèles animaux dans l'expérimentation scientifique **(Niehues et al. 2018)**. Ces nouveaux modèles permettent l'étude des interactions entre la peau et les microorganismes, des infections par certaines bactéries ou même des effets des biofilms sur la cicatrisation.

Le modèle le plus simple, le modèle de Leiden, consiste à isoler des kératinocytes primaires, à les cultiver et à les utiliser pour créer un épithélium. Les kératinocytes sont ensemencés et cultivés dans un insert de culture durant quelques jours. Une fois que les cellules se sont développées en monocouche, le milieu de culture est retiré du puits. Les kératinocytes vont alors se trouver en contact avec l'air, initiant ainsi une stratification des couches de l'épiderme (génération et différenciation de plusieurs couches) **(Kirker et James 2017)**. Les kératinocytes peuvent également être incubés avec une matrice de collagène ou de fibrine contenant des fibroblastes afin d'imiter la matrice extracellulaire **(Rademacher et al. 2018)**. Des modèles permettant l'étude des effets des biofilms sur les kératinocytes ont également été mis en place. Par exemple, il est possible de récupérer des explants d'oreilles de porc et de les cultiver dans des inserts de culture en présence de *S. aureus*. Après quelques jours de mise en contact, des biofilms bactériens vont alors se former autour des follicules pileux ainsi que dans leurs interstices **(Lone et al. 2015)**.

Par ailleurs il existe des modèles commerciaux recréant la peau pour l'étude du microbiote cutané tels que EpiCS®, Epiderm® ou encore SkinEthic® RHE. EpiCS® est un modèle de peau reconstruit à partir de kératinocytes humains, et présenté en plaque 24 puits par la société allemande CellSystems. Le modèle breveté EpiDerm®, commercialisé par l'entreprise MatTek (Etats Unis), permet selon le fabricant de tester les nouvelles formules cosmétiques mais également de réaliser des tests de toxicologie. Quant au modèle SkinEthic® RHE, qui est un modèle français détenu par l'Oréal, il permet de pratiquer des tests sur des peaux reconstruites avec des types cellulaires différents ou autres que cutanés.

Des modèles encore plus complexes recréent des modèles de peaux avec des cellules souches pluripotentes induites ou bien à l'aide de la microfluidique. Dans les modèles utilisant les cellules souches pluripotentes induites, les cellules sont prélevées sur un prépuce sain, traitées et réimplantées sur des cellules nourricières dans un milieu de culture spécial. Après quelques jours de culture, des colonies de cellules souches pluripotentes induites apparaissent et peuvent alors être utilisées. De manière très simplifiée, selon les techniques de culture utilisées, les cellules vont se différencier en

fibroblastes, en kératinocytes ou même en mélanocytes. Les différents types de cellules sont ensuite incubées sur une matrice de collagène et après plusieurs jours, le milieu de culture est retiré afin de permettre la stratification de l'épiderme. Après culture, les peaux reconstruites grâce à cette technique sont prêtes à être utilisées **(Gledhill et al. 2015)**.

Les modèles skin on chip sont des cellules cultivées dans un environnement à échelle réduite dans un dispositif microfluidique permettant un contrôle de la ventilation et de la perfusion. Ce modèle est encore très peu utilisé car il est très complexe et très onéreux **(Rademacher et al. 2018)**.

Cependant, malgré les nombreux progrès réalisés depuis quelques années, le plus souvent, seule une souche est utilisée pour étudier le microbiote cutané. Il paraît important à l'avenir de modéliser des modèles où le core microbiote cutané sera mieux pris en compte.

3. Les modèles animaux

a) Microbiote intestinal

L'étude du microbiote intestinal passe également par les modèles *in vivo*. Grâce aux animaux, il est possible d'étudier différents aspects du microbiote tels que sa stabilisation, sa colonisation et sa réponse à la présence de pathogènes **(Williams et al. 2015)**. Le modèle le plus utilisé est le rongeur, mais de nombreuses autres espèces animales peuvent également servir de modèles. Les avantages à utiliser un modèle animal sont nombreux, Bourceau et ses collaborateurs. en ont cité 4 qui ont des restrictions éthiques moins importantes que pour l'Homme, une gestion totale de l'environnement de l'animal, un contrôle génétique des populations et pour finir l'accessibilité au contenu intestinal et aux organes lors des autopsies **(Boureau, L. Hartmann, T. Karjalaine 2000)**. Les modèles les plus utilisés seront présentés ici de manière non exhaustive.

(1) Les modèles animaux simples

Les modèles animaux dits simples vont être représentés par des invertébrés, des insectes ou des petits poissons. Parmi eux, on retrouve le nématode *Caenorhabditis elegans*, la drosophile, l'abeille et le poisson zèbre.

(a) Les invertébrés

C. elegans est un petit nématode utilisé pour l'étude des interactions entre le microbiote intestinal et son hôte. De par sa transparence, il est facile d'observer la colonisation bactérienne au niveau de son tube digestif. La similarité intestinale avec l'humain, en termes de morphologie et de fonctionnalités, a permis l'étude des mécanismes régissant les bactéries composant le microbiote, mais aussi l'effet de ces bactéries sur le métabolisme, le développement, la reproduction, le comportement, la pathogénèse, la réponse du système immunitaire et la durée de vie **(Kumar et al. 2020)**. Ce modèle comporte donc plusieurs avantages, notamment en termes de technique. En effet, les bactéries composant son microbiote intestinal sont facilement cultivables au laboratoire (alpha et gamma protéobactéries), il est facile de créer des animaux axéniques (sans aucun microorganisme), le cycle de vie de ce nématode est connu et facilement maitrisable au laboratoire et il est possible de manipuler génétiquement ce ver **(Douglas 2019)**.

La drosophile se trouve être également un très bon modèle d'étude des interactions entre le microbiote et son hôte. *Drosophila melanogaster peut* servir de modèle pour l'étude du comportement, du métabolisme et du système immunitaire en relation avec le microbiote intestinal **(Douglas 2018)**. Il existe de nombreux outils génétiques à disposition pour cet insecte permettant par exemple de créer des drosophiles axéniques rapidement et à faible coût **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013; Douglas 2018 ; 2019)**. Par ailleurs, les bactéries composant le microbiote de ces petites mouches sont connues et cultivables au laboratoire **(Douglas 2019)**. Cependant le désavantage de ce modèle pourrait être le fait qu'il ne possède pas de système immunitaire adaptatif **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013)**.

L'abeille *Apis mellifera* représente également un modèle d'étude de l'interaction microbiote intestinal-hôte. Tout comme les modèles précédents, les souches qui composent le microbiote intestinal de cet insecte sont connues et faciles d'entretien en culture **(Zheng et al. 2018 ; Douglas 2019)**. Des animaux axéniques peuvent être obtenus mais les manipulations génétiques sur cette abeille restent difficiles. Un des inconvénients majeurs de ce modèle est la nécessité d'installations apicoles spécifiques nécessitant un entretien fastidieux et onéreux **(Douglas 2019)**.

Les modèles d'étude des invertébrés sont des modèles très simples mais essentiels pour comprendre les bases. Leur faible coût, leur facilité d'entretien et de reproduction ainsi que leur charte sur l'expérimentation animale moins stricte que pour les vertébrés ou les humains en font de bons modèles. Cependant, leur anatomie très simple notamment au niveau du tube digestif, leur composition microbienne faible et différente de l'Homme ainsi que l'incapacité à modéliser les

pathologies humaines ont montré la nécessité de trouver des modèles se rapprochant plus de l'Homme **(Ericsson 2019)**.

(b) Le vertébré : le poisson zèbre

Le poisson zèbre est un modèle plus complexe que ceux présentés jusqu'à présent. *Danio rerio* est un des modèles d'études privilégié pour la compréhension de l'axe microbiote intestinal-cerveau **(M. S. de Abreu et al. 2019)**. Il se rapproche un peu plus de ce qui est retrouvé chez l'humain sans en être une copie parfaite. En effet, son tube digestif est composé de tissus épithéliaux en renouvellement constant comme chez l'Homme **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; M. S. de Abreu et al. 2019)**. Par ailleurs, il possède un système immunitaire adaptatif et des similitudes avec notre système endocrinien et neuronal **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; Ericsson 2019)**. Certaines des phyla composant le microbiote intestinal de ce poisson sont communs à ceux des humains (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria) et sont cultivables au laboratoire **(M. S. de Abreu et al. 2019 ; Douglas 2019)**. Ce petit animal comporte beaucoup d'avantages pour l'étude du microbiote intestinal, il est peu onéreux et facile à entretenir **(Douglas 2019)**, sa fécondation est rapide **(Zhao et Pack 2017)** et il représente un bon modèle pour l'étude du syndrome de l'intestin irritable **(M. S. de Abreu et al. 2019)**. Malgré tous ces avantages, il présente également des inconvénients tels que son environnement aquatique, son anatomie très simple et la difficulté à créer des animaux axéniques (long et coûteux) **(Ericsson 2019 ; Douglas 2019)**.

(2) Les modèles animaux complexes

Bien que les modèles simples soient utilisés pour la compréhension de l'interaction microbiote intestinal-hôte, il est nécessaire d'utiliser des modèles plus complexes afin d'appréhender les fonctions, le métabolisme des bactéries composant ce microbiote ainsi que les pathologies qui peuvent lui être associées.

La souris, avec 99% de gènes homologues à l'Homme, est le modèle d'étude le plus utilisé en biologie, y compris dans les l'études sur le microbiote intestinal **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013)**. Les souris sont utilisées comme modèles de pathologies telles que l'obésité, les maladies neurodégénératives, les cancers, l'asthme mais encore aussi pour comprendre certains phénomènes comme l'angiogenèse, la malnutrition, les fonctions hépatiques, la réponse intestinale et sa reconstruction après un traumatisme ou l'immunité adaptative **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; Lundberg 2019)**. En effet, ces animaux sont faciles à manipuler génétiquement (souris transgéniques) en utilisant les techniques de *knock* out et de *knock* in **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; Nguyen et al.**

2015). De plus, il est possible d'utiliser des souris gnotobiotiques, c'est à dire des animaux chez lesquels ont été introduites des souches bactériennes alors que l'animal en était dépourvu. Les souris sont préalablement traitées avec un cocktail antibiotique tuant toutes leurs bactéries, puis isolées pour qu'elles restent stériles (souris axénique ou *Germ free*) **(Tlaskalová-Hogenová et al. 2011 ; Lundberg 2019)**. Par la suite, un microbiote particulier peut leur être inoculé (humain ou non). Grace à cette technique, il est possible de suivre l'implantation des souches bactériennes dans le microbiote intestinal afin par exemple d'étudier l'effet de la colonisation sur le déclenchement et le maintien de pathologies **(Tlaskalová-Hogenová et al. 2011 ; Uzbay 2019)**. En plus de l'inoculation d'un microbiote connu et spécifique, il est également possible de faire varier certains facteurs tels que l'alimentation ou bien les cycles lumineux pour reproduire le mode de vie humain **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; Nguyen et al. 2015)**. Le modèle « murin » avec son coût d'entretien moins élevé que celui de plus gros animaux et sa reproductibilité rapide est ainsi un modèle de choix pour l'étude du microbiote intestinal. Cependant, certains facteurs doivent être pris en compte dans l'analyse des résultats et dans leurs interprétations par rapport à l'Homme, tels que leur anatomie digestive différente et le fait que ces animaux soient coprophages **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; Nguyen et al. 2015)**.

Les porcs miniatures sont également de très bons modèles pour l'étude du microbiote intestinal. En effet, ces animaux ont une physiologie et une taille similaires à l'Homme **(Perleberg, Kind, et Schnieke 2018)**. De plus, les espèces composant son microbiote sont très similaires à celles retrouvés dans notre tube digestif. Grâce à cela, il est possible d'étudier certaines pathologies telles que l'obésité par exemple (les porcs sont nourris avec une alimentation induisant à terme de l'obésité) **(Houpt et PONDb, 1979 ; Spurlock et Gabler 2008)**. Ce sont les seuls animaux à avoir été colonisés à long terme par un microbiote intestinal humain **(Ericsson 2019)**. En effet, après une césarienne, un microbiote intestinal humain a été greffé au porcelet t et s'est stabilisé après quelque temps. Les porcs comportent donc beaucoup d'avantages par leur population importante, la composition de leur microbiote intestinal similaire à celui de l'Homme et la traçabilité génétique. Cependant, ils coûtent très cher à entretenir, des études utilisant de nombreux individus ne sont donc pas possibles **(Ericsson 2019)**.

Le chien peut également servir de modèle pour l'étude du microbiote intestinal. En effet, il possède un tube digestif (et des bactéries) semblable au nôtre et est exposé aux mêmes facteurs environnementaux que les humains (et notamment de leur maitre si c'est un chien de particulier) **(S. J. Song et al. 2013)**. Cet animal est un bon modèle pour l'étude des maladies inflammatoires de l'intestin car il développe la même symptomatologie que l'Homme et répond de manière similaire aux conditions environnementales **(Cerquetella 2010)**. Ce modèle possède cependant des inconvénients,

qui sont le coût de l'hébergement, la génétique difficilement manipulable tant sur le plan technique qu'éthique et, le plus important, la perception du public vis-à-vis de ces animaux **(Ericsson 2019)**.

b) Microbiote cutané

L'étude du microbiote cutané passe également par des modèles animaux et notamment de rongeurs (plus particulièrement les souris). En effet, il est possible de modifier génétiquement une souris aisément pour lui faire exprimer ou sous exprimer des gènes particuliers dans le but de lui induire une pathologie spécifique. Il est également possible d'utiliser la drosophile afin de comprendre les mécanismes de cicatrisation, notamment au niveau des réponses immunitaires qui ont été conservées au cours de l'évolution entre la drosophile et l'Homme **(Bergman, Seyedoleslami Esfahani, et Engström 2017)**.

Comme pour les modèles permettant d'étudier le microbiote cutané *in vitro*, les modèles de souris sont souvent utilisés dans une pathologie spécifique. Certaines souches de souris peuvent notamment être adoptées pour comprendre le lien entre la dermatite atopique et la bactérie *S. aureus*. Il est connu maintenant que le microbiote cutané des patients atteints de dermatite atopique est différent de celui des individus sains, particulièrement au niveau des bactéries à Gram négatif. C'est dans ce contexte que des chercheurs ont prélevé des bactéries à Gram négatif de patients sains qu'ils ont appliqué sur des oreilles de souris, modélisant la dermatite atopique en présence de *S. aureus*. Après quelques jours, ils ont mesuré l'épaisseur de l'oreille par rapport aux souris contrôles. Ils ont alors observé une diminution de l'épaisseur de l'oreille indiquant que les bactéries à Gram négatif pouvaient avoir un rôle dans la fonction de barrière, dans l'activation de l'immunité innée ainsi que dans le contrôle de *S. aureus* **(Myles et al. 2016)**.

D'autres études permettent d'appréhender l'interaction entre *Malassezia* et la peau dans un contexte de dermatite séborrhéique ou atopique. *Malassezia* est le champignon le plus répandu sur la peau mais il arrive qu'il soit responsable d'inflammation plus ou moins sévère. Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont actuellement pas bien élucidés. Pour essayer d'approfondir les connaissances à ce sujet, des chercheurs ont appliqué une suspension de *Malassezia* sur des oreilles de souris et ont observé une augmentation des signes d'infection, une hyperplasie épidermique et dermique (augmentation du nombre de cellules) et le développement d'un œdème **(Sparber et LeibundGut-Landmann 2019)**.

Des modèles de souris mimant le psoriasis peuvent également être utilisés pour comprendre l'implication du microbiote cutané dans cette inflammation cutanée. De la même manière que dans

de nombreuses pathologies cutanées, le microbiote des patients est modifié par rapport aux individus sains. Stehlikova et son équipe ont utilisé des souris mimant le psoriasis grâce à l'imiquimod. Ils ont comparé un traitement antibiotique chez des souris *Germ free* (contrôles) et des souris *Germ free* + imiquimod. Ils n'ont pas observé de différence entre les deux types de souris indiquant que c'est bien la différence de microbiote qui est impliquée dans cette inflammation aggravée par les antibiotiques **(Stehlikova et al. 2019)**.

Bien que les souris soient les animaux de laboratoire les plus utilisés dans la recherche scientifique, elles ne reflètent pas ce qu'il se passe dans le milieu naturel. C'est pourquoi une équipe a mis au point un modèle de souris (croisement entre des souris de laboratoire et des souris sauvages) avec un microbiote ressemblant plus à celui des souris sauvages (interactions sociales, différents environnements, *etc*). Le microbiote de ces souris est stable sur plusieurs générations , ce qui en fait un modèle plus robuste et plus représentatif, il s'agit du modèle wildling **(Rosshart et al. 2019)**.

Cependant, l'étude du microbiote cutané grâce aux souris comporte des inconvénients majeurs **(Rademacher et al. 2018)**. La première est l'éthique. En effet, s'il est possible de se passer d'un modèle animal pour une recherche scientifique et de le remplacer par un modèle *in vitro* tout aussi performants, il faut privilégier l'approche *in vitro*. Le deuxième inconvénient est que la peau de la souris ne comporte que 30% de gènes homologues à celle de l'Homme **(Gerber et al. 2014)**. Emmert *et al.* émettent l'hypothèse que c'est peut-être pour cela que les résultats observés sur les souris ne sont pas toujours transposables à l'Homme. Les souris auraient évolué pour être en harmonie avec leur microbiote cutané et non avec celui des humains **(Emmert et al. 2020)**.

Ainsi, chacun des modèles pour l'étude du microbiote intestinal ou cutané mentionnés comporte des avantages et des inconvénients. Il est, à ce jour, impossible de créer un modèle reflétant à l'identique le microbiote intestinal ou bien le microbiote cutané, les connaissances scientifiques actuelles ne permettant pas de réaliser un modèle équivalent à ce qui est retrouvé chez l'Homme. De plus, la plupart de ces modèles ne peuvent pas être utilisés à long terme (au-delà de quelques jours).

C. Microbiotes et xénobiotiques

Un xénobiotique se définit comme une molécule étrangère présente dans l'organisme et pouvant être toxique. Nous savons maintenant que certains xénobiotiques peuvent avoir des effets délétères sur les bactéries composant nos microbiotes, c'est le cas par exemple des antibiotiques **(P. Zimmermann et Curtis 2019a)**. Nous savons également que les souches bactériennes peuvent métaboliser certains xénobiotiques afin, par exemple, de les rendre inactifs. C'est le cas dans

l'interaction entre la bactérie intestinale *Eggerthella lenta* et la digoxine **(Haiser et al. 2014)**. Dans ce chapitre, nous aborderons quelques exemples de l'effet de xénobiotiques sur les microbiotes intestinal et cutané ainsi que des exemples de souches bactériennes capables de métaboliser ces xénobiotiques.

1. Effets des xénobiotiques sur le microbiote

De nombreuses études analysent l'impact des xénobiotiques sur les microbiotes ainsi que sur des souches spécifiques qui les composent. Les xénobiotiques peuvent être principalement divisés en 3 classes : pharmaceutiques, alimentaires et environnementaux. Une dernière classe peut être ajoutée en ce qui concerne le microbiote cutané, les cosmétiques.

a) Les molécules pharmaceutiques

Bien que les antibiotiques soient essentiels en médecine, il n'est pas rare que leur utilisation entraine des effets secondaires indésirables tels que des douleurs abdominales, des diarrhées ou des vomissements, en partie dus à la modulation des souches du microbiote intestinal provoquant des dysbioses plus ou moins importantes. Après une prise d'antibiotiques, on note généralement une perte de la diversité chez les Bacteroidetes et les Firmicutes et une augmentation des Entérobactéries **(Young et Schmidt 2004 ; Lange et al. 2016)**. Cette perte de diversité est souvent accompagnée d'une modification des capacités métaboliques des souches du microbiote mais aussi d'une augmentation des transferts de gènes horizontaux, d'une sélection de bactéries résistantes et intrusives du fait de niches naturelles devenues libres **(Modi, Collins, et Relman 2014 ; Lange et al. 2016)** (FIGURE 13). L'avènement des techniques de séquençage a permis de nombreuses études concernant l'effet des antibiotiques sur la composition du microbiote intestinal. Par exemple, en séquençant les régions hypervariables de l'ARNr 16S d'un échantillon de selles, il a été montré qu'un traitement à la ciprofloxacine chez un individu sain avait induit un changement de composition microbienne et une perte de diversité dans les 3 jours suivant la prise. Les auteurs ont également observé qu'une semaine après l'arrêt du traitement, le microbiote intestinal se stabilisait mais restait tout de même différent **(L. Dethlefsen et Relman 2011)**. Lors d'un traitement par beta lactamines, Pérez-Cobas et son équipe ont mis en évidence une diminution des bactéries à Gram négatif au bout de 6 jours. Ils ont ensuite observé une diminution globale de la diversité bactérienne après 11 jours de traitement pour enfin noter que les bactéries à Gram positif recolonisaient le microbiote intestinal 14 jours après arrêt du traitement **(Pérez-Cobas et al. 2013)**.

Les antibiotiques utilisés par voie orale sont de plus en plus étudiés pour leurs effets sur le microbiote intestinal. Cependant, très peu d'études portent sur l'impact de l'application locale de cette famille thérapeutique sur le microbiote cutané. Une étude a démontré que les antibiotiques appliqués sur la peau provoquent un changement dans la composition microbienne perdurant plusieurs jours après l'application. Les auteurs ont mis en évidence une diminution des souches commensales de staphylocoques en présence d'antibiotiques, et à moindre échelle en présence d'antiseptiques, laissant l'opportunité à des espèces pathogènes (*S. aureus*) de s'implanter **(SanMiguel et al. 2017)**.

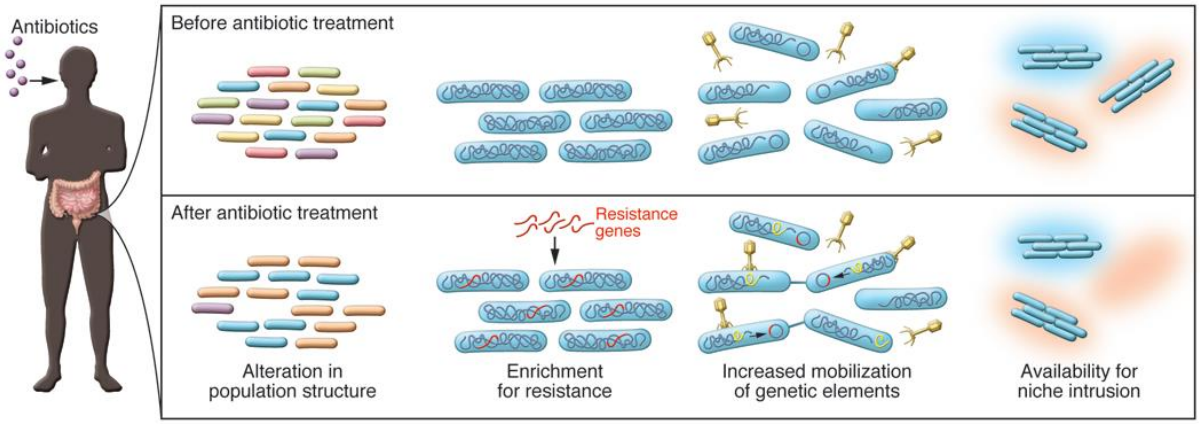


Figure 13 : Effet des antibiotiques sur le microbiote intestinal (Modi, Collins, et Relman 2014)

Bien que les antibiotiques soient les médicaments les plus connus pour affecter la composition du microbiote intestinal, d'autres thérapeutiques peuvent également agir sur ce microbiote. Il a par exemple été démontré que la prise d'irinotecan, un anti-cancéreux, augmentait de manière significative l'abondance de bactéries productrices de Beta glucuronidases. Parmi ces espèces, on retrouve *E. coli,* des espèces appartenant aux staphylocoques ou bien aux *Clostridium* capables de métaboliser l'irinotecan en SN-38, composé toxique **(Stringer et al. 2009)**.

Le goudron de houille, un traitement utilisé dans la dermatite atopique peut diminuer la colonisation par *S. aureus* et augmenter celle de C*. acnes* permettant au microbiote cutané de retrouver un état plus équilibré et donc de limiter les symptômes **(Smits et al. 2020)**. En 2018, des chercheurs ont analysé par séquençage de l'ARN 16S bactérien le microbiote cutané de nourrissons de 6 mois ayant des antécédents de dermatite atopique et traités ou non avec des émollients. Les enfants traités par l'émollient présentaient une diversité bactérienne plus élevée et un pH cutané plus bas **(Glatz et al. 2018)**.

b) Les molécules alimentaires

Il est maintenant de notoriété publique que des métaux lourds se cachent dans notre alimentation. Parmi eux, le mercure, retrouvé notamment dans les poissons et impliqué dans de nombreux troubles métaboliques **(Tinkov et al. 2015)**. Une étude de 2010 s'est intéressée au microbiote intestinal de l'isopode *Porcellio scaber* par analyse du gène de l'ARN 16S et a permis de noter une diminution des Bacteroidetes mais une augmentation des Actinobactéries, des Betaproteobactéries et des Alphaprotéobactéries chez les crustacés évoluant dans un environnement pollué au mercure **(Lapanje et al. 2010)**. Bien que réalisé sur un modèle animal, cette étude laisse penser que ce métal peut modifier la composition du microbiote intestinal, engendrant à terme dysbioses et troubles métaboliques.

L'alimentation industrielle regorge de molécules permettant d'exhausser le goût des aliments, de les conserver plus longtemps ou bien même de transformer leur structure. Le xylitol est un additif alimentaire utilisé en remplacement du sucre. Une étude menée chez la souris a montré une diminution des *Bacteroides* et une augmentation des Firmicutes et des *Prevotella* quand l'animal a été nourri avec du xylitol à faible dose **(Uebanso et al. 2017)**. En 2017, une équipe américaine a étudié l'effet d'un conservateur alimentaire sur le microbiote intestinal d'un modèle de souris, la polylysine. Ils ont mis en évidence une perturbation transitoire du microbiote intestinal chez les souris hydratées avec une eau supplémentée en polylysine **(You et al. 2017)**.

c) Les molécules environnementales

Nos organismes sont en contact étroit avec l'environnement et la pollution peut entraîner des effets néfastes sur la santé : cancers broncho-pulmonaires, asthme, hypertension artérielle et pathologies digestives **(Lu, Mahbub, et Fox 2015)**. Cette pollution peut également agir sur le microbiote intestinal. En 2020, des chercheurs américains ont évalué l'effet de l'ozone (O_3) et du dioxyde d'azote (NO_2) atmosphériques sur le microbiote intestinal de jeunes adultes californiens par un séquençage complet de leur génome fécal. Ils ont observé une diminution de la diversité bactérienne et une augmentation de *Bacteroides caecimuris* lorsque les individus sont exposés à des taux d'O_3 élevés. Par ailleurs, une exposition importante au NO_2 a été associée à une diminution de la diversité bactérienne et une abondance en Firmicutes augmentée **(Fouladi et al. 2020)**. Une autre étude a montré que l'exposition au benzo[a]pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique, entrainait une inflammation intestinale ainsi qu'un changement dans la composition du microbiote chez un modèle de souris **(Ribière et al. 2016)**. En 2014, des chercheurs ont mis en évidence que les

particules aéroportées urbaines ingérées *via* des aliments contaminés modifient la composition du microbiote intestinal murin **(Salim, Kaplan, et Madsen 2014)**.

d) Les cosmétiques

Les cosmétiques sont une source importante de xénobiotiques entrant en contact avec les bactéries composant le microbiote cutané. Tous ces produits appliqués sur la peau vont modifier son pH et/ou son hydratation modulant ainsi le microbiote et pouvant mener à des dysbioses. Par exemple, la modification du pH de la peau, initialement acide (environ pH 5), peut permettre aux bactéries pathogènes telles que *S. aureus* de se développer. En effet, le pH idéal pour les bactéries commensales du microbiote cutané, comme *S. epidermidis*, est de 5,5. A un pH neutre, leur croissance est inhibée laissant l'opportunité aux bactéries pathogènes de s'implanter **(Blaak et Staib 2018)**. L'hydratation de la peau va également moduler le microbiote cutané. Une étude de 2018 a comparé l'état d'hydratation de la peau et la diversité bactérienne avant et après application de produits cosmétiques. Les auteurs ont observé une diversité bactérienne plus importante chez les individus ayant une peau faiblement hydratée et encore supérieure après application des produits. Ils ont notamment noté qu'après utilisation de cosmétiques, les *Propionibacterium*, *Staphylococcus* et les *Corynebacterium* étaient diminués contrairement à *Ralstonia,* qui avait augmenté de manière significative **(H. J. Lee et al. 2018)**. Les produits cosmétiques sont composés de différents ingrédients dont des conservateurs, indispensables pour éviter l'altération des produits, mais pouvant impacter le microbiote cutané. Une étude récente a montré que 5 des conservateurs couramment utilisés (le méthylisothiazolinone, l'iodopropynyl butylcarbamate, l'éthylhexylglycérine, le méthylparabène et le phénoxyéthanol) inhibent, aux concentrations maximales autorisées en Chine, la croissance de souches provenant d'individus sains **(Q. Wang et al. 2019)**. Une étude a démontré que le déodorant et une poudre déodorante pour les pieds augmentent la diversité bactérienne alors qu'une crème hydratante pour le visage et une lotion n'avaient que peu d'impact sur la diversité microbienne **(Bouslimani et al. 2019)**. Un autre travail a évalué l'impact du déodorant et des anti-transpirants sur les bactéries du microbiote de la peau. Si la population bactérienne reste stable en quantité, sa composition est différente et est modifiée dès que les habitudes d'utilisation changent. En effet, la richesse bactérienne devient plus importante lors de l'utilisation d'un déodorant et l'emploi d'un anti-transpirant augmente l'abondance en Actinobactéries **(Callewaert et al. 2014)**. Par ailleurs, un essai clinique a mis en avant qu'un sérum riche en galacto-oligosaccharides diminuait l'abondance de *S. aureus* et augmentait la diversité générale et notamment des *Pediococcus* **(Hong et al. 2020)**. Le maquillage a également un impact sur les communautés bactériennes de la peau. Une étude a mis en évidence une augmentation de la

diversité bactérienne en présence notamment de fond de teint liquide ou en poudre **(Staudinger, Pipal, et Redl 2011)**. Bien que tous les effets des ingrédients contenus dans les cosmétiques ne soient pas complétement connus, il est certain qu'en modifiant le pH ou bien l'hydratation de la peau, les xénobiotiques modulent indirectement le microbiote cutané **(Fournière et al. 2020)**.

2. Effet des microbiotes sur les xénobiotiques

Les souches composant les microbiotes intestinal ou cutané sont capables de métaboliser les xénobiotiques qu'elles rencontrent. Pour certaines de ces métabolisations, on connait les microorganismes ou les genres bactériens mis en jeu. A ce jour, environ 300 molécules sont connues pour être métabolisées par le microbiote intestinal **(M. Zimmermann et al. 2019b)**. Cette métabolisation peut induire une inactivation, une activation ou même une réactivation de la molécule **(Collins et Patterson 2020)**. L'exemple le plus connu est celui de la digoxine (FIGURE 14). Ce médicament, utilisé dans les pathologies cardiaques, est métabolisé par la bactérie *E. lenta*. Si la forme active entre en contact au niveau du microbiote intestinal avec la bactérie qui possède une réductase spécifique (cardiac glycoside reductase), la molécule va être réduite en dihydrodigoxine inactive, **(Haiser et al. 2014 ; Lu, Mahbub, et Fox 2015)**.

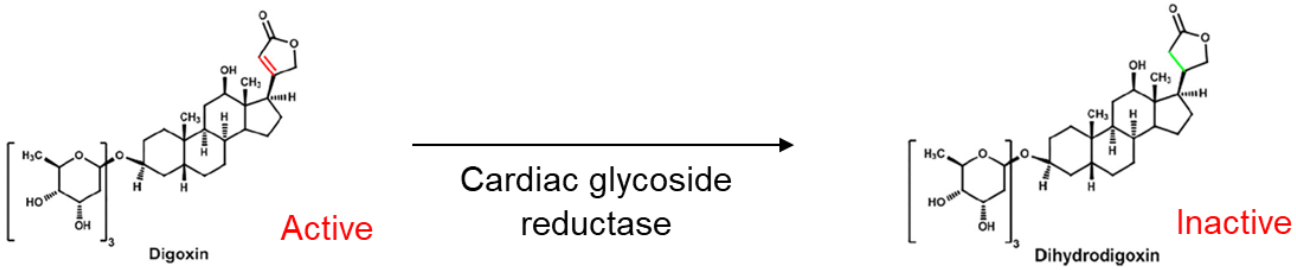


Figure 14 : Métabolisme de la digoxine par la bactérie *E. lenta*

Le microbiote intestinal peut également permettre l'activation d'une prodrogue en une molécule active. C'est le cas pour la lovastatine par exemple. Cet hypocholestérolémiant de la famille des statines est donné au patient sous forme de prodrogue (médicament inactif) et serait converti en forme active par le microbiote intestinal **(Yoo et al. 2014 ; Enright et al. 2016)**. Cependant, le rôle du microbiote dans cette activation semble controversé. En effet, les souches responsables n'ont pas été identifiées et une étude de 2019 a montré qu'en présence d'un inoculum fécal, la prodrogue n'était pas plus activée que sans cet inoculum **(Beltrán et al. 2019)**.

La sulfasalazine est un anti-inflammatoire intestinal clivé par les bactéries du microbiote intestinal. Ce clivage induit la formation de deux métabolites, l'acide 5-aminosalicylique et la sulfapyridine qui est toxique. Pour limiter les effets secondaires dus à la sufapyridine une autre molécule a été mise sur le marché, l'olzalasine. Néanmoins ce médicament est également associé à des effets secondaires à type de diarrhée chez 15% des individus **(M., Thawabteh, et Karaman 2014)**.

Certaines espèces du microbiote intestinal sont capables de réactiver une molécule après une première phase d'inactivation par une autre espèce ou par le foie. C'est notamment le cas dans le métabolisme de l'irinotecan, anti-cancéreux utilisé dans la prise en charge des cancers colorectaux. Administré aux patients par voie intraveineuse, il est ensuite métabolisé en SN-38 qui est la forme active puis en SN-38G (par glucoconjugaison) et éliminé par excrétion biliaire et rénale. Le SN-38G éliminé par voie biliaire se retrouve au contact du microbiote intestinal et peut être ainsi réactivé sous la forme active SN-38 provoquant diarrhées, nausées et neutropénie **(Wilson et Nicholson 2017)**. Bien que l'on sache que le microbiote joue un rôle dans cette réactivation, à l'heure actuelle, les bactéries mises en jeu ne sont pas encore identifiées **(Panebianco, Andriulli, et Pazienza 2018)**.

Les exemples mentionnés ci-dessus sont les plus retrouvés dans la littérature. Cependant, dans la grande majorité des cas, les bactéries en cause restent inconnues. Il existe néanmoins des exemples de métabolisation des xénobiotiques par les bactéries du microbiote intestinal où ces dernières sont identifiées **(TABLEAU 2)**. Par exemple, le paracétamol ou acétaminophène, un antalgique, est transformé en acétaminophène sulfate et en glucuronide par la bactérie *C. difficile* entrainant une diminution de l'activité antalgique et une augmentation de la toxicité **(H. Li, He, et Jia 2016)**. Le levamisole, antiparasitaire utilisé en médecine, est dégradé par des *Bacteroides* et des *Clostridium* en trois métabolites qui augmentent alors l'activité du médicament **(Shu et al. 1991)**. La méthamphétamine, un stimulant sympathomimétique, est déméthylée par des bactéries des genres Lactobacille, Entérocoque et *Clostridium* en métabolites, dont l'amphétamine et la noréphédrine moins actifs que la molécule primaire **(Caldwell et Hawksworth 1973)**. Nous pouvons également citer l'oméprazole, utilisé pour réduire les sécrétions acides de l'estomac, qui est réduit en métabolites sulfides moins actifs par les bactéries de type Bacteroidetes **(Watanabe et al. 1995)**.

Bien que ces exemples concernent des médicaments, il existe aussi d'autres classes de xénobiotiques pouvant être métabolisés par le microbiote intestinal. C'est le cas du MeIQx ou 2-amino-3,8 diméthylimidazo[4,5-f]quinoxaline. Cette molécule, associée au risque de cancer colorectal, est produite lors de la cuisson de la viande rouge et est métabolisée en MeIQx-M1, moins toxique. Dans ce cas, le microbiote intestinal jouerait un rôle protecteur contre le cancer colorectal **(J. Zhang et al. 2017)**.

La métabolisation des xénobiotiques par les bactéries du microbiote intestinal est plus documentée que celle concernant les souches du microbiote cutané. En effet, les principales informations à propos des xénobiotiques et de la peau sont celles recueillies à partir de modèles de peau reconstruite sans prise en compte des bactéries **(Gibbs et al. 2007 ; Götz et al. 2012 ; Wiegand et al. 2014 ; Kazem, Linssen, et Gibbs 2019)**. A notre connaissance, une seule publication a étudié l'influence du microbiote cutané sur le métabolisme de la peau. Pour cela, les auteurs ont utilisé un modèle de peau reconstruite en 3D et ajouté des cultures uniques de deux bactéries commensales de la peau, que sont *Micrococcus luteus* et *Pseudomonas oleovorans*. A l'aide d'une analyse transcriptomique, ils ont montré que le métabolisme de certains cytochromes est augmenté lorsque le modèle de peau est colonisé par les bactéries **(Lemoine et al. 2020)**.

Tableau 2 : Tableau regroupant les xénobiotiques métabolisés par le microbiote intestinal (d'après Sousa et al. 2008 ; Klaassen et Cui 2015 ; Lu, Mahbub, et Fox 2015 ; Enright et al. 2016 ; Jourova, Anzenbacher, et Anzenbacherova 2016 ; Koppel, Maini Rekdal, et Balskus 2017 ; Currò 2018 ; Clarke et al. 2019 ; Sun, Chen, et Shen 2019)

Molécule	Utilisation	Métabolisé par quoi/qui (si connu)	Mécanisme	Métabolites	Effet / Commentaires
Acide 5-Aminosalicylique	Anti-inflammatoire		Acétylation	N-acétyl-5-aminosalicyclique	Métabolite actif de la sulfasalazine, balsalazide et alsalazine
Acide caféique	Alimentaire		Réduction et déhydoxylation	acide *m-Hydroxyphenylpropanoic*	
Acide linoléique	Alimentaire	Linoleate isomerase (Lactobacille)	Conjugation		Production d'acide linoléique conjugué à partir de produits alimentaires
Acide Oléique	Alimentaire	N-acyl synthase	Acylation		
Amiodarone	Antiarythmique de classe III	*E. coli* Nissle 1917			Augmente la biodisponibilité
Calcitonine	Hormone calciotropique		Protéolyse		Diminution de la biodisponibilité et de l'activité
Carnitine	Alimentaire	Carnitine oxygenase	Oxidation/Réduction		Production de TMA, associée avec l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires à la suite production hôte de TMAO
Chloramphenicol	Antibiotique	Bactéries coliformes	Formation d'amines et hydrolyse de la liaison amide	*p-aminophényl-2-amin-1,3-propanediol*	Métabolite actif (risque d'aplasie de la moelle)
Choline	Alimentaire	Choline TMA-lyase	Oxydation	TMA	TMA, associée avec l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires à la suite production hôte de TMAO

Molécule	Utilisation	Métabolisé par quoi/qui (si connu)	Mécanisme	Métabolites	Effet / Commentaires
Diclofenac	Anti-inflammatoire non stéroïdien	β glucuronidase	Déglucuronidation	diclofenac glucuronide	Retarde l'élimination et augmente la toxicité (régénération du SN-38)
Digoxine	Antifibrillation	*E. lenta* (cardiac glycoside reductase)	Réduction	di-hydrodigoxine	Diminution de la biodisponibilité et de l'activité
Indométacine	Anti-inflammatoire non stéroïdien	β glucuronidase	Déglucuronidation		Elimination retardée et augmentation de la toxicité
Insuline	Anti-diabétique	Protease	Protéolyse		Diminution de la biodisponibilité et de l'activité
Irinotecan	Anticancéreux colorectal	β glucuronidase (*E. coli*, *B. vulgatus*, *C. ramosum*)	Hydrolyse glucuronide	Transformation du SN-38 glucuronide en SN 38	Toxicité
Ketoprofène	Anti-inflammatoire non stéroïdien	β glucuronidase	Déglucuronidation		Elimination retardée et augmentation de la toxicité
Lactulose	Anticonstipation	*E. coli, B. bifidum, L. acidophilus, C. perfringens*	Hydrolyse	fructose + galactose puis en acide lactique et acétique	Diminution du pH intestinal
L-Dopa	Traitement de la maladie de Parkinson		Decarboxylation	*m-tyramine* et l'acide *m-hydroxyphénylacétique*	
Lévamisole	Anthelmique	Bacteroidetes, *Clostridium spp*	Ouverture du cerle thiazole	levametabol-i, levametabolii et levametabol-iii	

Molécule	Utilisation	Métabolisé par quoi/qui (si connu)	Mécanisme	Métabolites	Effet / Commentaires
Lévodopa	Anti-parkinson	Acide amino decarboxylase (*H. pylori*)	Decarboxylation / Dehydroxylation	dopamine + *m-Tyramine*	Diminution de la biodisponibilité et de l'activité
Lopéramide	Anti-diarrhéique		Réduction		Activation de la prodrogue
Lovastatine	Anti cholestérolémiant	acide β-hydroxy	Hydroxylation	acide 2-hydroxy lovastatique	Le métabolite est actif
Mélamine	Alimentaire		Hydrolyse	acide cyanurique	Le métabolite cocristallise avec de la mélamine dans reins
Metronidazole	Antibiotique	*C. perfringens*	Réduction	acide N-(2-hydroxyéthyl)-oxamique et acétamide	
Nabumétone	Anti inflammatoire non stéroïdien	acide 6-méthoxy-2-naphtylacétique	Clivage oxydatif		Diminution de la biodisponibilité
Nitrazepam	Hypnotique	Nitroreductase	Réduction	7-Aminonitrazepam	Teranogénicité chez les rats
Olsalazine	Anti-inflammatoire	Azoreductase bactérienne	Azoréduction	2 molécules d'acide 5-aminosalicylique	Activation de la prodrogue active
Oméprazole	Anti-reflux gastro oesophagien	Bactéries anaérobies telles que les espèces de *Bacteroides*	Réduction	2-sulfamoylacetylphénol	
Paracétamol	Analgésique et antipyrétique	*p-cresol* produits par des bactéries comme *C.difficile*	Sulfonation	sulfate de *p-crésol* et phénylacétylglutamine	Le sulfate de p-crésol est toxique
Prontosil	Antibactérien	Azoreductase	Clivage enzymatique de la liaison azoïque à sulfanilamide		Activation de la prodrogue

Molécule	Utilisation	Métabolisé par quoi/qui (si connu)	Mécanisme	Métabolites	Effet / Commentaires
Rispéridone	Antipsychotique		Scission du cerle isoxazole	dihydroxy-rispéridone et hydroxyl-cétorispéridone chez les rats	
Sorivudine	Antiviral	Phosphorylysases des Bacteroidetes ou des Enterobactéries (*Klebsiella pneumoniae*)	Hydrolyse	Bromovinyluracil	Inhibition irréversible du métabolisme du 5-fluorouracile, augmentation de la toxicité
Sulfasalazine	Antibactérien	Azoreductase	Azoréduction	acide 5-aminosalicyclic + sulfapyridine	Toxicité accrue due à la sulfapyridine
Zonisamide	Anti-epileptique	*C. sporogenes*, *B. bifidum*, *B. vulgatus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. fluorescens*, *L. rhamnosus*, *S. faecalis*, *L. acidophilus*, *C. perfringens*	Réduction	2-sulphamoylacetylphénol	

LES BUTS DE LA THÈSE

D. Les buts de la thèse

Les buts de ces travaux de thèse ont été de réaliser un modèle simple de microbiote intestinal et cutané *in vitro* afin d'appréhender l'effet de différents xénobiotiques sur ces microbiotes reconstitués, ainsi que sur les souches les composant. Pour cela plusieurs étapes ont été mises en œuvre. La première a d'abord visé à sélectionner les souches allant composer nos modèles de microbiotes et à choisir un milieu unique permettant leur croissance. La seconde étape de nos travaux a consisté en la détermination de la sensibilité de chaque souche de manière individuelle aux xénobiotiques sélectionnés, par des méthodes classiques de culture, puis par une approche métagénomique pour déterminer l'impact des xénobiotiques sur l'abondance des souches du microbiote reconstitué *in vitro*.

En ce qui concerne le microbiote intestinal, nous avons recherché à mettre en place un modèle stable comprenant un maximum de souches composant le core microbiote intestinal décrit dans la littérature.

A côté du volet microbiologique, il était également primordial d'étudier l'effet des souches, isolément ou non, sur la structure des molécules testées à l'aide de la méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Ces travaux ont été menés dans la perspective de disposer de modèles simplifiés de microbiotes utilisables dans le développement de molécules en permettant l'appréciation rapide et reproductible des interactions entre microorganismes représentatifs et xénobiotiques

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. Matériels et méthodes

A. Souches, milieux, conditions de culture et réactifs utilisés

1. Souches, milieux et conditions de culture

a) Souches

Les souches utilisées dans ce travail sont listées dans le TABLEAU 3. Elles ont été acquises auprès des sociétés *American Type Culture Collection* (ATCC) et *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) ou bien isolées de patients. Concernant le microbiote cutané, c'est le cas des souches dites « surface » et « profonde » qui sont des souches cliniques isolées de patients du CHU de Poitiers, France. Les souches « surface » ont été prélevées à la surface de la peau au niveau d'avant-bras d'individus sains. Les souches « profonde » ont été isolées de prothèses de hanches infectées. Après une première culture dans le milieu recommandé par le fournisseur (en ce qui concerne les souches commerciales), chaque souche a été stockée en cryotube en glycérol 50% final pour les souches anaérobies ou 30% final pour les souches aérobies à -80°C avant utilisation.

Tableau 3: Souches utilisées lors de cette étude

	No accession	Souches	Phyla	Gram
Microbiote intestinal	ATCC 8482	*Bacteroides vulgatus*	Bacteroidetes	Gram -
	Clinical strain	*Bacteroides thetaiotaomicron*	Bacteroidetes	Gram -
	DSMZ 6597	*Bacteroides uniformis*	Bacteroidetes	Gram -
	DSMZ 2151	*Bacteroides fragilis*	Bacteroidetes	Gram -
	DSMZ 19024	*Bacteroides caccae*	Bacteroidetes	Gram -
	ATCC 43860	*Bacteroides fragilis*	Bacteroidetes	Gram -
	ATCC 8483	*Bacteroides ovatus*	Bacteroidetes	Gram -
	DSMZ 19495	*Parabacteroides merdae*	Bacteroidetes	Gram -
	DSMZ 20701	*Parabacteroides distasonis*	Bacteroidetes	Gram -
	DSM 18205	*Prevotella copri*	Bacteroidetes	Gram -
	DSMZ 20712	*Odoribacter splanchnicus*	Bacteroidetes	Gram -
	ATCC 8739	*Escherichia coli*	Proteobacteria	Gram -
	DSMZ 2687	*Raoultella terrigena*	Proteobacteria	Gram -
	ATCC 49260	*Bilophila wadsworthia*	Proteobacteria	Gram -
	DSMZ 15643	*Fusobacterium nucleatum*	Fusobacteria	Gram -
	DSMZ 22959	*Akkermansia muciniphila*	Verrucomicrobia	Gram -
	ATCC 27756	*Ruminococcus torques*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 27210	*Ruminococcus albus*	Firmicutes	Gram +

	ATCC 29149	*Ruminococcus gnavus*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 49949	*Ruminococcus flavefaciens*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 27255	*Ruminococcus bromii*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 1402	*Clostridium ramosum*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 753	*Clostridium leptum*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 15670	*Clostridium bolteae*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 11782	*Clostridium perfringens*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 2544	*Clostridium saccharolyticum*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 27543	*Clostridioides difficile*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 27751	*Eubacterium hallii*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 33656	*Eubacterium rectale*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 3376	*Eubacterium eligens*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 20617	*Streptococcus salivarius*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 6778	*Streptococcus parasanguinis*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 2008	*Veillonella parvula*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 25238	*Blautia obeum*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 27758	*Coprococcus comes*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 27768	*Faecalibacterium prausnitzii*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 19433	*Enterococcus faecalis*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 16839	*Roseburia hominis*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 3992	*Dorea formicigenerans*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 14610	*Roseburia intestinalis*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 20219	*Bifidobacterium longum*	Actinobacteria	Gram +
	DSMZ 20083	*Bifidobacterium adolescentis*	Actinobacteria	Gram +
	DSMZ 3979	*Collinsella aerofaciens*	Actinobacteria	Gram +
	DZMZ 2243	*Eggerthella lenta*	Actinobacteria	Gram +
	ATCC 29213	*Staphylococcus aureus*	Firmicutes	Gram +
	ATCC 12228	*Staphylococcus epidermidis*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 20328	*Staphylococcus hominis*	Firmicutes	Gram +
	DSMZ 20263	*Staphylococcus haemolyticus*	Firmicutes	Gram +
Microbiote cutané	clinical, surface 1	*Staphylococcus epidermidis S1*	Firmicutes	Gram +
	clinical, surface 2	*Staphylococcus epidermidis S2*	Firmicutes	Gram +
	clinical, surface 3	*Staphylococcus epidermidis S3*	Firmicutes	Gram +
	clinical, surface 4	*Staphylococcus epidermidis S4*	Firmicutes	Gram +
	clinical, surface 5	*Staphylococcus epidermidis S5*	Firmicutes	Gram +
	clinical, profond 1	*Staphylococcus epidermidis P1*	Firmicutes	Gram +
	clinical, profond 2	*Staphylococcus epidermidis P2*	Firmicutes	Gram +
	clinical, profond 3	*Staphylococcus epidermidis P3*	Firmicutes	Gram +
	clinical, profond 4	*Staphylococcus epidermidis P4*	Firmicutes	Gram +

b) Milieux et conditions de culture

(1) Microbiote intestinal

Différents milieux de cultures liquides et gélosés ont été testés pour la culture des souches. Parmi eux, le milieu Columbia au sang, le milieu TSB (Bouillon Tryptone Soja), le milieu TSB au sang, le

milieu Yeast-Peptone (PY), le milieu PY complété avec du glucose et de la cystéine, le milieu Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), le milieu modifié Gifu anaerobic medium (mGam), le milieu Schaedler et le milieu Brain Heart Infusion (BHI). Celui qui a permis la culture d'un plus grand nombre de souches est le milieu mGam **(Maier et al. 2018)**, il a donc été choisi pour les expérimentations, complété avec 0.01% (v/v) de résazurine comme indicateur d'anaérobiose. Le milieu liquide est préparé selon les recommandations du fournisseur, l'oxygène est réduit par chauffage et le milieu est ensuite autoclavé à 121°C durant 15 min. Il est distribué sous flush d'azote dans des tubes de culture ensuite introduits dans la chambre anaérobie (Bactron 300, Blanc Labo, Suisse) au moins 48h avant utilisation. Le milieu gélosé est également préparé selon les recommandations du fournisseur et coulé en aérobiose. Les boites de Pétri sont ensuite insérées dans l'enceinte anaérobie 48h avant utilisation. Le pH final du milieu est de 7,3. Toutes les cultures bactériennes ont eu lieu en anaérobiose à 90% N_2, 5% H_2 et 5% CO_2. Les cultures utilisées pour réaliser le modèle de microbiote reconstitué ont été réalisées à l'aide d'une rampe à azote. Les cultures ont été réalisées dans des flacons Pénicilline à côté d'un bec benzen, pour maintenir la stérilité, et avec des seringues dans un milieu mGam où l'oxygène a été réduit par chauffage. Les cultures sont ensuite flushés avec de l'azote avant d'être incubées.

(2) Microbiote cutané

Les souches du microbiote cutané ont été repiquées sur gélose Lysogeny Broth (LB) à pH 5 **(Elias 2007**) et incubées entre 24h et 48h à 30°C selon les souches. Avant chaque expérience, des précultures sont effectuées dans 5 mL de LB à pH 5 dilué au ½ (LB ½) avec de l'eau distillée stérile et incubées durant une nuit à 30°C en aérobiose.

2. Réactifs utilisés

Toutes les molécules utilisées lors de ces travaux ont été fournies par Sigma-Aldrich, resuspendues aux concentrations recommandées par le fournisseur en DMSO puis en mGam pour les xénobiotiques testés sur les souches du microbiote intestinal et stockées à -20°C. Les molécules sont présentées dans le TABLEAU 4.

Tableau 4 : Tableau des xénobiotiques utilisés durant cette étude

		Groupe	Classification	Désignation	Concentration
Microbiote intestinal	Médicaments	**Antibiotiques**	β-lactames	Cefpodoxime	2.34 µM
				Amoxicilline	5,4 µM
			Quinolone	Moxifloxacine	2.49 µM
			Macrolide	Erythromycine	2.04 µM
			Sulfonamide et Triméthoprime	Triméthoprime (TMP)	6.89 µM
				Sulfaméthoxazole (SMT)	7.90 µM
				Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (STX)	SMT 7. 90 µM + TMP 6.89 µM
			5 nitro-imidazolé	Métronidazole	8.76 µM
		Cardiologie - Angiologie	Bêta-bloquant	Bisoprolol	5.00 µM
			Inhibiteur calcique	Nisoldipine	5.00 µM
				Nifédipine	5.00 µM
		Oncologie- Hématologie	Anticancéreux	Topotecan	5.00 µM
				Mercaptopurine	5.00 µM
				Irinotecan	3,41 µM
			Anticoagulant	Warfarin	8.11 µM
		Hépatologie-Gastroentérologie		Olsalazin	6.62 µM
				Oméprazole	8.69 µM
				Hespéridine	0.82 µM

Microbiote cutané	**Xénobiotiques**	**Antalgique**		Acétaminophène	5.00 µM
		Anti inflammatoires non stéroïdiens		Diclofénac sodium	5.00 µM
				Acéclofénac	5.00 µM
		Allergie	Antihistaminique	Fexofénadine hydrochloride	5.00 µM
		Antidépresseur	Traitement des troubles obsessionnels compulsifs	Clomipramine chlorhydrate	5.00 µM
		Métabolisme - Nutrition		Acide ascorbique (vitamine C)	5.00 µM
		Conservateurs		Méthylparabène	5.00 µM
				Propylparabène	5.00 µM
				Butylparabène	5.00 µM
		Pesticides		Glyphosate	5.00 µM
				Boscalid	5.00 µM
				Difénoconazole	5.00 µM
				Fludioxonil	5.00 µM
				Pyriméthanil	5.00 µM
		Provenant de l'industrie plastique		Bisphénol A	5.00 µM
				Di-isobutyl phthalate	5.00 µM
				Solution de di-n-butyl phthalate	5.00 µM
				Dioctyl phthalate	5.00 µM
	Perturbateurs endocriniens	**Conservateurs**		Methylparabène	1 mM
				Ethylparabène	1 mM
				Propylparabène	100 µM

B. Sensibilité des souches aux xénobiotiques

1. Microbiote intestinal

La FIGURE 15 indique le schéma expérimental utilisé pour déterminer la sensibilité de 36 des 39 souches du panel représentant le core microbiote intestinal (trois souches ne s'étant pas développées quand elles sont cultivées seules dans le milieu mGam dans nos conditions d'anaérobiose) vis-à-vis de 36 xénobiotiques. Pour cela, chaque souche a été incubée dans 5mL de mGam durant une nuit à partir d'une culture fraiche sur boite. Puis, une suspension à 1.10^7 UFC/mL a été distribuée dans une plaque 96 puits avec les xénobiotiques à tester aux concentrations indiquées dans le TABLEAU 4. Après 48h de culture en anaérobiose à 37°C, les plaques ont été agitées de manière orbitale durant 30s et la DO_{600nm} a été lue au lecteur de microplaques (TECAN™, Sunrise Remote, Autriche). Le pourcentage de croissance en présence des différents xénobiotiques a été calculé par rapport aux cultures contrôles sans molécules. Ces expériences ont été réalisées en triplicat.

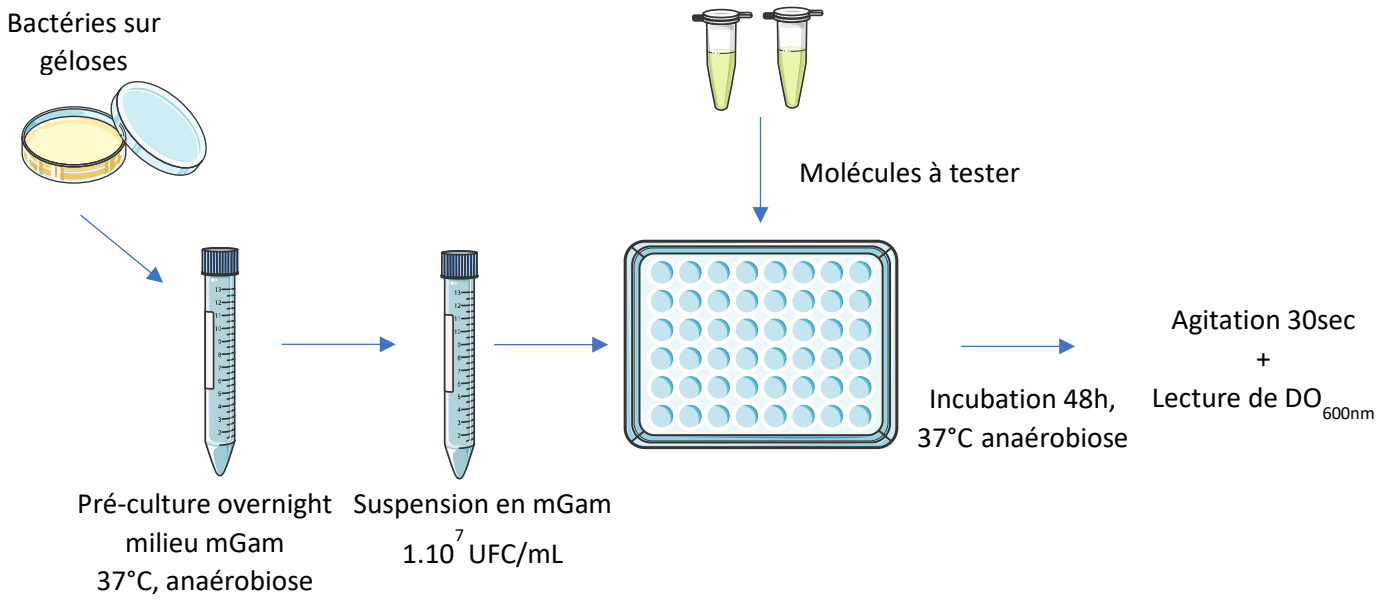


Figure 15 : Schéma expérimental pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes du core microbiote intestinal vis-à-vis différents xénobiotiques testés

2. Microbiote cutané

La sensibilité des 13 souches a été déterminée vis-à-vis de trois parabènes (methylparabène, ethylparabène et propylparabène). Le schéma expérimental est présenté en **FIGURE 16.** Après une culture sur gélose LB, chaque souche a été cultivée durant une nuit dans 5 mL de LB ½ à 30°C. Une suspension à 1.10^6 UFC/mL a ensuite été réalisée puis distribuée dans une plaque 96 puits avant d'ajouter les différents perturbateurs endocriniens dont les concentrations sont indiquées dans le **TABLEAU 4**. Les plaques ont ensuite été incubées à 30°C. Un suivi de croissance a été réalisé durant 168h, avec une lecture de DO_{595nm} effectuée au temps T0, T24h, T48h, T72, T144 et T168h (TECAN™, Sunrise Remote, Austria). La condition DMSO est la condition contrôle de cette expérience. Ces expériences ont été réalisées en triplicat.

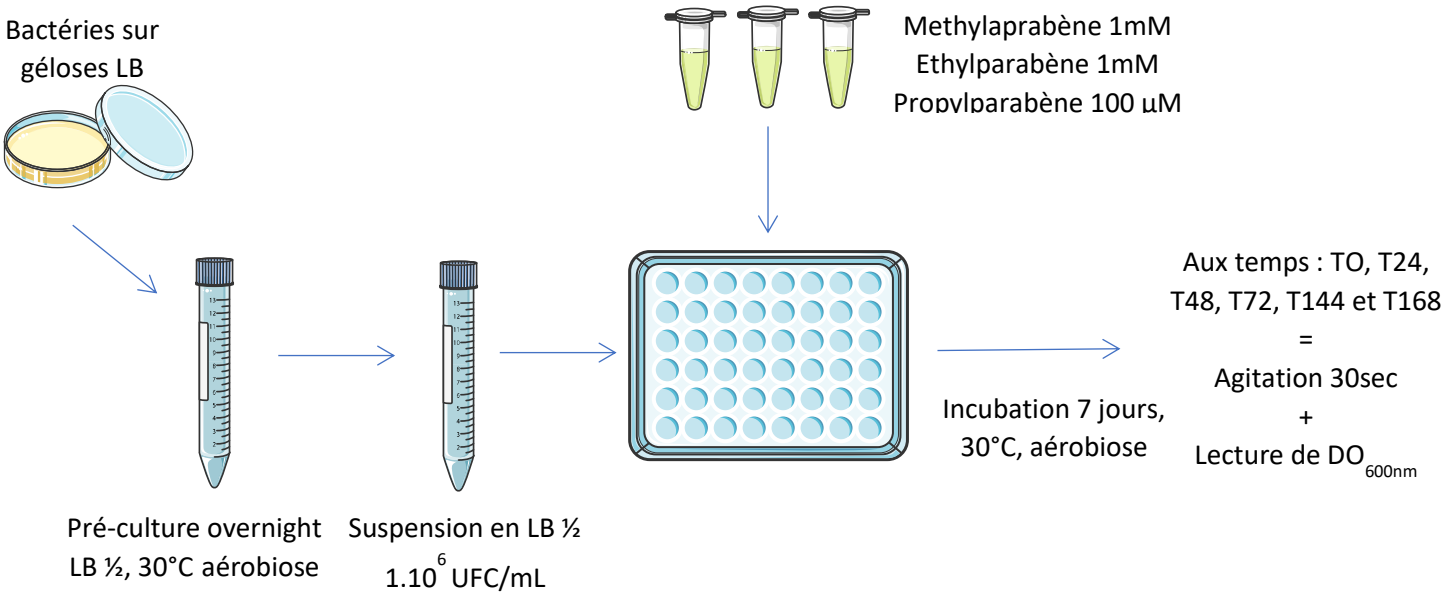


Figure 16 : Schéma expérimental pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes du core microbiote cutané vis-à-vis différents xénobiotiques testés

C. Analyse des surnageants de culture par UHPLC-MS/MS

1. Microbiote intestinal

Après 48h d'incubation en présence des xénobiotiques (TABLEAU 4), les cultures ont été centrifugées (30min, 2500 rpm, 4°C). Afin de s'assurer de la stabilité de chaque molécule dans le milieu mGam, le même protocole a été suivi mais sans inoculer de bactéries, ce qui représentera la condition contrôle. Puis, le surnageant a été prélevé, disposé dans de nouvelles plaques 96 puits et stocké à -20°C avant quantification par UHPLC-MS/MS. Le schéma expérimental est exposé en FIGURE 17.

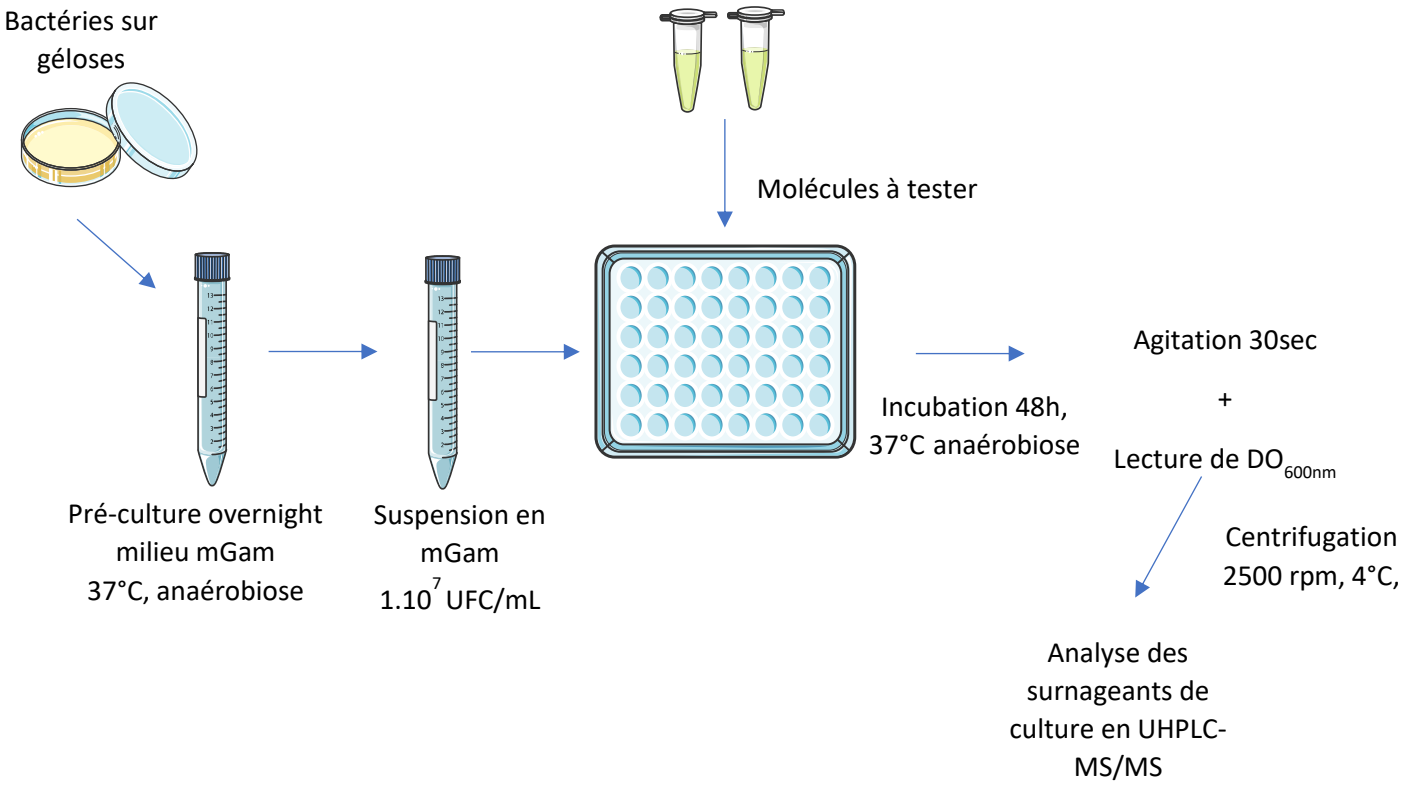


Figure 17 : Schéma expérimental pour le dosage des xénobiotiques dans les surnageants de culture bactériens des souches du microbiote intestinal

L'analyse UHPLC-MS (chromatographie liquide à ultra haute performance couplé à la spectrométrie de masse) a été effectuée par un système 1290 Infinity Binary LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle ou Q-TOF, Q-TRAP 5500 avec une source d'ions ESI Turbo V (SCIEX, Foster City, CA, USA) ou à un spectromètre de masse en tandem à temps de vol quadripôle de masse précis 6550 iFunnel avec respectivement une source double Jet Stream d'Agilent (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, USA).

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne C18, Poroshell 120 EC-C18 (Agilent) ou Atlantis™ Premier BEH C18 AX (Waters) pour une analyse utilisant respectivement le Q-TRAP ou le Q-TOF. La phase mobile était constituée de deux solutions comprenant le solvant A (acide formique à 0,1% dans de l'eau) et le solvant B (acide formique à 0,1% dans de l'acétonitrile), la colonne a été thermostatée dans un four à 35°C et le débit a été réglé à 650 µl/min. Le gradient chromatographique utilisé pour chacun des composés était spécifique, tous les détails sont présentés en **ANNEXES (TABLEAU 5 ET TABLEAU 6)**.

Pour l'analyse par spectrométrie de masse utilisant le triple quadripôle, les données ont été acquises en utilisant l'ionisation par électrospray (ESI) en mode positif, la tension de pulvérisation des ions a été fixée à 5 500 V. Les données ont également été acquises en mode négatif, avec une tension de pulvérisation d'ions fixée à -4 500 V. La désolvatation de la source a été réalisée en utilisant les paramètres suivants : Température (TEM) à 600 °C, gaz source d'ions 1 (GS1) à 40 PSI, gaz source d'ions 2 (GS2) à 60 PSI, et gaz Curtain (CUR) à 30 PSI. Les paramètres spécifiques de la surveillance des réactions multiples qui permettent de quantifier et de surveiller les composés sont décrits **ANNEXES 2 (TABLEAU 7)**. Les données brutes ont été traitées avec Sciex Analyst et l'aire sous la courbe individuelle de chaque analyte pour chaque échantillon a été déterminée à l'aide du logiciel MultiQuant.

Pour l'analyse par spectrométrie de masse utilisant le Q-TOF, les données ont été acquises par ionisation par électrospray (ESI) en mode positif et négatif. La tension capillaire (Vcap), la tension de la buse, le pic RF du fragmenteur et de la pieuvre ont été fixés à 4 000 V en mode positif et respectivement à 500 V, 350 V et 750 V en mode négatif. La désolvatation de la source a été réalisée en utilisant les paramètres suivants : température du gaz à 230 °C, débit du gaz de séchage à 15 L/min, nébuliseur à 40 PSI, température du gaz de gaine à 280 °C et débit du gaz de gaine à 11 L/min. Les données en mode profil et centroïde ont été collectées à partir de 100-1700 m/z avec un taux d'acquisition de 3 spectres par seconde. Les données brutes ont été traitées dans le MassHunter Agilent et la SSC (surface sous la courbe) de chaque analyte de chaque échantillon a été déterminée à l'aide du logiciel MassHunter Quantitative.

2. Microbiote cutané

Dans ce travail, seuls les parabènes ont été analysé par UHPLC-MS/MS.

Après 168h d'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées en présence ou non des parabènes (30 min, 2500 rpm, 4°C). Les surnageants ont été prélevés, disposés dans une nouvelle plaque 96 puits et stockés à -20°C avant analyse par UHPLC-MS/MS **(FIGURE 18)**. La condition sans

bactérie sert de contrôle à l'expérience. Les surnageants ont été dilués au 1:1500 pour l'ethylparabène et le methylparabène et au 1:15000 pour le propylparabène dans une solution de méthanol/H_2O (50-50) et introduits dans les vials.

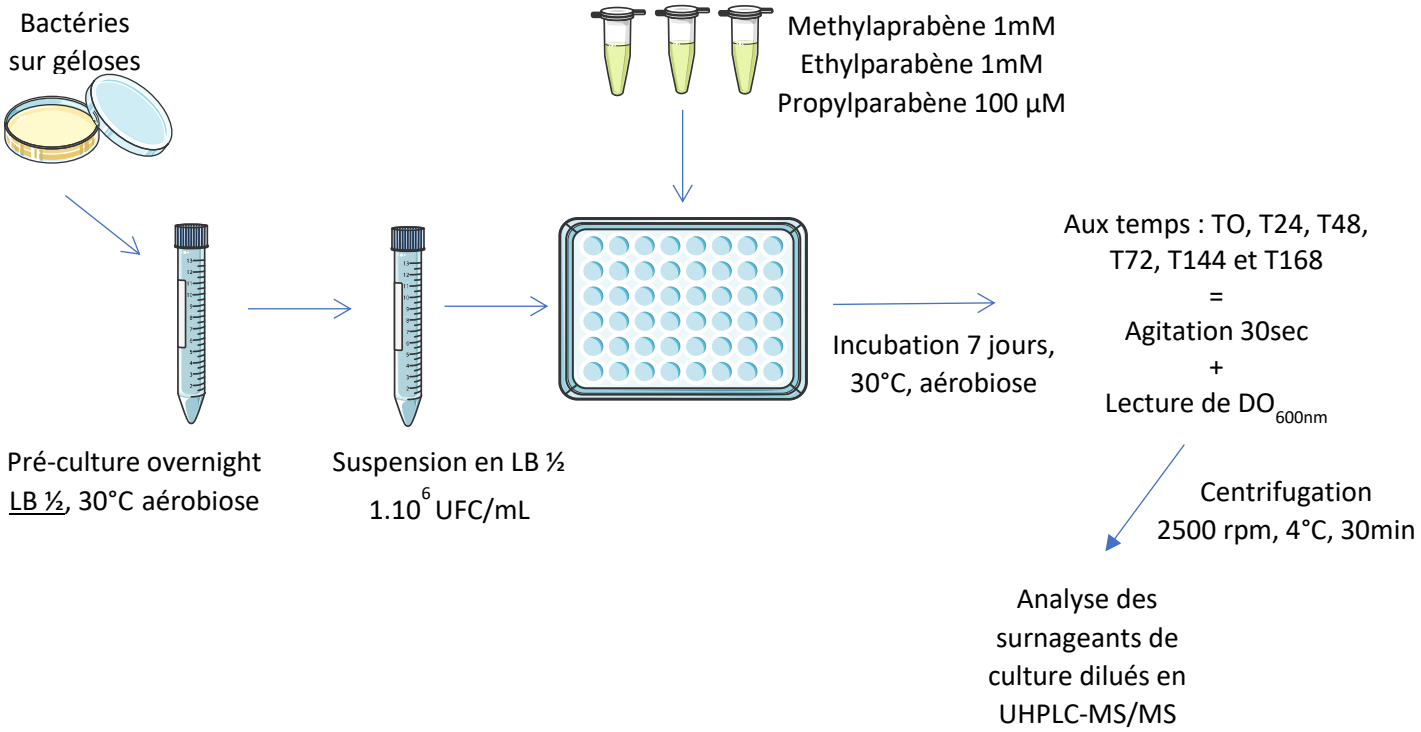


Figure 18 : Schéma expérimental du dosage des parabènes dans les surnageants de cultures bactériens des souches du microbiote cutané

La quantification du méthylparabène, de l'ethylparabène et du propylparabène a été réalisée par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLLC-MS/MS). À cette fin, les cultures bactériennes ont été centrifugées (30 min, 4°C, 2500 rpm) et les surnageants ont été récupérés pour être analysés. 20 µL des échantillons préalablement dilués au 1:1500 pour le méthylparabène et l'ethylparabène et au 1:15000 pour le propylparabène avec de l'eau ultrapure et de l'acétonitrile (50:50), ont été injectés dans le système UHPLC-MS/MS consistant en un système UHPLC Shimadzu (Nexera X2, Kyoto, Japon) couplé à un spectromètre de masse QTrap 6500+ de Sciex (Concord, Canada). La séparation chromatographique des parabènes a été réalisée avec une colonne CSH de 3,5 µm (Waters® Acquity CSH C18, 2,1 x 100 mm, Milford, USA) chauffée à 40° C. La phase mobile composée d'eau pure (phase A) et d'acétonitrile (phase B) a été injectée à 0,35 mL/min en mode gradient, selon le programme de gradient suivant : de 0 à 1 minute, 0% de B ; de 1 à 4 minutes, augmentation linéaire jusqu'à 20% de B ; de 4 à 7 minutes, augmentation linéaire jusqu'à 98,6% ; de 7

à 8 minutes, maintien de la concentration de la phase mobile à 98,6% ; de 8 à 10,5 minutes, retour aux conditions initiales pour équilibrer la colonne pour le prochain passage. L'ionisation des composés cibles a été réalisée par une source ESI en mode négatif et les ions formés ont été détectés par le spectromètre de masse fonctionnant en mode de surveillance des réactions multiples (MRM) avec deux transitions de fragments fils spécifiques pour chaque ion précurseur parent, une pour la quantification et la seconde pour la confirmation. L'acquisition des données a été réalisée avec le logiciel Analyst® et la quantification avec le logiciel MultiQuant®.

D. Réalisation d'un microbiote intestinal reconstitué

1. Mise en culture des 39 souches

Les 39 souches du panel ont été cultivées séparément en anaérobiose à 37°C dans un volume final de 5mL de mGam. Après 48h, 1 mL de chaque culture a été introduit dans un flacon Pénicilline complété à 100mL par du mGam pour construire le microbiote intestinal reconstitué. Les souches bactériennes qui ne se développent pas en cultures individuelles ont aussi été utilisées pour créer le mélange. Ce premier mélange est nommé C1 (pour Consortium 1). Après 48h de culture à 37°C, C1 a été dilué (5%, v/v) dans du mGam frais. Ce nouveau repiquage est appelé C2. Après 48h de culture C2 est également dilué à 5% (v/v) pour obtenir C3, qui sera le mélange utilisé pour réaliser la suite des expériences. Le schéma expérimental est présenté en **FIGURE 19**.

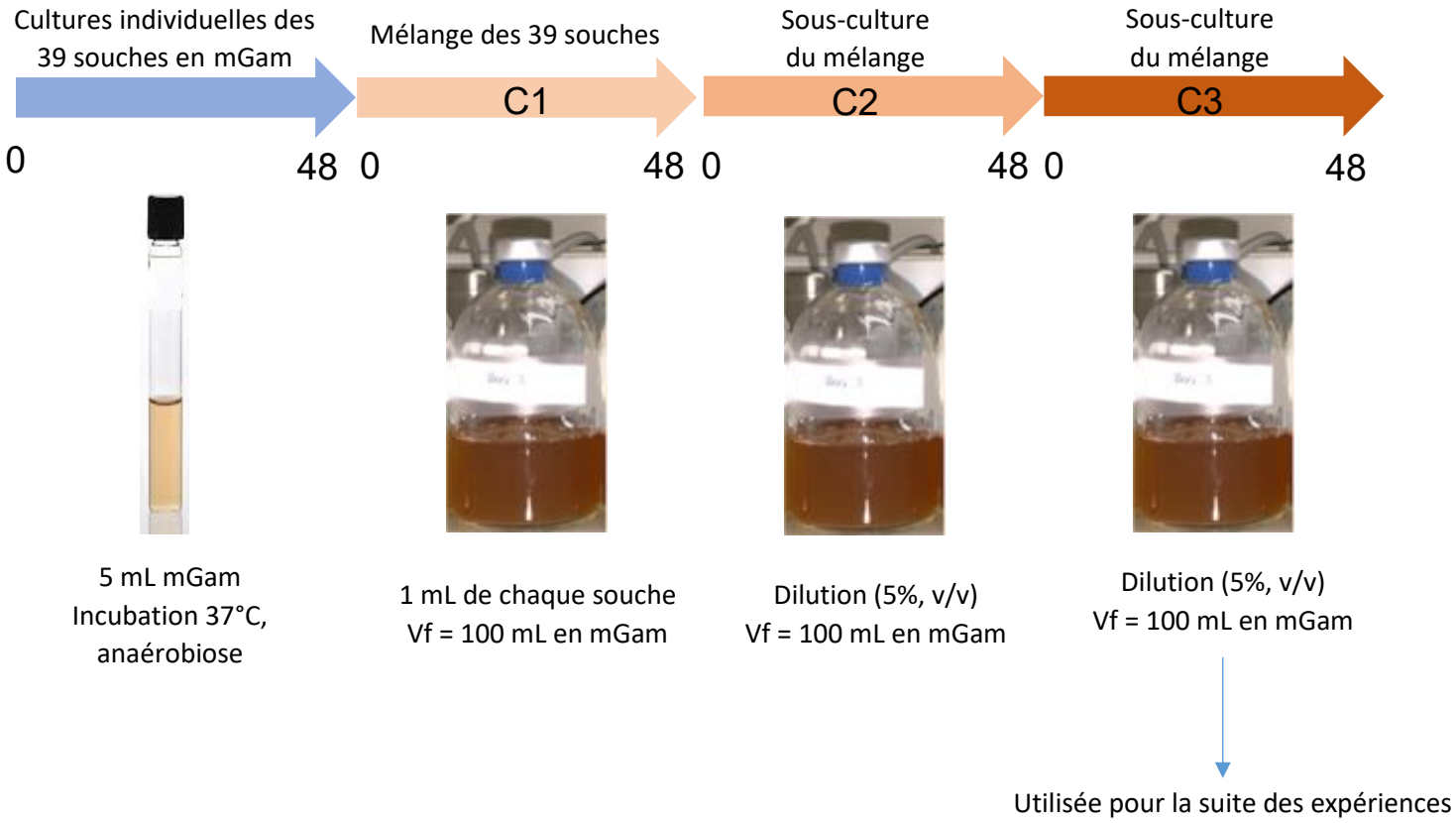


Figure 19 : Schéma expérimental de la construction du mélange de 39 souches représentant de core microbiote intestinal

2. Sensibilité *in vitro* du consortium représentant le microbiote reconstitué vis-à-vis des molécules

La sensibilité du microbiote intestinal reconstitué a été analysée vis-à-vis des xénobiotiques du TABLEAU 4 et présenté dans la FIGURE 20. Ces expériences ont été réalisées sous rampe à azote. Pour cela, la culture C3 a été inoculée dans du milieu mGam frais à raison de 5% (v/v) et subdivisée dans différents tubes Hungate pour obtenir 1 culture par xénobiotique en plus des contrôles). Les différentes molécules ont ensuite été ajoutées aux concentrations finales mentionnées dans le TABLEAU 4. Une lecture de DO_{600nm} (spectrophotomètre Camspec, M107) a été effectuée au temps T0 de l'expérience puis après 48h de culture à 37°C. Toutes les cultures ont ensuite été centrifugées (15 min, 4°C, 5 000 tr/min), les surnageants et les culots ont été stockés à -80°C pour analyse en UHPLC-MS/MS ou pour extraction d'ADN en vue du séquençage.

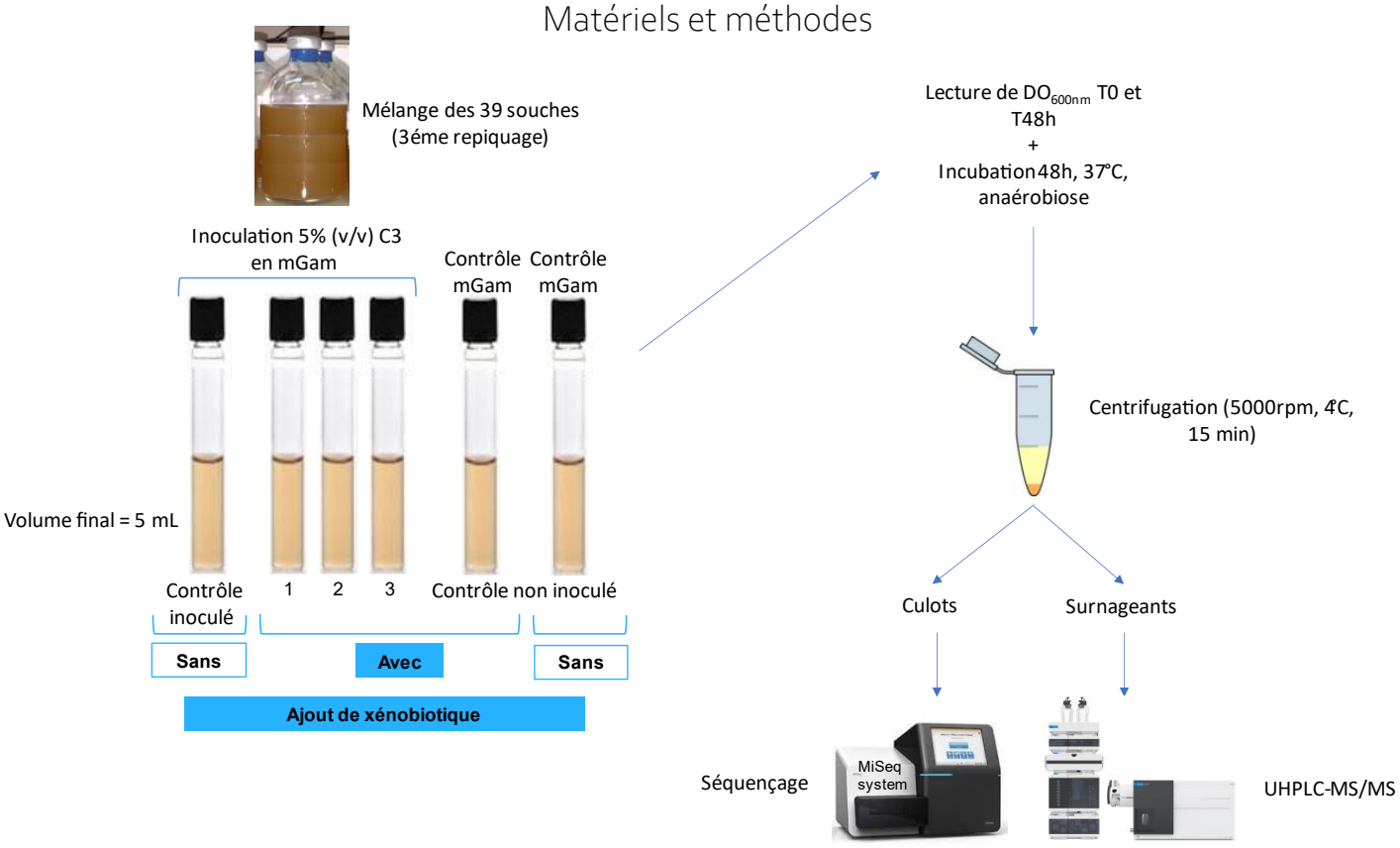


Figure 20 : Schéma expérimental pour déterminer l'effet de xénobiotiques sur un mélange des 39 souches du core microbiote intestinal

3. Séquençage par la technique Illumina MiSEQ

a) Extraction de l'ADN génomique et séquençage à haut débit

L'ADN a été extrait des culots bactériens à l'aide du kit ADN PowerFecal Pro de QIAamp avec la station de travail QIAcube selon les instructions fournies par la société Qiagen. Les échantillons ont été préalablement homogénéisés deux fois pendant 20 s à une vitesse de 5,5 m/s au FastPrep (MP Biomedicals). L'intégrité des échantillons d'ADN a été testée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 %. La quantité d'ADN extraite a été quantifiée à l'aide du NanoDropTMOne (Thermo Scientific™) et les échantillons d'ADN ont ensuite été dilués à une concentration standard de 5 ng/µL et stockés à -20 °C jusqu'à utilisation.

La structure de la communauté bactérienne a été évaluée par le séquençage de la région hypervariable V5-V7 dans le gène de l'ARNr 16S. La région V5-V7 a été amplifiée avec les amorces 799F (5'-AACAGGATTAGATACCCTGG-3') et 1193R (5'-ACGTCYTCCCCACCTTCC-3') **(Beckers, Beeck, et al. 2016)**. Toutes les réactions PCR ont été préparées en triplicat pour chaque échantillon dans un volume total de 25 µl de mélange PCR avec 0,3 µM de chaque amorce sens et anti-sens, un tampon de mix PCR

1X avec 200 mM de chaque dNTP et 1U d'ADN polymérase haute-fidélité (NEB) Q5, en utilisant un thermocycleur Vapo.protect™ Mastercycler (Eppendorf). Le cycle PCR a été effectué à 98°C pendant 30 s, suivi de 25 cycles à 98°C pendant 10 s, 56°C pendant 15 s et 72°C pendant 10 s et d'un allongement final à 72°C pendant 2 min. Les produits amplifiés ont été contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. Les produits PCR en triple exemplaire pour chaque échantillon ont été mis en commun, purifiés à l'aide du kit de nettoyage PCR avec la station de travail QIAcube et quantifiés à l'aide d'un fluorimètre Qubit 2 (Invitrogen). Le séquençage a été effectué sur la plateforme de séquençage MiSeq d'Illumina avec le kit V3 Illumina (2 × 300 bp pair-end reads) à l'Institut ICM **(Paris, France ; https://icm-institute.org/fr/)** selon des protocoles standard.

b) Traitement des données de séquençage du MiSEQ d'Illumina, analyses statistiques et relation phylogénétique

Les traitements de données bio-informatiques ont été réalisés en suivant le pipeline QIIME2 **(Bolyen, Rideout, Dillon, Bokulich, Abnet, Caporaso, et al. 2019)**. Les OTUs ont été regroupées à un seuil d'identité de 97 %. A partir de l'affiliation taxonomique, une séquence représentative de chaque OTU affiliée a été extraite. Enfin, une normalisation des abondances trouvées pour chaque OTU a été effectuée par la méthode DESeq **(Anders, Reyes, et Huber 2012b)**. Les indices de diversité et d'uniformité (Evenness) **(Chao et al. 2014a)** ont été calculés à partir des données des OTUs bactériennes après normalisation par la méthode DESeq. La dynamique de l'évolution a été déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance **(J. Felsenstein 1981)**. Un alignement a ensuite été effectué entre les OTUs ; l'alignement a été utilisé pour construire un arbre phylogénétique avec l'algorithme PhyML **(Guindon et al. 2010b)**.

Les calculs statistiques et les analyses multivariées ont été effectués à l'aide du logiciel R (https://www.r-project.org/) avec les bibliothèques suivantes : phyloseq, vegan, ape, heatmap2, gclus, ggplot2, GUniFrac, grid et optparse. Une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) a été utilisée pour comparer les valeurs moyennes par rapport aux différents échantillons. Une analyse en composantes principales (PCA) a été effectuée pour évaluer la composition de la communauté microbienne des échantillons. Pour l'analyse phylogénétique, un alignement a été effectué pour les séquences OTUs. Chaque OTU a été envoyé à la base de données du NCBI pour identification et affiliation taxonomique au niveau des espèces. La dynamique de l'évolution a été déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et réalisée dans le logiciel UGENE **(Golosova et al. 2014a)**.

RÉSULTATS

III. Résultats

A. *In vitro* sensitivity of 30 anaerobic bacterial strains of the human intestinal core microbiota to antibiotics: culture and LC-MS/MS approaches

Les antibiotiques peuvent entrainer de nombreux effets secondaires et sont une source importante de dysbiose pouvant, à terme, mener à des pathologies plus ou moins sévères. C'est pourquoi l'étude et la compréhension de leur effet sur le microbiote intestinal est importante. De nombreux travaux ont été menés de manière globale sur les souches pathogènes mais rarement sur les souches commensales. Nous nous sommes intéressés à l'impact de certains antibiotiques sur les souches du core microbiote intestinal et aux effets de ces souches sur les antibiotiques testés grâce à une analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Pour cela nous avons sélectionné les antibiotiques les plus couramment utilisés en France, 30 souches représentant le core microbiote intestinal et un milieu commun, le milieu mGam pour toutes nos expérimentations. Les souches bactériennes et les antibiotiques ont été mis en contact pendant 48h en anaérobiose et en microplaque, puis les surnageants de culture ont été prélevés pour être analysés par UHPLC-MS/MS. Nos résultats ont montré que le métronidazole inhibe à plus de 50% la croissance de seulement 4 souches qui sont des Bacteroidetes. En revanche, cet antibiotique est modifié chimiquement par 18 bactéries. En ce qui concerne la moxifloxacine, elle inhibe la croissance de 12 souches et est totalement absente du surnageant d'une seule souche, *S. parasanguinis*. La cefpodoxime et l'érythromycine inhibent la croissance de 6 souches de notre panel. La cefpodoxime est modifiée chimiquement par 5 souches de *Bacteroides* (sur les 10 testées) à plus de 95%, alors que l'érythromycine est absente à plus de 95% dans seulement 3 surnageants bactériens. Quant au sulfaméthoxazole et au triméthoprime, utilisés séparément, aucune inhibition de croissance significative n'a été observé, excepté pour *R. torques* dont la croissance est inhibée à 60% en présence de sulfaméthoxazole. Le triméthoprime est retrouvé dans tous les surnageants de culture sauf dans celui de *F. nucleatum, c*ontrairement au sulfaméthoxazole qui est absent à plus de 90% dans 12 surnageants bactériens. Utilisés en combinaison, les résultats concernant ces deux antibiotiques sont quelque peu différents. La seule bactérie dont la croissance est inhibée en présence du couple sulfaméthoxazole/triméthoprime est *E. coli* (60% d'inhibition). Le profil de modification du triméthoprime est identique quand il est testé seul ou bien avec le sulfaméthoxazole à la différence du sulfaméthoxazole qui n'est plus modifié chimiquement que par 4 souches et non 12 quand il est utilisé seul. Seuls les résultats concernant la croissance des souches en présence d'amoxicilline sont

mentionnés dans cet article. Ils ont mis en évidence une inhibition de croissance de 50% pour 11 souches dont 5 souches qui sont inhibées à plus de 80%.

Ces résultats montrent que les antibiotiques les plus couramment utilisés en France impactent la croissance des souches du core microbiote intestinal dans nos conditions de culture anaérobie. Ils démontrent également que certaines bactéries sont capables de modifier la structure des molécules, ce qui pourrait, dans certains cas, entrainer une inefficacité du traitement. Cette modification pourrait en outre en diminuer la concentration *in situ*, et mener ainsi à des phénomènes de résistance aux antibiotiques.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal ANAEROBE.

Anaerobe 67 (2021) 102314

Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria

In vitro sensitivity of 30 anaerobic bacterial strains of the human intestinal core microbiota to antibiotics: Culture and LC-MS/MS approaches

Florine Ecale [a], Abdelaziz El Houari [a], Stéphanie Crapart [a], Jérome Laparre [c], Manilduth Ramnath [c], Jean-Marc Berjeaud [a], Marie-Hélène Rodier [a, b], Alexandre Crépin [a, *]

[a] Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073, Poitiers Cedex, France
[b] Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU La Milétrie, 2 rue de la Milétrie, 86021, Poitiers Cedex, France
[c] Eurofins Discovery France, Le bois l'Evêque, 86600, Celle-Lévescault, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 July 2020
Received in revised form
17 November 2020
Accepted 10 December 2020
Available online xxx

Handling editor: Jozsef Soki

Keywords:
Antibiotics
Core gut microbiota
Anaerobic
LC-MS/MS
In vitro

ABSTRACT

We have a vast knowledge on human intestinal microbiota but it can still be regarded incomplete. One of the objectives of scientists using so-called "omics" techniques is to be interested in the consequences that drugs can have on the composition of the intestinal microbiota and inversely. To date, few publications have reported the effects of drugs on the growth of bacteria composing this microbiota using a "culturomics" approach. We focused on antibiotics commonly prescribed for which the only published are the susceptibility of the pathogenic strains and not that of the commensal strains. The aim of our study was to determine the sensitivity of 30 strains considered to represent the intestinal core microbiota to 8 antibiotics and to study the possible modification of these molecules by bacteria. The 30 bacterial strains were cultured under anaerobic conditions in order to determine their sensitivity to the antibiotics. After 48 h of culture, the supernatants were also analyzed via UHPLC-MS/MS in order to determine if the antibiotics have been chemically modified. Under the current experimental conditions, cefpodoxime, metronidazole, erythromycin, sulfamethozaxole, trimethoprim and the trimethoprim/sulfamethozaxole combination have little impact on the core microbiota strain growth. On the contrary, moxifloxacin and amoxicillin inhibit the growth of numerous strains of our panel. Using UHPLC-MS/MS analyses, we have shown that some antibiotics can be modifed by the bacteria composing the intestinal core microbiome. The bacteria that make up the intestinal microbiota core are impacted by the antibiotics most commonly prescribed in clinics today and inversely.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The human gastrointestinal tract is colonized by bacteria, viruses, fungi and protozoa first collectively called the normal flora and more recently the microbiota [1]. This consortium is involved in functions such as host nutrient metabolism, maintenance of the mucosal barrier integrity, immunomodulation and protection against colonization by exogenous potentially pathogenic microorganisms [2]. In recent years, the gut microbiota has been potentially associated with some human health disorders ranging from inflammatory bowel diseases [3], neurological disorders [4] to obesity [5] or cardiovascular diseases [6]. The intestinal bacteria consortium is generally represented by the taxa *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*, but individual, temporal or spatial variations exist in their distribution [7]. In adults, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* are usually predominant, whereas *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* are in minor proportion [8]. Nevertheless, it has been shown that despite individual variability, there is a core microbiota composed of 57 strains in 90% of individuals and of 18 strains in 100% of individuals [9]. Alterations in the normal microbiota (or dysbiosis) may occur due to changes in diet, radiation or administration of antimicrobial agents, including antibiotics [10]. Nowadays, antimicrobial agents are widely used in human and veterinary health. In 2017, antibiotics

* Corresponding author.
E-mail address: alexandre.crepin@univ-poitiers.fr (A. Crépin).

https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102314
1075-9964/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

use (expressed in daily doses for 1000 inhabitants) was 29.2 for family medicine with 2/3 of prescriptions represented by beta-lactams, penicillin alone or in association. This figure was lower for health institutions that prescribed 2.1 daily doses per 1000 inhabitants [11]. Amoxicillin is the most prescribed antibiotic in France with 20% of prescriptions in hospitals and 41.7% by general practitioners in the community. Amoxicillin coupled with clavulanic acid is the one most given in hospitals, 30.9% against 23.8% in the community. Physicians also prescribe macrolides, tetracyclines, fluoroquinolones and 3rd to 4th generation cephalosporins [11,12]. It is known for many years that antibiotics used to fight pathogenic bacteria act also on the composition of the intestinal microbiota, leading to adverse effects on normal microbiota [12]. The effect of these molecules on the microbiota depends on numerous factors such as the class of the antibiotic, its administration or its pharmacology. The methods for assessing the impact of antibiotics have mainly consisted in molecular analysis of stools after short term or long-term administration of one or more antimicrobial products [13]. In this context, the aim of this study was to test under *in vitro* anaerobic conditions the effect of eight commonly prescribed antibiotics on 30 bacterial strains of the gut microbiota. In parallel, degradation of these antibiotics by the tested strains has been evaluated using UHPLC-MS/MC methods in order to infer conversely the effect of the microbiota on the molecules tested.

2. Materials and methods

Bacterial strains, media and chemicals: The bacterial strains used in this study (Table 1) were purchased from ATCC (American Type Culture Collection) and DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) or from the University Hospital Center of Poitiers in France. These bacteria were grown anaerobically in absence of free oxygen at 37 °C using an anaerobic workstation (Bactron 300, Blanc Labo SA, Switzerland) containing 90% N2, 5% H2 and 5% CO2. The medium used in this study was mGam (Gifu Anaerobic Medium Broth, Modified, Hyserve) [14], allowing the growth of all tested strains, completed with resazurin 0.1% (w/v) as an anaerobiosis indicator. The medium was distributed anaerobically into appropriate containers and finally sterilized by autoclaving at 115 °C for 15 min. The pH of the medium was 7.3. The antibiotics (Table 2), purchased from Sigma Aldrich were dissolved and stored in DMSO (Sigma Aldrich) at −20 °C.

Table 1
Strains used in this study.

No accession	Strains	Phyla	Gram
ATCC 8482	*Bacteroides vulgatus*	*Bacteroidetes*	Gram -
Clinical strain	*Prevotella copri*	*Bacteroidetes*	Gram -
Clinical strain	*Bacteroides thetaiotaomicron*	*Bacteroidetes*	Gram -
DSMZ 6597	*Bacteroides uniformis*	Bacteroidetes	Gram -
DSMZ 2151	*Bacteroides fragilis*	Bacteroidetes	Gram -
DSMZ 19024	*Bacteroides caccae*	Bacteroidetes	Gram -
DSMZ 19495	*Parabacteroides merdae*	Bacteroidetes	Gram -
DSMZ 20701	*Parabacteroides distasonis*	Bacteroidetes	Gram -
DSMZ 20712	*Odoribacter splanchnicus*	Bacteroidetes	Gram -
ATCC 8483	*Bacteroides ovatus*	Bacteroidetes	Gram -
ATCC 8739	*Escherichia coli*	Proteobacteria	Gram -
DSMZ 15643	*Fusobacterium nucleatum*	Fusobacterium	Gram -
DSMZ 1402	*Clostridium ramosum*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 14610	*Roseburia intestinalis*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 2008	*Veillonella parvula*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 15670	*Clostridium bolteae*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 11782	*Clostridium perfringens*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 2544	*Clostridium saccharolyticum*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 25238	*Blautia obeum*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 6778	*Streptococcus parasanguinis*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 3376	*Eubacterium eligens*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 3992	*Dorea formicigenerans*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 27543	*Clostridioides difficile*	Firmicutes	Gram +
ATCC 19433	*Enterococcus faecalis*	Firmicutes	Gram +
ATCC 27756	*Ruminococcus torques*	Firmicutes	Gram +
ATCC 29149	*Ruminococcus gnavus*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 20219	*Bifidobacterium longum*	Actinobacteria	Gram +
DSMZ 20083	*Bifidobacterium adolescentis*	Actinobacteria	Gram +
DSMZ 3979	*Collinsella aerofaciens*	Actinobacteria	Gram +
DZMZ 2243	*Eggerthella lenta*	Actinobacteria	Gram +

Sensitivity of the intestinal microbiota strains core to antibiotics: The sensitivity of each strain was determined with respect to 7 antibiotics tested alone and a combination of two antibiotics (Table 2). After an overnight pre-culture at 37 °C anaerobically, the OD_{600nm} was adjusted to obtain 1×10^7 CFU/mL and the bacterial culture was dispatched in 96-well plates. The antibiotics were then tested in triplicate at the concentrations shown in Table 2 and the plates were incubated at 37 °C anaerobically. After 48h of incubation, the plates were orbitally shacked at room temperature for 30s, and then the OD_{600nm} was determined using a 96-well microplate reader (TECAN™, Sunrise Remote, Austria). Each bacterial growth was evaluated with or without antibiotic, the antibiotic free condition was used as the control. The percentage of the bacterial growth in the presence of antibiotics was determined compared with its negative control (without antibiotics).

UHPLC-MS/MS method: After 48h of incubation, the bacterial cultures were centrifuged (30 min, 4 °C; 3000g). The supernatant was then transferred to another 96-well plate and stored at −20 °C before the quantity of each antibiotic could be determined by UHPLC-MS/MS. UHPLC-QQQ (ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry) analysis was performed by a 1290 Infinity Binary LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QQQ 5500 mass spectrometer with an ESI Turbo V ion source (SCIEX, Foster City, CA, USA).

Chromatographic separation was performed on C18 column (Poroshell 120 EC-C18, Agilent). The injection volume was 20 µl (full loop injection). The mobile phase consisted of two solutions including solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile), the column was thermostated in an oven at 35 °C and the flow rate was set to 650 µl/min. The chromatographic gradient used for each of the 6 compounds was specific; all details are showed in table S1.

For mass spectrometry analysis, data was acquired using electrospray ionization (ESI) in the positive mode, the ion Spray Voltage was set at 5500 V. Data was also acquired in negative mode, the ion Spray Voltage was then set at −4500V. The desolvation in the source was accomplished using the following set parameters: Temperature (TEM) at 600 °C, Ion Source Gas 1 (GS1) at 40 PSI, Ion Source Gas 2 (GS2) at 60 PSI, and Curtain Gas (CUR) at 30 PSI. The specific parameters of multiple reaction monitoring which permit to quantify and monitor the 6 compounds are described in Table S2. Raw data was processed in Sciex Analyst and individual AUC (area under the curve) for each analyte in each sample was determined using the MultiQuant software.

Statistical analyses: Statistical analyses were performed to ensure the significance of the results. The percentage of growth of the different replicates were calculated with respect to the OD_{600nm} and then subjected to the Two-way ANOVA non-parametric test followed by Šidák multiple comparisons test (GraphPad Prism version 6.01 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). The % of growth of the controls (without antibiotics) was compared to the % of growth in the presence of antibiotics for each strain. The same analysis was performed for the % of chemical modification from the "below peak area values". The *p*-value used in this test is 0.05. The results are presented in the Table S3 in supplementary files.

Table 2
Antibiotic used in this study.

Antibiotics	Concentrations (mg/L)	Familly
Metronidazole (MTR)	1.5 mg/L	Nitroimidazole
Cefpodoxime (CPD)	1 mg/L	Beta-lactam
Erythromycin (ERY)	1.5 mg/L	Macrolides
Moxifloxacin (MXF)	1 mg/L	Fluoroquinolone
Trimethoprim (TMP)	2 mg/L	Diaminopyrimidines
Sulfamethoxazole (SMX)	2 mg/L	Sulfonamides
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (STX)	2/2 mg/L	Diaminopyrimidines + Sulfonamides
Amoxicillin (AMO)	2 mg/L	Beta-lactam

3. Results

In this study, we have tested 7 antibiotics, including 2 in couple and alone, on 30 strains of the core intestinal microbiota in a single medium mGam using 96-wells microplate. The concentrations of antibiotics used in this study were chosen based on the available data from EUCAST and their solubility in DMSO [15]. Metronidazole inhibits the growth of strains belonging to the phyla of *Bacteroidetes* of more than 50% (Fig. 1). The inhibited strains were *B. caccae*, *O. splanchnicus*, *P. merdae* and *B. thetaiotaomicron* (>85%). Moreover, UHPLC-MS/MS results indicate that 18 strains out of 30 of the core intestinal microbiota (6 *Bacteroidetes*, 9 *Firmicutes*, 1 *Proteobacteria* and 2 *Actinobacteria*) modify the metronidazole in proportions greater than 90% irrespective of the phylum. Among these 18 strains, 11 totally modify the molecule. Only two *Firmicutes* (*E. faecalis* and *C. perfringens)* modify the structure of the metronidazole without being affected in their growth. The growth of *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *O. splanchnicus* and *P. merdae* is inhibited by this compound although its structure is modified by these strains. No modification of the antibiotic's proportion or structure was observed for only *B. caccae*, *P. distasonis*, *F. nucleatum* and *R. intestinalis* while the growth of these strains is latter being inhibited between 30% and 60%.

The growth of 6 strains in our panel, including 3 *Bacteroidetes*, 2 *Firmicutes* and 1 *Fusobacteria* are inhibited at more than 50% (Fig. 1) in presence of cefpodoxime. The *Bacteroidetes* had their growth

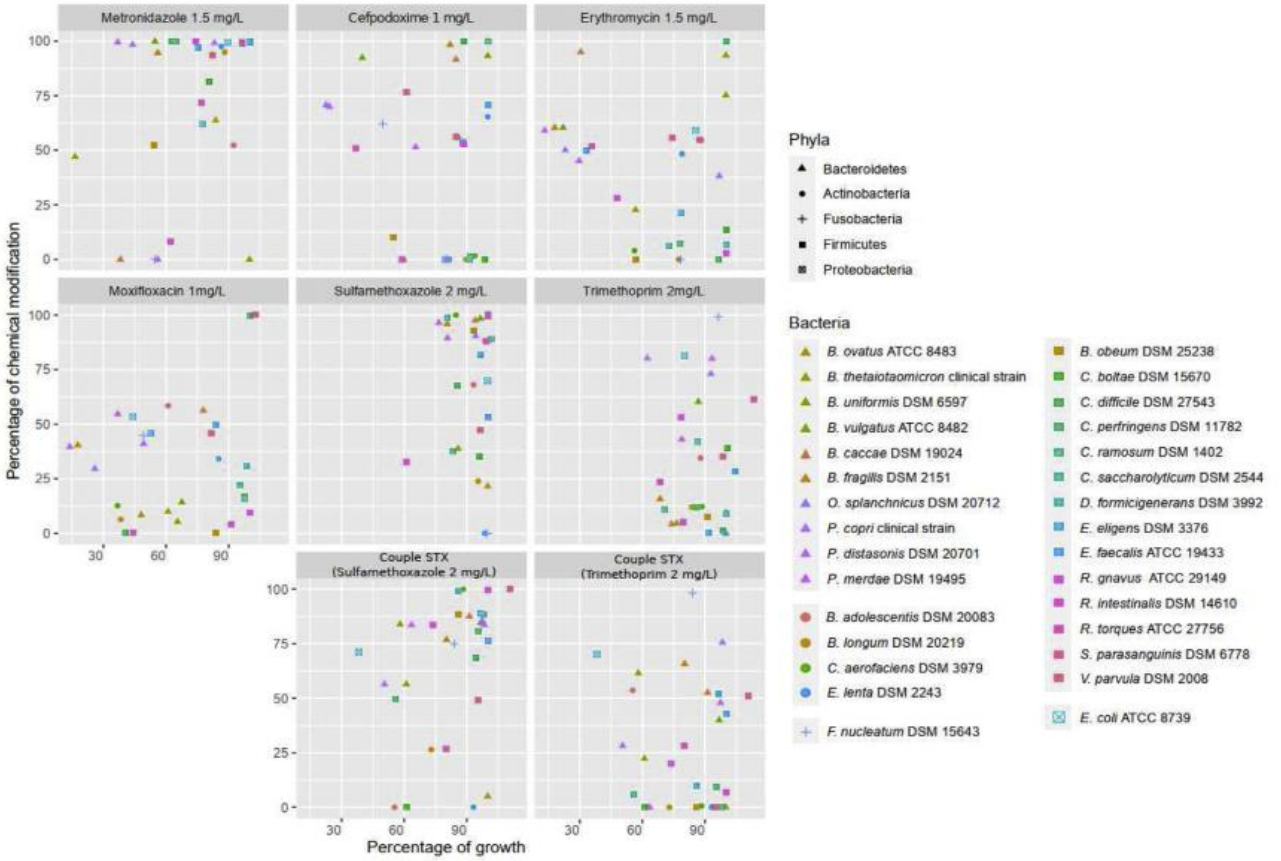


Fig. 1. Biplots showing the percentage of bacterial growth of intestinal core microbiota strains versus the percentage of antibiotics modification. The percentage of growth was calculated in relation to the control cultures of each strain in the absence of antibiotics after 48h of culture in mGam medium under anaerobic conditions and after reading of $OD_{600\ nm}$. The percentage of modification was determined by UHPLC-MS/MS in relation to the control samples. Growth data are identical for STX (Trimethoprim 2 mg/L) and STX (Sulfamethoxazole 2 mg/L) combination, only the degradation data are different. All experiments were carried out in triplicate.

reduced between 60 and 80% compared to the control. In our work, some strains – that are insensitive to cefpodoxime – were capable of modifying this antibiotic at more than 90%. Curiously, the *B. vulgatus* strain was able to modify the antibiotic while it has a growth inhibited of 60%. In this work, the strains capable of modifying the structure of cefpodoxime at more than 90% are mainly *Bacteroidetes* (5 out of 7). In contrast, the strains that do not modify the structure of the antibiotic, or slightly, are mainly *Firmicutes* (5 out of 9) whose growth is not or only slightly inhibited.

Erythromycin inhibits the growth of 9 strains in our panel to more than 50% (between 50% and 90% inhibition) (Fig. 1). The strains impacted belong to the *Bacteroidetes* and *Firmicutes* phyla. *Bacteroidetes* have been the most affected strains by the presence of the antibiotic (6 out of the 10 strains of *Bacteroidetes* of our panel). The disparition of the antibiotic is quite low. Only 3 strains are capable of modifying it in a proportion of 90%. Among these strains, *B. thetaiotaomicron* and *C. perfringens* modify the structure of the antibiotic without being affected in their growth. The strain that modified 95% of erythromycin was *B. caccae*. However, the growth of this strain was inhibited by 70% in the presence of the antibiotic. 9 strains (6 *Firmicutes*, 2 *Actinobacteria* and 1 *Fusobacteria*) of our panel did not or only slightly modifed erythromycin (Fig. 1).

Moxifloxacin inhibits the growth of 12 strains in our panel by more than 50%. All phyla are concerned including 6 *Bacteroidetes*, 2 *Firmicutes*, 2 *Actinobacteria*, 1 *Fusobacteria* and 1 *Proteobacteria*. Seven strains of our panel, all belonging to the phyla of *Firmicutes*, are not really sensitive to this antibiotic. Furthermore, this compound is slightly modified by the bacteria from our panel. Only *S. parasanguinis* and *C. perfringens* completely modify moxifloxacin. The same applies to *S. parasanguinis*, which is able of completely modify moxifloxacin and whose growth is not affected by the antibiotic. The other strains in our panel do not modify the antibiotic or slightly.

We observed that when sulfamethoxazole or trimethoprim were used alone, no significant growth inhibition was noted (Fig. 1), except for the *R. torques* strain that has a 40% reduction in growth in the presence of sulfamethoxazole. Up to 90% of sulfamethoxazole, when used alone, is chemically modified by 12 bacterial strains belonging to the phyla of *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*. Only *E. lenta* did not modify sulfametoxazole. Trimethoprim, when tested alone, was modified in more than 90% by a single strain, *F. nucleatum*. In presence of the sulfamethoxazole and trimethoprim couple, the growth of *E. coli* ATCC 8739 is inhibited by 60%. When paired, the sulfamethoxazole is degraded in 90% only by 4 bacterial strains, *S. parasanguinis*, *C. aerofaciens*, *D. formicigenerans* and *R. intestinalis*, instead of 12 strains as previously reported in this study. Trimethoprim is modified by the same strain, *F. nucleatum*, when alone or in combination.

Amoxicillin reduces the growth of 11 bacterial strains from our panel by 50% or more. Growth is inhibited by approximately 80% or more for strains *B. vulgatus*, *E. coli*, *O. splanchnicus*, *C. perfringens* and *C. aerofaciens* (Fig. 2). Under our culture conditions, *E. coli* ATCC 8739 is highly sensitive to antibiotics while *B. thetaiotaomicron* was almost non-susceptible to antibiotics with 75% and 25% growth inhibition respectively. Only 5 strains (4 are *Bacteroidetes* and 1 is a *Firmicutes*) from our panel are not affected: *B. fragilis*, *P. merdae*, *B. caccae*, *P. copri* and *C. boltae*. Overall, our results showed growth inhibition with amoxicillin, more or less, for 25 bacterial strains composing the intestinal core microbiota.

4. Discussion

The aim of our study was to determine the sensitivity of 30 commensal strains of the intestinal core microbiota to 7 antibiotics, including two used alone and in pairs, the most commonly used in France. We showed that metronidazole affected the growth of some strains belonging to the *Bacteroidetes* phyla. These results are in agreement with those of an adult cohort study which showed that metronidazole treatment decreased *Bacteroidetes* diversity [16] and those described by Narimani *et al.*, in 2016, who showed that the *Bacteroides* that make up the normal intestinal microbiota were susceptible to metronidazole [17]. In addition to its global low activity on the growth of the other strains tested under our conditions, this antibiotic was significantly modified by the bacteria. It was demonstrated by Sousa and his team in 2008 that metronidazole is reduced to N-(2-hydroxyethyl oxamic acid) and acetamide by *C. perfringens* [18]. Our results confirm that this bacterium, but also other strains of the intestinal core microbiota can modify the basic structure of metronidazole (absence of the basic structure of the molecule in 11 supernatants). However, additional analyses will be necessary to know the metabolites produced in our case. In the same way, sulfamethoxazole and trimethoprim have very little impact on the growth of strains of the intestinal core microbiota when used alone or in combination. Overall, we showed that sulfamethoxazole and trimethoprim used alone had no effect on the growth of the bacterial strains. These results are consistent with data from Guerrant and colleagues in 1981, which showed that the administration of trimethoprim to patients had no effect on anaerobic bacteria present in the feces [19]. These antibiotics are always used in combination because it has been demonstrated that the activity was due to a synergy between them [20]. We confirm that when the two antibiotics are tested together, the results are slightly different from the results obtained when the molecules are tested alone. Indeed, in combination, these antibiotics inhibit the growth of 13 strains from our panel. Our *E. coli* strain ATCC 8739 is a part of the panel of growth-inhibited strains which confirms EUCAST data indicating a MIC of < 0.5/9.5 mg/L for the trimethoprim/sulfamethoxazole combination for *E. coli* ATCC 25922 [15]. In addition, a study comparing the effects of different antibiotics on anaerobic bacteria in the intestinal microbiota reported low activity of this antibiotic combination against *E. coli* [21]. However, in the presence of trimethoprim alone at 2 mg/L the growth of our *E. coli* strain ATCC 8739 is not inhibited as reported by EUCAST with an MIC of 1 mg/L for the *E. coli* strain ATCC 25922 [15]. The difference in results may be due to the different medium used (EUCAST *E. coli* ATCC 25922 is tested in Mueller Hinton medium), the conditions of exposure to oxygen (under aerobic conditions) and the strain itself. The same phenomenon is observed in the presence of cefpodoxime. Indeed, our *E. coli* strain ATCC 8739 is not sensitive while the EUCAST mentions an MIC of 0.5 mg/L for *E. coli* strain ATCC 25922 [15]. In addition, numerous publications have observed a decrease in the growth of *E. coli* in the presence of cephalosporins [22]. Our other results for cefpodoxime are consistent with antibiotic susceptibility databases which indicate that anaerobic bacteria are not sensitive to cephalosporins, with the exception of *Fusobacterium* and *Prevotella* species [11]. Some of the antibiotic-insensitive strains are able to modify the structure of the antibiotic by more than 90%. This is the case for *C. perfringens* and *C. difficile*. A study conducted in 2006 showed that cefpodoxime could be degraded into 3 compounds depending on humidity and pH conditions [23]. The bacteria could then modify the pH of the medium, leading to a structural modification of the antibiotic (final pH was not studied in this study). Concerning moxifloxacin, *C. perfringens* can also completely modify the structure of this compound without suffering an inhibition of its growth, which is also the case for *S. parasanguinis*. These structural modifications could be an established bacterial mechanism to protect against antibiotics. The insensitivity of our *C. perfringens* strain contrasts with the data of Noel et *al.* in 2005, who showed a MIC for moxifloxacin between 0.25 mg/L and 1 mg/L for *C. perfringens* [24]. In addition, our *E. coli*

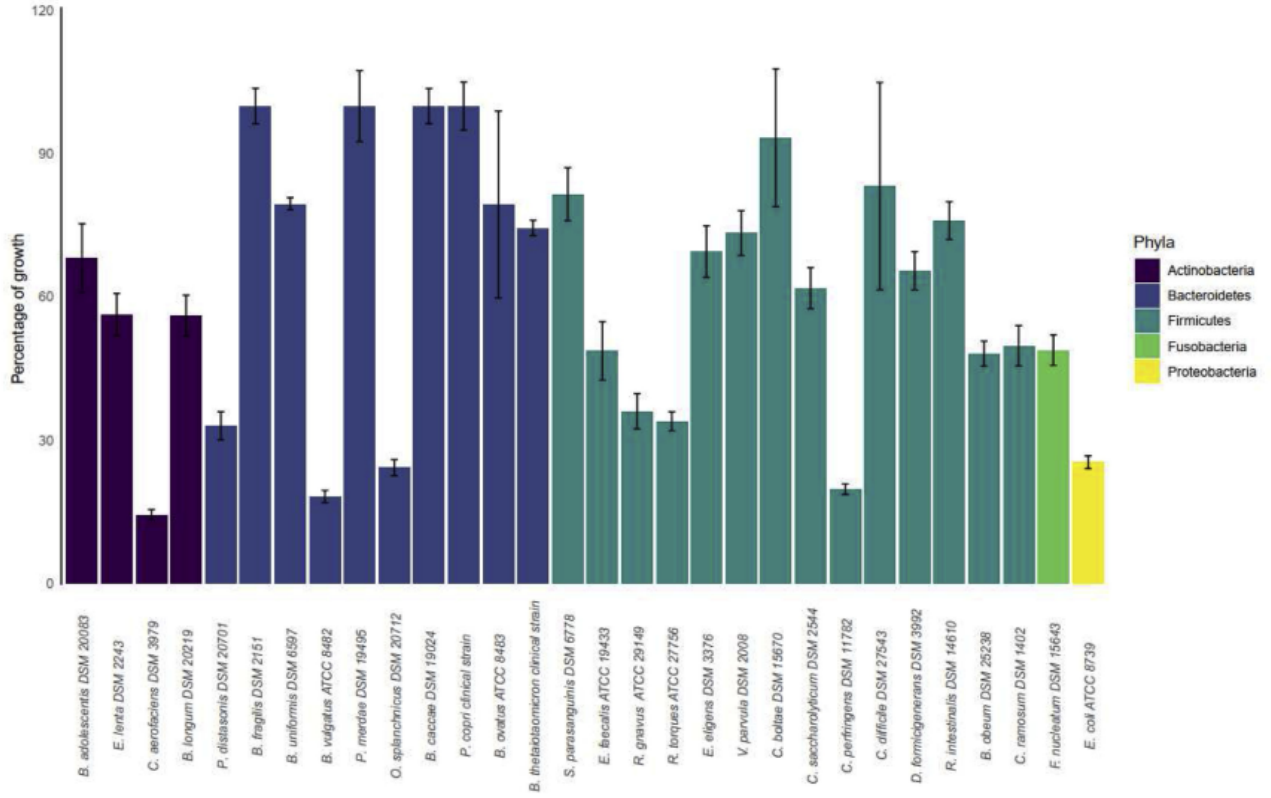


Fig. 2. Bacterial growth in the presence of amoxicillin (2 mg/L)
The bacterial strains were cultured in mGam medium in the presence of amoxicillin at 2 mg/L or not (control). The percentage of growth was calculated relative to the control cultures of each strain without antibiotics after 48 h of anaerobic culture. All experiments were carried out in triplicate.

strain ATCC 8739 does not react in the same manner (weakly inhibited at 1 mg/L) in the presence of moxifloxacin as the EUCAST strain, *E. coli* ATCC 25922, which is antibiotic sensitive between 0.016 and 0.03 mg/L [15]. These contradictory results could be explained by the different experimental conditions used in the different studies. Overall, 12 strains in our panel have growth-inhibited in the presence of this fluoroquinolone. These results are in agreement with the literature showing a decrease in bacterial diversity during treatment with moxifloxacin [25,26]. The growth results of our *B. thetaiotaomicron* clinical strain are consistent with EUCAST results indicating insensitivity to moxifloxacin at 2 mg/L [15]. Similar to moxifloxacin, the structure of erythromycin is weakly modified by the bacteria from our panel. Indeed, only 3 bacteria are able modify the structure of this macrolide to more than 95%. Surprisingly, the basic structure of erythromycin is not found in *B. caccae* supernatants whereas its growth is inhibited by 70% in the presence of the antibiotic. Knowing that erythromycin is degraded in an acidic medium [27], we can hypothesize the strain *B. caccae* used in this study modifies the structure of the antibiotic by acidifying the medium and could therefore produce metabolites that are subsequently toxic to itself. Further studies would be necessary to confirm this hypothesis. Growth inhibition of *B. caccae* and other strains of *Bacteroidetes* phyla is consistent with data in the literature showing a decrease in *Bacteroidetes* and *Clostridia* in feces when this antibiotic is taken [13,28]. The growth of the *E. coli* strain ATCC 8739 used in this study, initially isolated in feces, is not affected in the presence of the antibiotic. These results contradict a study which shows a global disappearance of the bacteria in the feces of patients who had taken erythromycin [29]. However, their study was conducted under aerobic conditions, which may explain the difference in results. In contrast to erythromycin, the data in the literature for amoxicillin indicate an increase in some *Bacteroides* and *Parabacteroides* and a decrease in *Fusobacterium* [13]. Our results on the growth of strains in the presence of this beta-lactam are consistent with this study [13]. However, the *Bacteroidetes* strains *P. distasonis* and *B. vulgatus*, which are inhibited in our study, do not behave as described in this review of the literature on the effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota [13]. These contradictory results can be explained by another study that showed an increase in certain taxa of *Bacteroidetes* [30]. For amoxicillin, our results for *E. coli* and *B. thetaiotaomicron* are in agreement with those of EUCAST [15]. Amoxicillin being an unstable molecule [31], it was impossible to perform LC-MS assays after 48 h of culture under our experimental conditions.

With this study, we demonstrated in anaerobic conditions that antibiotics impact the growth of commensal strains of the intestinal microbiota core. We also showed that certain strains are able to modify the structure of antibiotics, mainly metronidazole, without deleterious effect on their growth, suggesting the potential existence of a specific resistance mechanism.

5. Conclusion

Generally speaking, taking antibiotics is not without risk for the anaerobic bacteria that compose our intestinal core microbiota. We have for the first time shown that, under anaerobically conditions,

the tested strains are mainly sensitive to amoxicillin, and moxifloxacin, which are widely-prescribed antibiotics. These molecules act on a large majority of tested strains and can therefore lead to an important dysbiosis. We have also shown that many strains are capable to modify the structure of antibiotics, particularly metronidazole and sulfamethoxazole when coupled with trimethoprim that could lead in some cases, to an inefficiency of the treatment. In addition, the chemical modification of antibiotics by commensal bacteria of the intestinal core microbiota could decrease their *in situ* concentration, which could lead to the appearance of resistance phenomena in pathogenic bacteria. Research on the precise effects of antibiotics on the bacteria of the intestinal microbiota core is still in early stage, because of the difficulty to work with anaerobic conditions. This work could also be conducted with other molecules whose fate and activity on intestinal microbiota is still unknown, despite wide prescriptions.

Acknowledgements

We thank Marie-Hélène Rodier and the CHU of Poitiers for the strains gift. We thank Eurofins Discovery for the UHPLC-MS/MS experiment.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102314.

Author contribution statement

F.E., A.C., MH.R., JM.B., and M.R. conceived and designed the study. F.E., A.E., S.C., and J.L. conducted the experiments. F.E., A.C., and MH.R. analyzed the results and wrote the paper. All authors reviewed the final manuscript.

Funding

This work was support by Eurofins Discovery, internal funding of the CNRS UMR 7267 Laboratory and partly granted by the following 2015–2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER).

Transparency declarations

No transparency declarations.

References

[1] M.J. Blaser, The microbiome revolution, J. Clin. Invest. 124 (2014) 4162–4165, https://doi.org/10.1172/JCI78366.
[2] S.M. Jandhyala, R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru, M. Sasikala, D.N. Reddy, Role of the normal gut microbiota, World J. Gastroenterol. 21 (2015) 8787–8803, https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787.
[3] A. Nishida, R. Inoue, O. Inatomi, S. Bamba, Y. Naito, A. Andoh, Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, Clin J Gastroenterol 11 (2018) 1–10, https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5.
[4] S. Zhu, Y. Jiang, K. Xu, M. Cui, W. Ye, G. Zhao, L. Jin, X. Chen, The progress of gut microbiome research related to brain disorders, J. Neuroinflammation 17 (2020) 25, https://doi.org/10.1186/s12974-020-1705-z.
[5] P. Gérard, Gut microbiota and obesity, Cell. Mol. Life Sci. 73 (2016) 147–162, https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5.
[6] W.H.W. Tang, T. Kitai, S.L. Hazen, Gut microbiota in cardiovascular health and disease, Circ. Res. 120 (2017) 1183–1196, https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
[7] The Human Microbiome Project Consortium, Structure, function and diversity of the healthy human microbiome, Nature 486 (2012) 207–214, https://doi.org/10.1038/nature11234.
[8] R. Tojo, Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis, WJG 20 (2014) 15163, https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163.
[9] J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K.S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D.R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J.-M. Batto, T. Hansen, D.L. Paslier, A. Linneberg, H.B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Doré, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork, S.D. Ehrlich, J. Wang, A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, Nature 464 (2010) 59–65, https://doi.org/10.1038/nature08821.
[10] A.W. Miller, T. Orr, D. Dearing, M. Monga, Loss of function dysbiosis associated with antibiotics and high fat, high sugar diet, ISME J. 13 (2019) 1379–1390, https://doi.org/10.1038/s41396-019-0357-4.
[11] ANSM, Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : une infection évitée c'est un antibiotique préservé ! - Plaquette (ANSM -Santé publique France - Anses - Assurance Maladie - Inserm) (14/11/2018, 2018.
[12] S. Thiemann, N. Smit, T. Strowig, Antibiotics and the intestinal Microbiome : individual responses, resilience of the ecosystem, and the susceptibility to infections, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 398 (2016) 123–146, https://doi.org/10.1007/82_2016_504.
[13] P. Zimmermann, N. Curtis, The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota - a systematic review, J. Infect. 79 (2019) 471–489, https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.10.008.
[14] L. Maier, M. Pruteanu, M. Kuhn, G. Zeller, A. Telzerow, E.E. Anderson, A.R. Brochado, K.C. Fernandez, H. Dose, H. Mori, K.R. Patil, P. Bork, A. Typas, Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria, Nature 555 (2018) 623–628, https://doi.org/10.1038/nature25979.
[15] Eucast 2020, in: EUCAST, Comité de l'antibiogrammede la Société Française de Microbiologie, avril 2020, 2020. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf. accessed May 11, 2020.
[16] B.W. Haak, J.M. Lankelma, F. Hugenholtz, C. Belzer, W.M. de Vos, W.J. Wiersinga, Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans, J. Antimicrob. Chemother. 74 (2019) 782–786, https://doi.org/10.1093/jac/dky471.
[17] T. Narimani, M. Douraghi, P. Owlia, A. Rastegar, M. Esghaei, B. Nasr, M. Talebi, Heterogeneity in resistant fecal Bacteroides fragilis group collected from healthy people, Microb. Pathog. 95 (2016) 1–6, https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.017.
[18] T. Sousa, R. Paterson, V. Moore, A. Carlsson, B. Abrahamsson, A.W. Basit, The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs, Int. J. Pharm. 363 (2008) 1–25, https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.009.
[19] R.L. Guerrant, S.J. Wood, L. Krongaard, R.A. Reid, R.H. Hodge, Resistance among fecal flora of patients taking sulfamethoxazole-trimethoprim or trimethoprim alone, Antimicrob. Agents Chemother. 19 (1981) 33–38, https://doi.org/10.1128/AAC.19.1.33.
[20] L.P. Elwell, H.R. Wilson, V.B. Knick, B.R. Keith, In vitro and in vivo efficacy of the combination trimethoprim-sulfamethoxazole against clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Antimicrob. Agents Chemother. 29 (1986) 1092–1094, https://doi.org/10.1128/AAC.29.6.1092.
[21] S.M. Finegold, S.E. Dowd, V. Gontcharova, C. Liu, K.E. Henley, R.D. Wolcott, E. Youn, P.H. Summanen, D. Granpeesheh, D. Dixon, M. Liu, D.R. Molitoris, J.A. Green, Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children, Anaerobe 16 (2010) 444–453, https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008.
[22] ANSM, Répertoire des spectres d'activité antimicrobienne validés par la Commission d'autorisation de mise sur le marché, 2005.
[23] N. Fukutsu, T. Kawasaki, K. Saito, H. Nakazawa, Application of high-performance liquid chromatography hyphenated techniques for identification of degradation products of cefpodoxime proxetil, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 153–159, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.102.
[24] A.R. Noel, K.E. Bowker, A.P. MacGowan, Pharmacodynamics of moxifloxacin against anaerobes studied in an in vitro pharmacokinetic model, AAC 49 (2005) 4234–4239, https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4234-4239.2005.
[25] C. Burdet, T.T. Nguyen, X. Duval, S. Ferreira, A. Andremont, J. Guedj, F. Mentré, Impact of antibiotic gut exposure on the temporal changes in microbiome diversity, Antimicrob. Agents Chemother. 63 (2019), https://doi.org/10.1128/AAC.00820-19.
[26] C. Edlund, Pharmacokinetics and comparative effects of telithromycin (HMR 3647) and clarithromycin on the oropharyngeal and intestinal microflora, J. Antimicrob. Chemother. 46 (2000) 741–749, https://doi.org/10.1093/jac/46.5.741.
[27] A. Hassanzadeh, J. Barber, G.A. Morris, P.A. Gorry, Mechanism for the degradation of erythromycin A and erythromycin A 2'-ethyl succinate in acidic aqueous solution, J. Phys. Chem. 111 (2007) 10098–10104, https://doi.org/10.1021/jp073030y.
[28] B. Brismar, C. Edlund, C.E. Nord, Comparative effects of clarithromycin and erythromycin on the normal intestinal microflora, Scand. J. Infect. Dis. 23 (1991) 635–642, https://doi.org/10.3109/00365549109105189.
[29] C.L. Hartley, H.M. Clements, K.B. Linton, Effects of cephalexin, erythromycin

and clindamycin on the aerobic Gram-negative faecal flora in man, J. Med. Microbiol. 11 (1978) 125–135, https://doi.org/10.1099/00222615-11-2-125.
[30] S. Panda, I. El khader, F. Casellas, J. López Vivancos, M. García Cors, A. Santiago, S. Cuenca, F. Guarner, C. Manichanh, Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota, PloS One 9 (2014), e95476, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476.
[31] J. Concannon, H. Lovitt, M. Ramage, L.H. Tai, C. McDonald, V.B. Sunderland, Stability of aqueous solutions of amoxicillin sodium in the frozen and liquid states, Am. J. Health Syst. Pharm. 43 (1986) 3027–3030, https://doi.org/10.1093/ajhp/43.12.3027.

B. Combination of molecular and culture-dependent approaches for studying the interactions with xenobiotics and an *in vitro* model of human intestinal microbiota

Le microbiote intestinal est composé de milliers de souches bactériennes vivant en interaction avec les cellules humaines. Parmi ces souches, un socle commun est présent chez tous les individus, c'est le core microbiote. Bien que tous ces microorganismes vivent en interaction étroite, il arrive que certains facteurs viennent déséquilibrer cet écosystème et provoquer une dysbiose qui, à terme, pourrait être impliquée dans certaines pathologies dont le diabète de type II, l'obésité ou bien l'autisme. Parmi ces éléments, on retrouve les xénobiotiques. Leur impact sur le microbiote intestinal commence à être documenté mais le plus souvent de manière globale par des techniques de séquençage, en analysant la diversité du microbiote bactérien total retrouvé dans les fèces. Par ailleurs, on sait aujourd'hui que le microbiote intestinal métabolise certains xénobiotiques sans que les souches mises en cause ne soient encore toutes caractérisées. Pour tenter de répondre à cette problématique, nous avons mis au point un modèle *in vitro* simplifié pour l'analyse des interactions entre xénobiotiques et souches du microbiote intestinal.

Dans cette étude, nous avons sélectionné 39 souches représentatives du core microbiote intestinal se développant dans un seul et même milieu afin de tester l'effet de 36 xénobiotiques sur la croissance de ces souches en culture unique dans un premier temps. Parmi ces xénobiotiques sont retrouvés des antibiotiques, des médicaments, des pesticides, et des perturbateurs endocriniens (phtalates et parabènes). Les concentrations des xénobiotiques après 48h de culture en présence des bactéries ont également été déterminées afin d'étudier l'effet des souches du microbiote intestinal sur la structure des xénobiotiques testés. Enfin, nous avons, dans un second temps, mis en place un modèle *in vitro* de microbiote intestinal composé des 39 souches précédemment étudiées, le HGMM (Human Gut Microbiota Model) pour i) déterminer la sensibilité du modèle à chaque xénobiotique par des techniques de culture et de séquençage du gène de l'ARN 16S puis ii) analyser les surnageants de culture du HGMM en présence de chaque xénobiotique pour déterminer la capacité du modèle à modifier les structures de base des molécules.

Nous avons mis en évidence que seuls les antibiotiques impactent la croissance des souches en culture individuelle. Aucune inhibition de croissance importante n'a été relevée pour les autres xénobiotiques testés. Les résultats concernant les analyses par UHPLC-MS/MS ont montré que certains xénobiotiques sont absents des surnageants de culture de certaines souches. Le métronidazole et le sulfaméthoxazole, deux antibiotiques, sont absents dans respectivement 16 et 12 surnageants de culture. L'oméprazole, l'olsalazine, le diclofénac, la féxofénadine, la nifédipine, la nisolpidine,

l'hespéridine, la clomipramine, le di-isobutyl phtalate et le di-n-butyl-phtalate sont également impactés par la présence des bactéries. Leurs structures de bases sont très peu retrouvées pour certaines molécules ou bien sont complétement absentes pour d'autres dans les surnageants de culture des souches en culture unique.

Afin de créer notre modèle de microbiote intestinal humain, nous avons mis en culture commune 39 souches bactériennes représentant le core microbiote intestinal. Après trois repiquages successifs destinés à s'assurer de la stabilité du modèle, le HGMM a été mis en présence des différents xénobiotiques durant 48 heures, puis les ADNs ont été extraits et la région hypervariable V5-V7 a été séquencée par séquençage Illumina MiSeq. Les résultats ont montré que le mélange de souches était stable après 3 repiquages avec le maintien de 30 souches appartenant aux Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria et Actinobacteria. En présence des xénobiotiques, les abondances relatives des phyla ont changé seulement pour les antibiotiques. Globalement, les Firmicutes ont vu leur abondance relative augmentée sauf en présence de moxifloxacine qui est la seule molécule empêchant la croissance du HGMM. Les Proteobacteria ont diminué en présence des antimicrobiens, sauf dans le cas du sulfaméthoxazole, du métronidazole et de l'amoxicilline. En présence d'érythromycine, une disparition complète des Fusobacteria a été notée. D'autre part, les résultats des analyses en UHPLC-MS/MS ont montré une absence totale de 3 antibiotiques (cefpodoxime, métronidazole et sulfaméthoxazole seul ou en association avec le triméthoprime) ainsi que de l'hespéridine dans les surnageants de culture du HGMM. L'olsalazine, la nisolpidine, la nifédipine, l'érythromycine, le diclofenac et le dioctyl phtalate sont retrouvés avec une concentration diminuée de moitié par rapport aux contrôles sans les souches.

Grâce à cette étude nous avons confirmé que les souches du microbiote intestinal peuvent avoir des interactions avec les xénobiotiques et qu'il est primordial de prendre ce phénomène en compte lors de la conception de nouvelles molécules pharmaceutiques, agroalimentaires ou bien industrielles. Le modèle *in vitro* simplifié que nous proposons pourrait contribuer à l'analyse des interactions entre xénobiotiques et microbiote intestinal.

Ce travail est actuellement en cours de rédaction et fera l'objet d'une publication prochainement.

Combination of molecular and culture-dependent approaches for studying the interactions with xenobiotics and an *in vitro* human gut microbiota model

Abdelaziz El Houari[1], Florine Ecale[1], Anne Mercier[1], Stéphanie Crapart[1], Jérôme Lapart[2], Baptiste Soulard[2], Manilduth Ramnath[2], Jean-Marc Berjeaud[1], Marie-Hélène Rodier[1-3], Alexandre Crépin[1*].

[1] Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France.

[2] Eurofins Discovery France, Le bois l'Evêque, 86600 Celle-Lévescault, France.

[3] Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU La Milétrie, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France.

Abdelaziz El Houari and Florine Ecale contributed equally to this study.

[*] Correspondence to: Alexandre Crepin. E-mail alexandre.crepin@univ-poitiers.fr , Tel: +33 5 49 45 36 38

Abstract

Culture dependent approaches as well as UHPLC-MS/MS analysis were combined to DNA-based approaches to investigate the sensitivity and explore the diversity and sensitivity of a constructed human gut microbiota model (HGMM) in response to the presences of antibiotics, drugs, and xenobiotics. At global scale, using 16S rRNA gene sequencing, the five phyla of Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, and Actinobacteria, were the most abundant. Interestingly, high diversity of strains was conserved in our constructed human gut model. Uneven richness distribution richness was revealed and the sensitivity of strains constructing the HGMM strains was mainly affected by antibiotics compared to the other xenobiotic's categories. The model constructed behaved identically to the individual cultured strains (sensitive to antibiotics and no other xenobiotics). The analysis of the culture supernatants showed the absence of certain molecules in the supernatants of the individual strains but also in those of the HGMM. These results suggest that our model can metabolize xenobiotics and the results on the individual cultures may shed light on new bacteria involved in this metabolization. From this study, we have shown that HGMM is a good, fast, stable and economical model to study the interactions between the intestinal microbiota and xenobiotics.

Key words: Human gut microbiota model, MiSeq, culture approaches, xenobiotics, sensitivity, UHPLC-MS/MS

Introduction

The human gut microbiota is defined by a set of microoganisms in close interaction with the human gut (Vrancken et al. 2019) that must be adapted to its environment changes (Ejtahed et al. 2018; Gosalbes et al. 2019) by using different strategies allowing the species that compose it to maintain themselves and to communicate with each other (Sung et al. 2017 ; Selber-Hnatiw et al. 2020). It is composed of thousands of strains of which one 50 is common to all individuals, the intestinal core microbiota (Turnbaugh et al. 2009 ; Tap et al. 2009 ; Huse et al. 2012). There is a close relationship of mutualism and reciprocal control of species in a balanced microbiota, leading to an efficient adaptive capacity (Yaffe et Relman 2020). A disturbed balance can lead to a disorganization of the species making up this microbiota (called dysbiosis) which can lead, in the case of disruption of the human microbiota, to many pathologies such as type II diabetes, obesity or even autism (Kump et al. 2013 ; Le Bastard et al. 2018 ; Zuo et al. 2018). Various factors can be involved in this imbalance such as lifestyle, genetic factors, infections, medication and especially antibiotics (G. Clarke et al. 2019). The effect of xenobiotics on the bacterial composition of microbiota has become a major interest in understanding the side effects they can induce but also in the study of specific strains that may be impacted. Furthermore, it is already known that bacteria in the intestinal microbiota can interact with xenobiotics and metabolize them to activate, reactivate or render them inactive (Haiser et al. 2014; Enright et al. 2016 ; Wilson et Nicholson 2017).

The study of the microbiota is very complex to set up and calls for heavy and expensive equipment that require culture systems such as the Humix system (Shah et al. 2014 ; J. Z. von Martels et al. 2017) or HMITM module (Marzorati et al. 2014b ; J. Z. H. von Martels 2019). In addition, these studies generally focus exclusively on the gastrointestinal model, effectively excluding the whole microbiota (Iwasaki, Akiba, et Kaunitz 2019 ; R. Nguyen et al. 2020). One of the advantages of developing *in vitro* models is being able to control very precisely and reproducibly the experiment conditions (Daina et Zoete 2016 ; Defaye et al. 2018) as well as the analysis of certain mechanisms regulating the balance

of the microbiota (Chelakkot, Ghim, et Ryu 2018), the impact of the use of various molecules on the microbiota (Montandon et Jornayvaz 2017 ; Walsh et al. 2018 ; Vila et al. 2020), and could significantly facilitate and accelerate the early screening of molecules of interest (Tsitko et al. 2019 ; T. T. Nguyen et al. 2019).

Our knowledge of the diversity and function of the gut microbiota is highly dependent on technological developments. Recent advances in molecular techniques (DNA-based approaches such as high throughput sequencing), have made it possible to visualize the diversity, the function and the dynamic of the gut microbial communities in intimate association with the lining of the gut (Lau et al. 2016a ; Audebert et al. 2016; Panek, Paljetak, et al. 2018; Frankel et al. 2017). However, given the complexity of the interactions and the number of microbial species found in the different microbiota, it appears necessary to develop simplified models allowing the culture of certain model microcosms (J. Z. von Martels et al. 2017 ; Villa et al. 2019 ; Silverman et al. 2018) and the study, through these models, of the activity and the becoming of exogenous molecules, developed by the pharmaceutical or agri-food industry, in contact with the human microbiota (Maier, Pruteanu, Kuhn, Zeller, Telzerow, Anderson, Brochado, Fernandez, Dose, et Mori 2018; M. Zimmermann et al. 2019a).

In this context, we have studied the impact that different xenobiotics (pharmaceutical, agri-food, industrial) could have on strains of the core intestinal microbiota and on a constructed an *in vitro* Human Gut Microbiota Model (HGMM). A first part of this study consisted in studying the effects of xenobiotics on the growth of single strains via a culture approach and in evaluating the effect of these same strains on molecules using UHPLC-MS/MS analyses. A second part of the work was to build the HGMM and to study the diversity and abundance (through combination of molecular and culture dependent approaches) of its microbial communities. Finally, the high throughput sequencing analysis of the V5-V7 region of the 16S rRNA gene of the HGMM in the presence of the xenobiotics was undertaken as well as the fate of the xenobiotics (by UHPLC-MS/MS) in order to reveal and evaluate the impact of the HGMM on the tested compounds.

Material and methods

Source of microorganisms, cultivation medium, growth conditions and molecules

A total of 39 strains of the representative panel of human gut core microbial species (Maier et al 2018) were selected to study their behaviour towards different molecules and to construct human gut microbiota model. The bacterial strains (Table 1) used alone or to construct the HGMM were purchased from ATCC (American Type Culture Collection) and DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) collections of microorganisms and stored at -80°C in glycerol/mGAM (50% v/v). The culture of the strains alone and HGMM are carried out in sterile Modified Gifu Anaerobic Medium Broth (mGAM Broth, HyServe) at pH 7.3 final. The mGAM medium (sterilized by autoclaving at 115 °C for 15 minutes), allowing the growth of all tested strains, was supplemented with resazurin 0.1% (w/v) as an anaerobiosis indicator. Pre-culture, culture and strain growth maintenance procedures for HGMM were performed at 37°C and using mGAM broth using Hungate tube techniques as described by El Houari et al (2017). The medium was anaerobically distributed in appropriate containers (Hungate tubes or penicillin vials) under N2/CO2/H2 without O2 (80/20, v/v).

All the molecules tested were purchased from Sigma Aldrich, resuspended in mGAM broth or DMSO (Sigma Aldrich) and stored at -20°C. The molecules are presented in table 2 and classified according to 3 main categories: antibiotics, drugs and xenobiotics.

Human Gut Microbiota Model construction

Each strain was cultivated separately under strict anaerobic conditions at final volume of 5 ml using mGAM medium. Inoculations (5%, v/v) were made using exponentially growing cells. After incubation at 37 ºC for 48 hours, 1 mL of each of the 39 strains was taken and were pooled together in a 100 mL

penicillin flask to construct a representative *in vitro* human gut microbiota consortium. The consortium (mixture of 39 strains) was sub-cultured 3 times and incubated in the same conditions of growth to obtain a stable inoculum for further xenobiotic/drug experiments.

Sensitivity of strains and the Human Gut Microbiota Model against the antibiotics, drugs and xenobiotics

For the HGMM, all tests were performed in duplicate (final volume of 5 ml) at 37 °C and pH 7.3. Inoculation (5%, v/v) was made using exponentially growing cells on mGAM medium from the third subculture of the HGMM. The sensitivity of the gut microbiota model was determined with respect to the antibiotics (tested alone or in combination), drugs and xenobiotics added to the Hungate tubes at final concentrations as showed in Table 2. Growth was determined by monitoring changes in OD_{595nm} using a spectrophotometer (Camspec spectrophotometer, M107) compared with appropriate negative controls and positive controls. (mGAM + in our study) After 48h of incubation, the final OD_{595nm} was recorded, then the bacterial cell pellets were harvested from cultures by centrifugation (15 min, 4 ºC, 5000 rpm) for further DNA-based approaches analysis. The supernatant from each tested molecule was stored at -80 ºC for UHPLC-MS/MS analysis.

In other hand, the same molecules were tested separately for each single strain used to construct the HGMM. Strains were first grown on solid medium (using mGAM agar) and incubated for 48 hours and then used to prepare precultures in final volume of 5 mL of mGAM broth. After an overnight incubation at 37°C under anaerobic conditions, the suspensions were adjusted to 1.10^7 CFU/mL and placed in 96-well plates. The different molecules are added at the same concentrations indicated in Table 2. After 48h incubation, the OD_{595nm} were measured. The cultures are then centrifuged (30min, 4°C, 2500 rpm) and the supernatants are harvested, transferred to a new 96-well plate and stored at -20°C for analysis by UHPLC-MS/MS. The entire procedure was performed in triplicates and in anaerobic condition using an anaerobic chamber (Bactron 300, Blanc Labo SA, Switzerland) containing 90% N2, 5% H_2 and 5% CO_2.

Extraction of genomic DNA and high throughput sequencing

DNA was extracted from pelleted cells using the QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit with the QIAcube workstation according to Qiagen's instructions. Samples were previously homogenized twice for 20 s at speed 5.5 m/s with a bead beater (FastPrep instrument, MP Biomedicals). The integrity of the DNA samples was observed with 0.8% agarose gel electrophoresis. The amount of extracted DNA was quantified using a NanoDropTM One spectrophotometer (Thermo ScientificTM). DNA samples were diluted to a standard concentration of 5 ng/µL and stored at -20 °C until use for molecular applications. Bacterial community structure was assessed by sequencing the hypervariable V5–V7 region within the 16S rRNA gene. The V5-V7 region was amplified with the primers 799F (5'-AACAGGATTAGATACCCTGG-3') and 1193R (5'-ACGTCYTCCCCACCTTCC-3');(Beckers, Op De Beeck, et al. 2016). All PCR reactions were prepared in triplicate for each sample in a total volume of 25 µL PCR mix with 0.3 µM of each forward and reverse primer, 1X PCR mix buffer with 200 mM of each dNTP and 1U of Q5 high fidelity DNA polymerase (NEB), using a vapo.protect™ Mastercycler (Eppendorf). PCR cycling was performed at 98°C for 30 s, followed by 25 cycles at 98°C for 10 s, 56°C for 15 s and 72°C for 10 s and a final elongation at 72°C for 2 min. The amplified products were checked by 2% agarose gel electrophoresis. Triplicate PCR products for each sample were pooled, purified using the PCR clean-up Kit with the QIAcube workstation according to the manufacturer's instructions (Qiagen) and quantified using a Qubit 2 fluorimeter (Invitrogen). Sequencing was done on the Illumina MiSeq sequencing platform with the V3 Illumina kit (2 × 300 bp paired-end reads) at the ICM Institute (Paris, France; https://icm-institute.org/fr/) according to standard protocols.

Raw datasets of sequencing can be found into the NCBI Sequence Read Archive database.

Processing of sequencing data from Illumina MiSEQ, statistical analysis and phylogenetic relationship

Bioinformatics data treatments were performed following the QIIME2 pipeline (Bolyen, Rideout, Dillon, Bokulich, Abnet, Al-Ghalith, et al. 2019). Operational taxonomic units (OTUs) were grouped at

an identity threshold of 97%. From the taxonomic affiliation, a representative sequence of each OTU affiliated was extracted. Finally, a normalization of the abundances found for each OTU was carried out by the DESeq method (Anders, Reyes, et Huber 2012a). Diversity and evenness indices (Chao et al. 2014b) were calculated using the bacterial OTUs data after normalization using DESeq method. The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method (Felsenstein, 1981). An alignment was then carried out between OTUs; the alignment was used to build a phylogenetic tree with PhyML algorithm (Guindon et al. 2010a). The statistical calculations and multivariate analyses were conducted using R software package (https://www.r-project.org/) with the following libraries: phyloseq, vegan, ape, heatmap2, gclus, ggplot2, GUniFrac, grid and optparse. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the mean values with respect to sampling sites. A principal component analysis (PCA) was performed to evaluate the microbial community composition of the samples. For phylogenetic analysis, an alignment was carried for OTUs sequences. Each OTU was blasted to the NCBI database for identification and taxonomic affiliation at species level. The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method and conducted in UGENE software (Golosova et al. 2014b).

Xenobiotics- quantification by UHPLC-MS/MS method

UHPLC-MS/MS analysis was performed by a 1290 Infinity Binary LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a triple quadrupole or Q-TOF, Q-TRAP 5500 mass spectrometer with an ESI Turbo V ion source (SCIEX, Foster City, CA, USA) or a 6550 iFunnel accurate mass quadrupole time of flight tandem mass spectrometer with a dual Agilent Jet Stream source (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, USA), respectively.

Chromatographic separation was performed on C_{18} column, Poroshell 120 EC-C18 (Agilent) or Atlantis™ Premier BEH C18 AX (Waters) for analysis using Q-TRAP or Q-TOF, respectively. The mobile phase consisted of two solutions including solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile), the column was thermostated in an oven at 35°C and the flow rate was set

to 650 µl/min. The chromatographic gradient used for each of the compounds was specific; all details are showed in Table 3 and 4.

For mass spectrometry analysis using triple quadrupole, data was acquired using electrospray ionization (ESI) in the positive mode, the ion Spray Voltage was set at 5 500 V. Data was also acquired in negative mode, the ion Spray Voltage was set at -4 500V. The desolvation in source was accomplished using the following set parameters: Temperature (TEM) at 600 °C, Ion Source Gas 1 (GS1) at 40 PSI, Ion Source Gas 2 (GS2) at 60 PSI, and Curtain Gas (CUR) at 30 PSI. The specific parameters of multiple reaction monitoring which permit to quantify and monitor the compounds are described in Table 5. Raw data was processed in Sciex Analyst and individual AUC (area under the curve) for each analyte in each sample was determined using the MultiQuant software.

For mass spectrometry analysis using Q-TOF, data was acquired using electrospray ionization (ESI) in positive and negative modes. The Capillary Voltage (Vcap), Nozzle Voltage, Fragmentor and Octopole RF peak were set at 4 000 V in positive and in negative mode, 500 V, 350 V and 750 V, respectively. The desolvation in source was accomplished by using the following parameters: Gas temperature at 230 °C, Drying gas flow at 15 L/min, Nebulizer at 40 psig, Sheath gas temperature at 280 °C and Sheath gas flow at 11 L/min. The profile and centroid data were collected from 100-1700 m/z with an acquisition rate of 3 spectra per second. Raw Data were processed in Agilent MassHunter and individual AUC (area under the curve) for each analyte in each sample was determined using the MassHunter Quantitative software.

Results

The construction of the human gut microbiota model

The 39 strains from the representative panel of human gut microbial species were pooled together to construct the artificial human gut microbiota model. To perform the experiments using a stable model, the constructed model was subcultured three timed before its use as inoculum. The stability of our

model was followed by high-throughput sequencing during the three subcultures C1, C2 and C3. The comparison of the relative abundance of populations at phylum level of each consortium (Figure 1) showed a decrease in the abundance of Firmicutes (from 64.6% to 35.9%) in favor of Fusobacteria (increase from 0.2% to 14.7%) and Bacteroidetes (increase from 14.3% to 31.6%) between C1 and C3. Considering all the three subcultures samples, the C3 and the positive control (mGAM+) were regrouped together and could be separated from C1 and C2 along axis PC1 explaining 86.5% of the difference (Figure 1.a). However, the comparison of C3 and the positive control (qualified as the fourth subculture of the HGMM) revealed that there was no significant difference between the percentages of the most abundant five phyla (Figure 1.b). These findings were in accordance with the Permanova test for analysis of variance using Bray-Curtis distance matrices showing no significant differences between C3 and the positive control (*p-value*: 0.001). These finding confirm the stability of the HGMM before use during the experiments.

Global analysis of microbial communities structure

A total of 41 samples of antibiotics, drugs, xenobiotics and controls were tested and analysed in duplicates from an in vitro human gut microbiota model. 3,729,686 sequences were found out after MiSeq sequencing. Among them, 3,290,572 were retained corresponding to 88.2 % of the effective sequences obtained with a mean length of 277 bp. The number of OTUs found at 97% similarity was 385. The OTUs number threshold for the antibiotics was significantly below all other samples with a low value of 151 ± 4 OTUs obtained for the metronidazole (Table 3), whereas the maximum OTUs number was recorded in the presence of irinotecan (302 ± 13). The diversity indexes listed in Table 3 were lower for the sample metronidazole whatever the selected indexes. The low values found for Shannon index, Simpson and reciprocal Simpson index, compared to Chao1 indicated an uneven distribution of the populations in the samples.

The comparison of the relative abundance of populations of the both replicates showed that there was no significant difference between the percentages of the most abundant phyla in the same

sample. These results were confirmed by the Principal Component Analysis (Figure 2) based on the weighted UniFrac β-diversity metric and showing that the duplicates for each sample were closely grouped together. As a result, from now on, the duplicates will be grouped and presented together (mean values of two replicates). Considering all the samples, the antibiotics samples could be separated from the all other samples along axis PC1 explaining 51.81% of the difference (Figure 2.a). Another principal Component analysis focused on the remain samples, regrouped in one pool, revealed a distribution of samples along the first axis, explaining 54.26% of the difference (Figure 2.b).

Sensitivity of the microbial communities of the human gut microbiota model

To study the sensitivity of microbial communities of the HGMM in all samples at the phylum level, a histogram based on the most abundant five phyla constructing the human gut microbiota model is presented (Figure 3). The 385 OTUs were taxonomically affiliated and grouped into five different phyla based on their relative abundance. The Firmicutes (ranged from 19.8% to 66.1%) were the most abundant in all samples, followed by Bacteroidetes (from 9.5% to 38.1%), Proteobacteria (from 0.9% to 29.5%), Fusobacteria (from 19.8% to 23.5%) and finally Actinobacteria (from 0.4% to 11.8%). Compared to the respective positive control, the relative abundance of microbial communities changed mainly in response to the presence of the antibiotics. These results were in accordance of those represented in Figure 2. The Proteobacteria phylum was sensitive to the cefpodoxime, erythromycin, trimethoprim, and STX. However, the Fusobacteria were sensitive to the amoxicillin, cefpodoxime, erythromycin, sulfamethoxazole, and STX. The Bacteroidetes were affected in presence of metronidazole, trimethoprim, sulfamethoxazole, and STX. The Actinobacteria were sensitive to the both erythromycin and moxifloxacin. Whereas Firmicutes were inhibited in presence of the moxifloxacin. In addition, when excluding the antibiotics from the all tested molecules, the remains samples showed a similar profile compared the mGAM+, indicating no considerable changes in the relative abundances of the of drugs/xenobiotics categories: allergy, analgesics, antidepressant,

cardiology-angiology, hepatology-gastroenterology, metabolism-nutrient, nonsteroidal anti-inflammatory, oncology-haematology, pesticides, plastics industry and preservatives (Figure 3).

As an alternative approach to identify the active strains in each sample, the OTUs sequences founded in all samples by high throughput sequencing were identified and classified after taxonomic affiliation at species level. The sensitivity of the strains found out in samples was evaluated and represented in a heatmap (Figure 4) based on the relative abundances of each strain into all samples of antibiotics, drugs, xenobiotics, subcultures and the positive control. At global scale, among the 39 strains of the HGMM, a total of 30 strains were present into different samples. These strains could be regrouped grouped into five clusters based on the sensitivity and their behaviour in the presence of the tested molecules. The Cluster I (consists of *Ruminococcus bromii*, *Bacteroides ovatus*, and *Ruminococcus torques*) was the most sensitive and therefore less abundant, followed by cluster III and cluster II. *R. bromii* and *B. ovatus* from Cluster I was not detected in all samples (except C1). The maximum of relative abundance (4.7%) was detected for *B. ovatus* in presence of metronidazole. Strains of Cluster II were detected present in all samples except erythromycin and metronidazole where *Bilophila wadsworthia* and *Parabacteroides distasonis* were completely inhibited. The maximum relative abundance (8.04%) in Cluster II was recorded for *P. distasonis* in presence of trimethoprim. Regarding the Cluster III, *Bifidobacterium longum* was completely inhibited by trimethoprim, sulfamethoxazole, STX, and erythromycin. However, *Blautia obeum* was absent in presence of metronidazole, erythromycin, and methylparaben. *Faecalibacterium prausnitzii* was inhibited by metronidazole, moxifloxacin, and erythromycin. *Clostridium leptum* was completely inhibited by metronidazole and erythromycin. Finally, *Streptococcus parasanguinis* was absent in presence of sulfamethoxazole. The maximum relative abundance (8.3%) was obtained for cluster III was for *Bacteroides caccae* in presence of erythromycin. The Cluster IV and Cluster V were the most abundant and therefore the most resistant to the tested molecules. The maximum of relative abundance was detected for Cluster V for *Bacteroidetes thetaiotaomicron* in presence of erythromycin (14.32%). However, relative abundance of 13.56% was detected as maximum for *Enterococcus faecalis* in presence of STX. At global

scale, these results were in accordance to the findings of Figure 2 and Figure 3 revealing the human gut model was affected mainly by antibiotics compared to the drugs and xenobiotics.

Sensitivity of strains composing the core intestinal microbiota in the presence of xenobiotics

In order to study the sensitivity of the strains composing the intestinal core microbiota of the bacterial cultures of each bacterium were carried out in the presence of the molecules mentioned in Table 2. The results presented in (Figure 5) show the percentage of growth of each strain in the presence of the molecules calculated compared to the control without molecules. The blue colour indicates complete inhibition of growth while the dark red colour indicates a higher growth than the control. The molecules that most impact the growth of the different strains tested are antibiotics such as, amoxicillin, metronidazole, couple STX, moxifloxacin, erythromycin and cefpodoxime. Drugs and xenobiotics have a very low impact of strain growth and would even tend to increase strain growth for some. The results are detailed below.

Antibiotics: In the presence of amoxicillin, 10 strains belonging to all phyla have 75% growth inhibition (*B. vulgatus*, *O. splanchnicus*, *E. coli*, *A. muciniphila*, *C. perfringens*, *C. comes*, *F. prausnitzii*, *L. rhamnosus*, *R. flavefaciens* and *C. aerofaciens*). 4 strains belonging to the Bacteroidetes phylum (*P. merdae*, *B. fragilis*, *B. caccae* and *P. copri*) have increased growth compared to their controls, as well as the *S. salivarius* strain belonging to the Firmicutes. The other strains in the panel have a growth inhibition of about 50% in the presence of amoxicillin. Metronidazole inhibits the growth of the strains by about 40% with 6 strains where the inhibition is greater than 75%. Only the growth of 7 strains is not impacted in the presence of metronidazole. STX has very little impact on the growth of the panel strains. Only two strains are inhibited at more than 75%. 14 strains have identical growth to the controls in the presence of sulfamethoxazole and trimethoprim and two bacteria have superior growth to the controls (*B. ovatus* and *S. salivarius*). When trimethoprim and sulfamethoxazole are introduced alone into the cultures no significant growth inhibition is observed with an average growth percentage of 84% and 96% respectively. Moxifloxacin inhibits the growth of 4 strains at more than

75%. Only 9 strains have growth identical to the controls. On average, this antibiotic inhibits the growth of the strains in our panel by approximately 66%. The average inhibition in the presence of erythromycin is also 66%. This antibiotic inhibits the growth of 5 strains by more than 75% (*V. vulgatus*, *B. fragilis*, *P. distasonis*, *O. splanchnicus* and *C. comes*). Only 7 strains have a growth like the controls without antibiotic. In the presence of the last antibiotic tested, only 4 strains grow at less than 25% (*P. distasonis*, *O. splanchnicus*, *C. comes* and *S. salivarius*). 16 strains from our panel are not affected in the presence of cefpodoxime.

Cardiology-angiology: The addition of bisoprolol to the different bacterial cultures composing the intestinal microbiota core does not induce a decrease in growth compared to control cultures without the molecule (between 90% and 168% growth). However, *B. wadsworthia* (157%), *E. coli* (130%), *A. muciniphila* (121%), *C. saccharolyticum* (144%) and *E. lenta* (168%) see their growth increased in the presence of this beta-blocker. In the presence of nisolpidine and nifedipine, two structurally related molecules, bacterial growth is not significantly inhibited. Only *P. copri* is slightly inhibited (26% growth inhibition in the presence of nisolpidine and 14% in the presence of nifedipine. On the other hand, *B. wadsworthia* growth is superior to the control in the presence of nisolpidine (160% growth inhibition). Similar results are found in the presence of nifedipine with 153% growth for *B. wadsworthia*. The growth of *E. lenta* was also increased in the presence of nifedipine (187% growth). As for hesperidin, it inhibits the growth of *V. parvula* by 38%. The growth of the other strains is only slightly affected.

Oncology-haematology: In the presence of topotecan and mercaptopurine, the growth of the bacteria *P. copri* and *A. muciniphila* is weakly inhibited (about 40% inhibition in the presence of mercaptopurine and an average of 20% inhibition in the presence of topotecan). *B. wadsworthia* (155% growth on average) and *E. lenta* (165% growth on average) have higher growth than control in the presence of these anticancer drugs. In the presence of irinotecan, only *P. merdae* and *A. muciniphila* have inhibited growth (40% inhibition). The growth of the other strains is not impacted in the presence of irinotecan.

When warfarin is added to bacterial cultures, only *C. comes* has 40% growth inhibition. The growth of the other strains is only slightly affected by the molecule.

Hepatology-gastroenterology: *B. adolescentis* is the only bacterium whose growth is slightly inhibited in the presence of omeprazole (43% growth inhibition) and olzalasin (28% growth inhibition). No bacteria whose growth is increased in the presence of these two molecules were found.

Analgesic: Acetaminophen does not inhibit the growth of any of our strains under our culture conditions. However, we can notice that the growth of some strains is increased in the presence of the analgesic. This is notably the case for *E. lenta* with 188% growth compared to the culture without the molecule. To a lesser extent the growth of *C. saccharolyticum* is increased by 140% and that of the two proteobacteria, *B. wadsworthia* and *E. coli* are respectively increased by 131% and 120%.

Nonsteroidal anti-inflammatory: Strain growth is identical in the presence of diclofenac and aceclofenac. Only *P. copri* is slightly inhibited by approximately 30% in the presence of these anti-inflammatory molecules. Growth is increased in Proteobacteria with 162% growth for *B. wadsworthia* and 130% for *E. coli* in the presence of diclofenac and 157% and 124% growth respectively in the presence of aceclofenac. The bacterial strain with the highest growth rate is *E. lenta* (160% growth).

Allergy: Fexofenadine does not inhibit the growth of the strains in our panel. However, some strains have a higher growth rate in the presence of the antihistamine. This is the case for the two Proteobacteria in our panel with 161% growth for *B. wadsworthia* and 133% for *E. coli*. This is also the case for *B. obeum* and *D. formicigenerans* with 126% growth, 141% for *C. saccharolyticum* and 156% for *E. lenta*.

Antidepressant: Clomipramine increases the growth of Proteobacteria, *E. coli* (144% growth) and *B. wadsworthia* (142%) as well as *B. obeum* (138%), *C. saccharolyticum* (145%), *D. formicigenerans* (134%), *R. torques* (139%) and *E. lenta* (194%).

Metabolism-nutrient: Ascorbic acid, or vitamin C, inhibits the growth of the panel strains to little or no extent (18% growth inhibition for *P. copri*). However, the growth of some strains is strongly increased in the presence of the molecule. This is the case for *B. wadsworthia* (165% growth), *E. coli* (132%), *C. saccharolyticum* (147%) and for *E. lenta* with 195% growth.

Preservatives: The growth of strains in the presence of parabens is not inhibited. Compared to the other results, those of some strains are significantly increased. This is the case for *B. wadsworthia* with an average growth rate of 138% in the presence of parabens. The growth of *A. muciniphila* is slightly increased in the presence of methylparaben (117% growth), strongly increased in the presence of butylparaben (172% growth) and tripled in the presence of propylparaben (307% growth). In the presence of methylparaben and butylparaben the growth of the *C. saccharolyticum* strain is more important with 121% and 130% growth respectively. *B. adolescentis* growth is also increased in the presence of the three parabens tested, 153% growth with methylparaben, 136% with propylparaben and 173% with butylparaben. Identically to almost all xenobiotics tested, the growth of the *E. lenta* strain is also strongly increased, 231% growth with methylparaben, 189% with propylparaben and 148% with butylparaben.

Pesticides: In the presence of the tested pesticides, no significant growth inhibition was observed except in the presence of pyrimethanil for *B. obeum* with 48% growth inhibition. Glyphosate does not impact the growth of the strains in our panel. In the presence of difenoconazole, *S. saccharolyticum* (135% growth), *D. formicigenerans* (131% growth), *R. torques* (121% growth), *V. parvula* (121% growth), *B. adolescentis* (123% growth) and *E. lenta* with 163% growth had a slightly increased growth compared to the control cultures without the molecule. In the presence of pyrimethanil, 5 strains are slightly increased in growth. This is the case for *B. wadsworthia* (134% growth) and *E. coli* (124% growth), *C. saccharolyticum* (142% growth), *E. eligens* (121% growth) and *R. torques* (124% growth). The growth of *B. adolescentis* and *E. lenta* it is strongly increased in the presence of this pesticide with respectively 179% growth and 200% growth. In the presence of fludioxonil 4 strains have their growth

slightly increased, about 120% for *E. coli*, *C. saccharolyticum*, *R. flavefaciens* and *V. parvula*. As for *E. lenta*, its growth is 180% in the presence of fludioxonil.

From plastics industry: In the presence of bisphenol A, the growth of the strains is not inhibited but would rather be slightly increased with an average growth rate of 114%. However, 3 strains stand out, *B. wadsworthia*, *B. adolescentis* and *E. lenta* with respectively 143%, 163% and 213% growth.

In the presence of Di-isobutyl phthalate, all strains grow identically to the control without the molecule. *E. lenta* (205%), *B. adolescentis* (144%) and *B. wadsworthia* (140%) grow more in the presence of the molecule than without. The same growth profile is observed in the presence of Di-n-butyl phthalate with an average growth rate of 110% compared to cultures without the molecule. *B. adolescentis* (144% growth) and *E. lenta* (164%) grow more in the presence of this phthalate. Only the growth of the *B. wadsworthia* strain is inhibited in the presence of dioctyl phthalate. The growth of the other strains is identical to that of the controls in the absence of the molecule. Two strains have superior growth compared to their control, *B. wadsworthia* (151%) and *E. lenta* (365%).

Analysis of bacterial supernatants in the presence of xenobiotics

Human Gut Microbiota Model

Figure 6 combines the results of growth and chemical modification (UHPLC-MS/MS) of HGMM in the presence of all the molecules tested. The data have been transformed into percentage growth and percentage chemical modification in order to harmonize them and make them easier to read. 5 clusters can be observed from this representation. The first is characterized by molecules that do not impact the growth of HGMM but whose basic structures were not found in the culture supernatants (approximately 100% chemical modification). This is the case for 4 antibiotics, metronidazole, cefpodoxime, sulfamethoxazole when alone and when coupled with trimethoprim as well as for one drug, hesperidin. A second cluster appears when the growth of HGMM is not impacted and the structures of the molecules are modified between 50 and 75%. In this category, there are 4 drugs

(olzalasin, nisolpidine, nifedipine and diclofenac sodium), one antibiotic (erythromycin) and one xenobiotic (dioctyl phthalate). The third cluster comprises the 6 molecules whose basic structures are modified by approximately 25%. One drug, fexofenadine hydrochloride, and 5 xenobiotics (difenoconazole, pyrimethanil, fludioxonil, butylparaben and propylparaben) are thus listed. The 4th cluster represents the molecules that do not inhibit the growth of HGMM and therefore the basic structures are found identically to those of the controls. Here are found 3 antibiotics (amoxicillin, trimethoprim alone or coupled with sulfamethoxazole), 10 drugs (acetaminophen, warfarin, bisoprolol, aceclofenac, irinotecan), mercaptopurine, ascorbic acid, omeprazol, topotecan and clomipramine hydrochloride) and 6 xenobiotics (di-isobutyl phthalate, di-n-butyl phthalate solution, boscalid, bisphenol A and glyphosate). The last cluster includes only one molecule, an antibiotic which is moxifloxacin. This is the only molecule that inhibits the growth of our MGH and whose basic structure is not modified at all according to UHPLC-MS/MS analyses.

Individuals strains

The impact of the bacterial strains making up the intestinal microbiota core on the different xenobiotics was studied by UHPLC-MS/MS. The disappearance of the initial structure of the different molecules was quantified in the bacterial supernatants. The results presented in (Figure 7) indicate the % disappearance of each molecule in the bacterial supernatants compared to the control carried out without the bacteria. In order to ensure that the molecules do not degrade under our culture conditions, they were incubated under the same culture conditions but without the bacteria. This condition will be considered as control in our analysis. The blue colour indicates that there is no disappearance of the molecule in the supernatant and the dark red colour indicates that the basic structure of the molecule has completely disappeared from the supernatant. For the sake of clarity, the results are presented according to the different classes of molecules shown in Table 2.

Antibiotics: Overall, antibiotics are found in culture supernatants. Metronidazole is found identically to control in only 5 culture supernatants (*B. caccae*, *P. distasonis*, *F. nucleatum*, *B. wadsworthia* and

C. leptum). The antibiotic is absent from the supernatants of 16 bacteria. On average the structure of metronidazole disappears from culture supernatants by about 76%. The basic structure of sulfamethoxazole alone or in couple is also absent from some disappearance of 66% and 67% respectively. Surprisingly, it is not the same strains that impact the disappearance of sulfamethoxazole. The antibiotic is absent (more than 90% chemical modification) in 5 bacterial supernatants: *C. comes*, *D. formicigenerans*, *F. prausnitzii*, *S. parasanguinis* and *C. aerofaciens*. Despite the same mean disappearance, the number of strain or sulfamethoxazole is absent in 12 bacterial supernatants with only two strains in common (*D. formicigenerans* and *C. aerofaciens*). Cefpodoxime is absent (more than 90%) in 7 supernatants and found identically to controls in 9 supernatants. The average disappearance rate for this antibiotic is 50%. Moxifloxacin is absent from only two supernatants (*C. perfringens* and *S. parasanguinis*). The average disappearance of this antibiotic is 24%. Erythromycin is absent from 3 supernatants (*B. thetaiotaomicron*, *B. caccae* and *C. perfringens*) with an average disappearance rate of 31%. As for trimethoprim, the percentages of modification are identical when the antibiotic is used alone or in the presence of sulfamethoxazole. The only strain where the antibiotic is absent from the supernatant is *F. nucleatum*. The chemical modification profiles of trimethoprim are identical whether the antibiotic is used alone or in combination with trimethoprim.

Cardiology- angiology: The structure of bisoprolol is found intact in all supernatants. There is a slight disappearance of the basic structure of bisoprolol in the supernatants of *C. difficile* (19% disappearance) and *F. prausnitzii* (24% disappearance). The basic structure of nisolpidine is found on average at 50% in the culture supernatants of half of the strains. However, in some supernatants, the nisolpidine concentration is identical to that in the control condition. This is the case for the strains *B. ovatus*, *E. coli* and *A. muciniphila*. Conversely, the molecule is not found in the supernatants of *C. perfringens* and *D. formicigenerans* (respectively 99% disappearance). The basic structure of nifedipine is found in the same consultation as in the control conditions for 27 bacterial supernatants. Only 5 bacterial supernatants saw the quantity of nifedipine decreased, *C. saccharolyticum* (75%

disappearance), *C. perfringens* (99% disappearance), *D. formicigenerans* (99% disappearance), *R. gnavus* (59% disappearance) and *C. aerofaciens* with 62% disappearance. The percentage of disappearance of hesperidin in supernatants is on average 43% for all strains, with 5 bacterial supernatants where the molecule is found in an identical way to the control condition and 4 where the basic structure of the molecule is not found.

Oncology-hematology: LC-MS/MS analysis revealed the absence of the basic structure of warfarin in 3 culture supernatants which are *B. uniformis* (83% disappearance), *B. fragilis* (91% disappearance) and *F. nucleatum* (99% disappearance). Warfarin is found in 11 bacterial supernatants at concentrations identical to control conditions. The basic structure of topotecan is strongly found in bacterial supernatants. The amount of the initial structure of topotecan is halved in only two bacteria, *E. coli* and *E. lenta*. As for mercaptopurine, its basic structure is absent or almost absent in 7 bacterial supernatants and is found in identical concentration in 15 supernatants.

Hepatology-gastroenterology: UHPLC-MS/MS analyses show two clusters for olsalazine. Either the basic structure is found identical to the control (8 supernatants) or the molecule is absent (21 supernatants). Omeprazole is found very little in the culture supernatants with an average percentage of disappearance of 80%. Its concentration is identical to the control for only 2 bacteria which are *E. faecalis* and *F. prausnitzii*. As for hesperidin, its basic structure is found identical to the control in 4 supernatants with an average percentage of disappearance of 44%.

Analgesic: The structure of acetaminophen is not or only slightly degraded in the presence of bacteria, with a maximum of 3% modification.

Nonsteroidal anti-inflammatory: Aceclofenac is found in all culture supernatants. In 11 supernatants, the same amount of aceclofenac is found as in the control condition. However, 60% of the molecule has disappeared in the supernatant of *F. prausnitzii*. As for diclofenac, it disappeared by half in almost all supernatants. The greatest disappearance is found in the supernatant of *B. thetaiotaomicron* with 73% disappearance of the molecule.

Allergy: LC-MS/MS results show that fexofenadine is absent by half in almost all culture supernatants. Nevertheless, the molecule is found almost identically to the control conditions without the molecule (less than 20% disappearance) in 5 bacillary supernatants, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *E. coli*, *B. obeum* and *C. perfringens*. Fexofenadine disappeared at about 70% in only 3 supernatants, *B. wadsworthia*, *F. prausnitzii* and *L. rhamnosus*.

Antidepressant: Clomipramine is found identically to the control in the supernatant of *R. gnavus* (5% disappearance). The molecule is 85% absent in the supernatant of *O. splanchnicus*. The average disappearance of clomipramine in culture supernatant is 62%.

Metabolism-nutrient: Data is not available for acid ascorbic. Indeed, the molecule has oxidized in our culture medium in the control samples.

Preservatives: The basic structure of butylparaben is not found at the same concentration as the control in any of the culture supernatants. There is an average 42% disappearance of the molecule in all supernatants. The results are different for propylparaben and methylparaben. The concentration of propylparaben is found, in its basic structure, identical to the control in 10 bacterial supernatants (*B. ovatus*, *C. difficile*, *C. leptum*, *C. ramosum*, *C. saccharolyticum*, *C. perfringens*, *C. comes*, *L. rhamnosus* and *R. gnavus*). There is little disappearance of propylparaben from supernatants with an average of 15% disappearance. This is also the case for methylparaben, with an average of 21% disappearance. The basic structure of methylparaben is found at the same concentration as in the control condition in 8 bacterial supernatants (*B. caccae*, *B. ovatus*, *O. splanchnicus*, *C. difficile*, *C. ramosum*, *C. perfringens F. prausnitzii* and *R. gnavus*). However, the basic structure of methylparaben is not found in the supernatants of *A. muciniphila* and *B. obeum*.

Pesticides: The basic structure of difenoconazole is found at the same concentration as in the control condition in only two bacterial supernatants, *B. ovatus* and *P. copri*. The average disappearance of this pesticide in the supernatants is 44%. It is in the *B. fragilis* supernatant that one finds the least difenoconazole in its basic structure with 72% disappearance. Fludioxonil disappears very little in

culture supernatants with an average disappearance rate of 14%. The molecule is found in its basic structure and at the same concentration as in the control in 15 culture supernatants. The structure of fludioxonil disappears on average by half in the supernatants of 6 bacteria which are *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *P. merdae*, *O. splanchnicus* and *C. perfringens*. As for pyrimethanil, its structure is strongly found in bacterial supernatants with an average disappearance rate of 22%. One finds the structure of the molecule at the same concentration as in the control in 5 supernatants which are *P. merdae*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *E. eligens* and *L. rhamnosus*.

From plastics industry: *A. muciniphila* is the only strain in the panel that does not alter the structure of di-n-butyl phthalate. The percentage of disappearance of the molecule in culture supernatants averages 56%. It is the same strains as for di-isobutyl phthalate that modify more than 80% of the basic structure. The results of LC-MS/MS indicate that the structure of dioctyl phthalate is modified on average by 19%. 14 strains do not modify the structure of the phthalate at all. Only *O. splanchnicus* modifies dioctyl phthalate at 78%.

Discussion

Molecular approach discussion

In this study we analysed the effects that xenobiotics may have on both single-cultured strains of the intestinal microbiota core and on an *in vitro* human gut microbiota model (HGMM) that we developed. In parallel, we also determined the effect that strains and HGMM may have on the tested xenobiotics. The HGMM used in this study was constructed using the 39 abundant species (Maier, Pruteanu, Kuhn, Zeller, Telzerow, Anderson, Brochado, Fernandez, Dose, et Mori 2018 ; M. Zimmermann et al. 2019a ; Johnson et al. 2019) belonging to the most common dominant phyla in human gut microbiota (Lozupone et al. 2012 ; Almeida et al. 2019; Wanga et al. 2019). The gut microbiota consists of hundreds of bacterial species showing a stability over times (Faith et al. 2013 ; Hisada, Endoh, et Kuriki 2015). This stability can be disturbed by some perturbations such as dietary or drugs administration that may affect the function and the diversity of the gut microbiota (Relman 2012 ; Hemarajata et

Versalovic 2013). Using a stable microbiota is mandatory to analyze and predict the behaviors of microbial communities in an in vitro human gut model. In this study, the 16S rRNA gene high-throughput sequencing results showed the stability of our constructed model through subculturing and no significance difference was observed after the third subculturing (Figure 1.a). During the subculturing, a decrease mainly in abundances of the Firmicutes and Proteobacteria (Figure 1.b) in favor Bacteroidetes and Fusobacteria was observed. This changes in abundances could be explained by syntrophic and competition interactions between the 39 strains. These interactions reveal a positive and negative responses allowing the dominances of some phyla in favor of others (Foster et Bell 2012; Hibbing et al. 2010).

At global scale, the five phyla (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria and Actinobacteria) were found to be present in the stable HGMM. These results were consistent with other studies reporting that these phyla were known to dominate the human gut microbiota (Lizumi et al. 2017 ; Senghor et al. 2018 ; Rinninella, Raoul, et al. 2019). The diversity analysis of the microbial communities composition of the constructed HGMM showed the presence of 385 OTUs taxonomically affiliated as follow: Firmicutes, 181 OTUs; Bacteroidetes, 102 OTUs; Proteobacteria, 39 OTUs Fusobacteria, 37 OTUs and Actinobacteria, 26 OTUs. At species level, 29 strains (out of the 39 strains used to construct the HGMM) were found present and could be affiliated at the species level in the HGMM, conserving a 76.92 % of the diversity. Interestingly, this conserved diversity in the HGMM was higher than other studies reporting that the operational taxonomic units (OTUs) detected by 16S rRNA gene sequencing of cultivable fecal samples were only in a maximum of 40-50% (Goodman et al. 2011; Rettedal, Gumpert, et Sommer 2014; Lau et al. 2016b). This study was thus added to the few recent studies combining culture-dependent approaches with next-generation sequencing to characterize the culturable human gut microbiota (Sommer 2015 ; Lau et al. 2016b ; Lagier et al. 2012; Forster et al. 2019).

The behaviors and sensitivity of the HGMM vis-à-vis antibiotics, drugs and xenobiotics (Table 2) were investigated by MiSeq sequencing of the V5-V7 region of the 16S RNA gene. Taking into account all samples, the analysis of distribution of microbial populations in the HGMM based on principal component analysis (Figure 2) and the Permanova test for analysis of variance using Bray–Curtis distance (*p-value*: 0.001) showed was no significant difference between the percentages of abundances (whatever the affiliation level of the OTUs) for each sample. The global profile of the five phyla abundances was similar for the majority of the tested molecules categories compared to the positive control. However, based on the Hill numbers (Chao et al. 2014c) showed in Table 6 as well as the beta diversity, the HGMM was significantly affected in presence of the antibiotics compared to the other tested molecules categories (Figure 3). These results were in accordance with other studies reporting that antibiotics can affect the abundances of 30% of the bacteria in the gut community, causing rapid and significant drops in taxonomic richness, diversity and evenness (Les Dethlefsen et al. 2008 ; Les Dethlefsen et Relman 2011). Molecular omics works have shown that, in addition to the composition of taxa alteration, antibiotics also affect the gene expression, protein activity and overall metabolism of the gut microbiota (Franzosa et al. 2015 ; Francino 2016a). Antibiotics are no longer considered as only beneficial for infections treatment (e.g. *Clostridium difficile*), but appears to play a role in the pathogenesis of several disorders associated with microbiota impairment affecting and altering the other beneficial microbial groups present in the human gut (Ianiro, Tilg, et Gasbarrini 2016b; Lankelma et al. 2017; Iizumi et al. 2017).

In order to study the behavior and sensitivity of the HGMM at species level, the abundances of each strain found out into all samples (antibiotics, drugs, xenobiotics, subcultures) was investigated based on their 16S rRNA gene relative abundances in regards with the respective positive control. Out the total of the 39 strains, 29 strains were found present in all samples could be regrouped into five clusters based on their relative abundances in response to the presence of the tested molecules (Figure 4). *Bacteroides ovatus* from cluster I was found out to be resistant in presence of the metronidazole with a relative abundance of 4.7%. It was reported that *Bacteroides* spp. were not

affected by metronidazole and were carrying *nim* genes for metronidazole resistance (Gal et Brazier 2004). *Bacteroides spp*. is of concern as these species can also be resistant to a wide variety of antimicrobial agents including β-lactam agents, tetracycline and nitroimidazole (Elisabeth Nagy et al. 2001; Teng et al. 2002). However, from Cluster II, *Bilophila wadsworthia* and *Parabacteroides distasonis* were completely inhibited in presence of erythromycin and metronidazole. These results were in accordance with previous works showing the susceptibility of both genera *Bilophila* and *Parabacteroides* to erythromycin and metronidazole (Schumacher et Single 1998 ; Y. Song et al. 2005 ; Awadel-Kariem et al. 2010 ; Veloo et van Winkelhoff 2015). *P. distasonis* records a maximum of relative abundance (8.04%) in the presence of trimethoprim. It was reported that using some substances, such as trimethoprim were less effect against infections with anaerobic bacteria when using them against infections with *Bacteroides spp* (Ovesen et al. 2016). Trimethoprim, sulfamethoxazole, STX, and erythromycin completely inhibit o *Bifidobacterium longum*. These results were in accordance to previous research work assessing the safety of *B. longum* JDM301 based on complete genome sequences (Wei et al. 2012). *Faecalibacterium prausnitzii* was susceptible to by metronidazole, moxifloxacin, and erythromycin. Metronidazole was known to have a substantial impact on the gut microbiome decreasing the abundances of *Faecalibacterium* and *Blautia spp* (Pilla et al. 2020).The maximum of relative abundance was obtained in the presence of erythromycin for *Bacteroides caccae* and Bacteroidetes *thetaiotaomicron* (8.3 % and 14.32%, respectively). Previously, many studies reported *Bacteroides* conjugative transposons carry both tetracycline and erythromycin resistance genes, which means that the use of tetracycline selects for erythromycin resistant strains and vice versa, adding to the antibiotic resistance problem (Privitera, Dublanchet, et Sebald 1979 ; Whittle, Shoemaker, et Salyers 2002; Niestępski et al. 2019; Johnsen et al. 2017).

Sensitivity of strains and HGMM to xenobiotics

Our overall results for xenobiotics show that it is mainly antibiotics that have an impact on the growth of single strains but also on the relative abundances of the strains that make up HGMM (Figures 2, 3,

4 and 5). These results are consistent with the scientific literature which has repeatedly shown that antibiotics modulate the structure of the intestinal microbiota (Thiemann, Smit, et Strowig 2016b; Lange et al. 2016; P. Zimmermann et Curtis 2019a). The single-culture strains were shown to be particularly sensitive to moxifloxacin and trimethoprim. Moxifloxacin is an antibiotic known to modulate bacterial diversity. Indeed, one study showed that a 5-day treatment decreased bacterial diversity in the feces of treated individuals (Burdet et al. 2019b). We also showed in a previous study that its use *in vitro* significantly inhibited the growth of 12 strains commonly found in the intestinal microbiota out of the 30 tested (Ecale et al., 2020). In addition to its impact on the growth of single-culture strains, moxifloxacin also modulated the relative abundances of HGMM strains with a decrease in Firmicutes and an increase in Bacteroidetes. Surprisingly, it was the only antibiotic that did not allow the growth of HGMM (Figure 6). These results may therefore suggest that its action on the bacteria of the intestinal microbiota core is deleterious and that it must be used wisely to avoid significant dysbiosis and the appearance of resistance phenomena (Sb, K, and Ll 2017). We have also shown that trimethoprim affects the growth of single strains but also has an impact on the growth of HGMM (Figures 5 and 6). We observe an increase in Fusobacteria and Firmicutes but a decrease in Proteobacteria (Figure 3). STX also affects the taxonomy of the HGMM, with an increase in Actinobacteria and Firmicutes but a decrease in Proteobacteria, Fusobacteria and Bacteroidetes. However, a smaller number of strains are affected, indicating that the Trimethoprim/Sulfamethoxazole combination has less impact on the composition of the microbiota than trimethoprim alone. The results obtained with our model can be confirmed by a study showing that a patient treated with STX for 2 years did not affect the quantity of cultivable anaerobic bacteria (Kofteridis et al. 2004). In the presence of erythromycin, we showed that the phylum of Fusobacteria disappeared. In our model, this phylum is composed of only one *F. nucleatum* strain. Surprisingly, our *F. nucleatum* strain is not inhibited in the presence of erythromycin when grown alone. This result may indicate that bacteria behave differently when cultured alone or with other strains, hence the importance of studying strains in single culture but also in consortium. Overall, antibiotics have

increased the abundance of Firmicutes in our HGMM except for moxifloxacin (Figure 3). These results are consistent with a 2012 study conducted in a mouse model which showed that treatment with antibiotics (penicillin, vancomycin and tetracycline) increased the abundance of Firmicutes (I et al. 2012). Many studies mention a balance between Firmicutes and Bacteroidetes deregulated by the presence of antibiotics, which we confirm with our model (Panda et al. 2014b ; Dudek-Wicher, Junka, et Bartoszewicz 2018). The modulation of phyla and even of the species composing the HGMM confirms that antibiotics can cause dysbiosis which can in turn lead to important side effects, longer term pathologies and resistance phenomena (Francino 2016b).

Effect of strains and HGMM on xenobiotics

Although it has just been seen that antibiotics can have effects on strains composing the intestinal microbiota, it is now documented that xenobiotics can be impacted by bacterial enzymes of the intestinal microbiota (M. Zimmermann et al. 2019 ; Collins et Patterson 2020). Our results show that the basic structures of metronidazole and sulfamethoxazole (alone or with trimethoprim) are absent from the culture supernatants of HGMM (Figure 6). We also showed that these two antibiotics were weakly found in the culture supernatants of the single cultured strains (absent from 16 supernatants for metronidazole and 12 for sulfamethoxazole used alone). Metronidazole is an antibiotic known to be metabolized by strains of the intestinal microbiota and in particular by *C. perfringens* (Sousa et al. 2008b; Koch et al. 1979; Koch et Goldman 1979). We show here that our *C. perfringens* strain modifies the structure of metronidazole in such a way that its basic structure is no longer found, confirming the results of previous studies. We also show that HGMM is capable of modifying all metronidazole (total absence). One may then wonder whether a synergy is established with other bacteria or whether it is only the strain that is responsible for this absence in UHPLC-MS/MS. We have also shown that other antibiotics are not found in HGMM culture supernatants, such as cefpodoxime (100% absent) and erythromycin (75% absent). We have also shown that other xenobiotics are not found in the supernatants of our model confirming that strains of the intestinal microbiota have a close interaction

with xenobiotics (S. F. Clarke et al. 2014 ; Koppel, Maini Rekdal, et Balskus 2017; Collins et Patterson 2020). Overall the results of single strain culture supernatant analyses showed that in addition to metronidazole and sulfamethoxazole, olsalazine, omeprazole, diclofenac, fexofenadine, nisolpidine, nifedipine, hesperidine, di-isobutyl phthalate and di-n-butyl phthalate were found very rarely in bacterial supernatants (Figures 6 and 7). Some of these molecules are known to be metabolized by the intestinal microbiota but not all bacteria involved are (Sousa et al. 2008b ; Klaassen et Cui 2015 ; Lu, Mahbub, et Fox 2015 ; Enright et al. 2016 ; Jourova, Anzenbacher, et Anzenbacherova 2016 ; Koppel, Maini Rekdal, et Balskus 2017 ; Currò 2018 ; G. Clarke et al. 2019 ; Sun, Chen, et Shen 2019). Our results show that olsalazine, an anti-inflammatory agent, is found very rarely in culture supernatants of single strains but also in those of HGMM (75% absence). These results are consistent with the literature indicating that olsalazine is cleaved into mesalazine and acetyl-mesalazine in the colon by bacterial azoreductases (Lauritsen et al. 1984; Rijk et al. 1989). We show here, that Bacteroidetes as well as Firmicutes are able to make the molecule disappear and we then put forward the hypothesis that these phyla can metabolize olsalazine. Regarding omeprazole, used to reduce gastrointestinal reflux, a previous study has shown that this molecule is metabolized by the intestinal microbiota of rats (Watanabe et al. 1995). Although the molecule seems to be modified by the unique strains of the intestinal microbiota core in our study (absence of the molecule in culture supernatants and notably in that of *B. ovatus*), HGMM does not react in the same way (0% absence) confirming the hypothesis of Jourova et al. which states that it is unlikely that omeprazole is metabolized by bacteria of the intestinal microbiota (Jourova, Anzenbacher, et Anzenbacherova 2016). Diclofenac (an anti-inflammatory) is absent in half of all culture supernatants of single strains and 65% in HGMM. These results indicate that bacteria from the intestinal microbiota have an effect on this molecule. Some studies have suggested that diclofenac is metabolized by bacterial beta glucuronidase enzymes from the gut microbiota causing acute diarrhea in patients treated with this drug (Boelsterli, Redinbo, et Saitta 2012 ; Saitta et al. 2014 ; Oda et al. 2015). However, this enzyme is not present in all bacteria tested, indicating that another mechanism in addition to the beta glucuronidase enzymes may be

involved in the disappearance of the basic structure we are observing. Fexofenadine, an anti-histamine, is absent from half of the culture supernatants of the single strains except for 5 bacteria (*B. ovatus*, *B. fragilis*, *E. coli*, *B. obeum* and *C. perfringens*) and is absent from 30% of the HGMM supernatants. We show here that fexofenadine, which is absorbed by the intestine using the transporter OATP2B1, can in parallel interact with the intestinal microbiota and consequently decrease its initial concentration (Zou et al. 2020). The basic structures of nisolpidine and nifedipine used against hypertension are absent from the culture supernatants of *C. perfringens* and *D. formicigenerans* and are also absent by about 75% in the culture supernatant of HGMM. Some authors have hypothesized that nifedipine could be metabolized by bacteria of the intestinal microbiota thanks to dehydrogenase and/or nitroreductase enzymes (Choi et al. 2018). We in turn hypothesize that these bacteria could be among others *D. formicigenerans* and *C. perfringens* (possessing the two enzymes mentioned (Rafii et Cerniglia 1993; Matsunaga et al. 2018). Since nisolpidine and nifedipine have very similar structures, we hypothesize that nisolpidine could also be impacted by these same bacteria. Clomipramine, which is an antidepressant and an anti-psychotic, is absent from the culture supernatants of the single strains at 62% and is totally absent in *O. splanchnicus*. Although the molecule is found at the same concentration in HGMM supernatants, *O. splanchnicus* is not among the strains found in the model. In 1980, a study showed that desmethylclomipramine was metabolized to an active metabolite without indicating the precise mechanism (Benfield, Harries, et Luscombe 1980). We can then ask whether the bacterium *O. splanchnicus* is part of this mechanism. Hesperidin, a flavonoid, is absent from the culture supernatants of 5 strains in single culture and is absent from those of HGMM. It is known that hesperidin, found notably in oranges in its natural state, would have a beneficial effect on the intestinal microbiota (Lima et al. 2019) and would be metabolized by the intestinal microbiota according to (Boonpawa et al. 2017). Thanks to our model, we can also hypothesize that hesperidin is metabolized by bacteria of the intestinal microbiota and in particular by *P. merdae*, *O. splanchnicus*, *B. obeum*, *R. gnavus* and *S. parasanguinis*. We also observed that di-isobutyl phthalate and di-n-butyl phthalate were on average 56% absent from the supernatants of

single strains. These results indicate once again that the strains composing the intestinal microbiota behave differently alone and in a community, hence the need to take into account several approaches, single culture, and culture of a set of strains for the study of the interaction of the intestinal microbiota and xenobiotics.

Conclusion

Numerous studies have shown that the intestinal microbiota is capable of interacting with xenobiotics and metabolized them. The study of these interactions involves metagenomic analyses of faeces, complex experimental models and animal models. These models are complex and expensive, so it is necessary to design a simplified model of the intestinal microbiota for the study of these interactions with xenobiotics. In this study, we developed the Human Gut Microbiota Model, an *in vitro* model comprising 29 strains of the core microbiota aimed at predicting the effects that xenobiotics may have on the intestinal microbiota and vice versa. After its implementation, we showed that the relative abundances of HGMM were altered in the presence of antibiotics as were the individual cultured strains composing it. We also showed that some xenobiotics were absent from culture supernatants of HGMM and individual strains. This simple, stable, inexpensive and reproducible model could be used to predict the effects that xenobiotics may have on the intestinal microbiota in preliminary studies aimed at developing new pharmaceutical, food or environmental molecules.

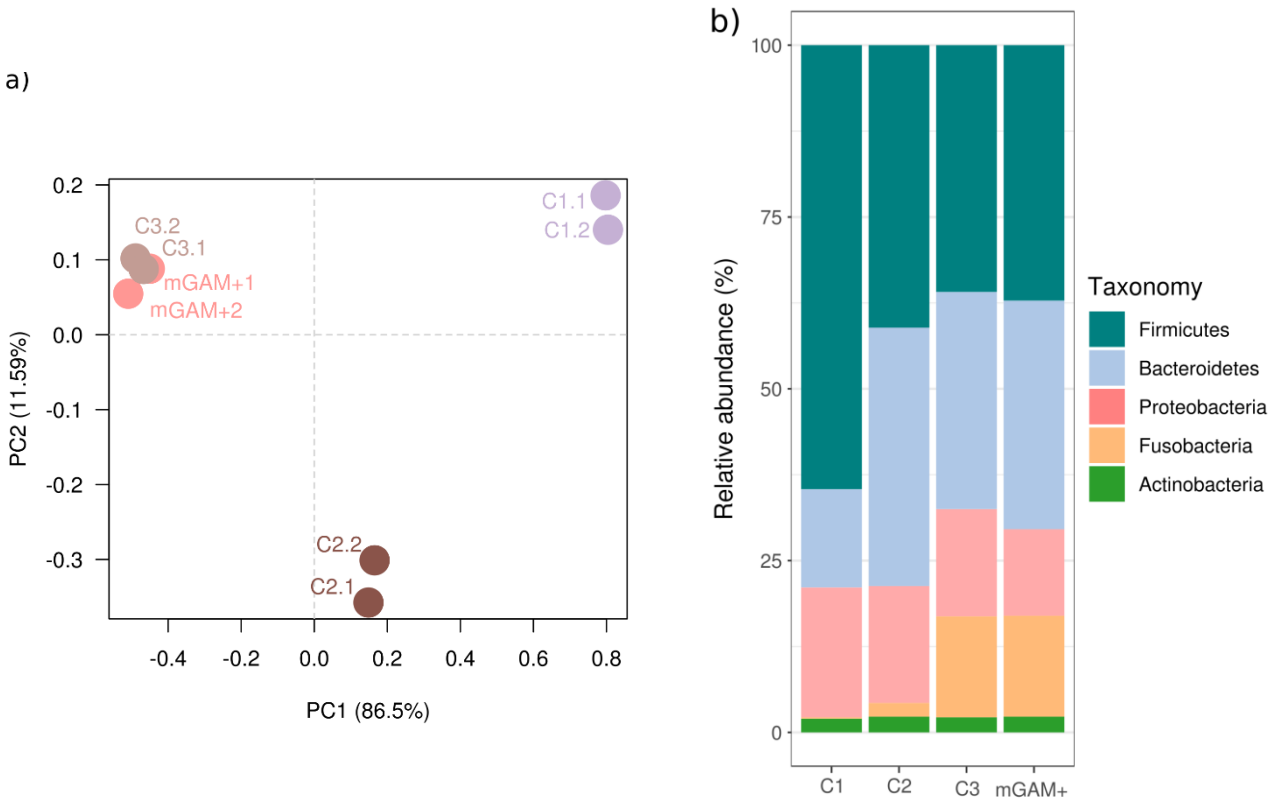


Figure 1: The construction of the Artificial Human Gut Microbiota model. a) Illustration of the evolution of the constructed human gut model, by principal coordinate analysis of the weighted UniFrac β-diversity metric, through the three subcultures C1, C2, C3 and compared to the positive control mGAM+. b) Histogram illustrating the relative abundances of the microbial communities at the phylum level composing the human gut model through the subculturing.

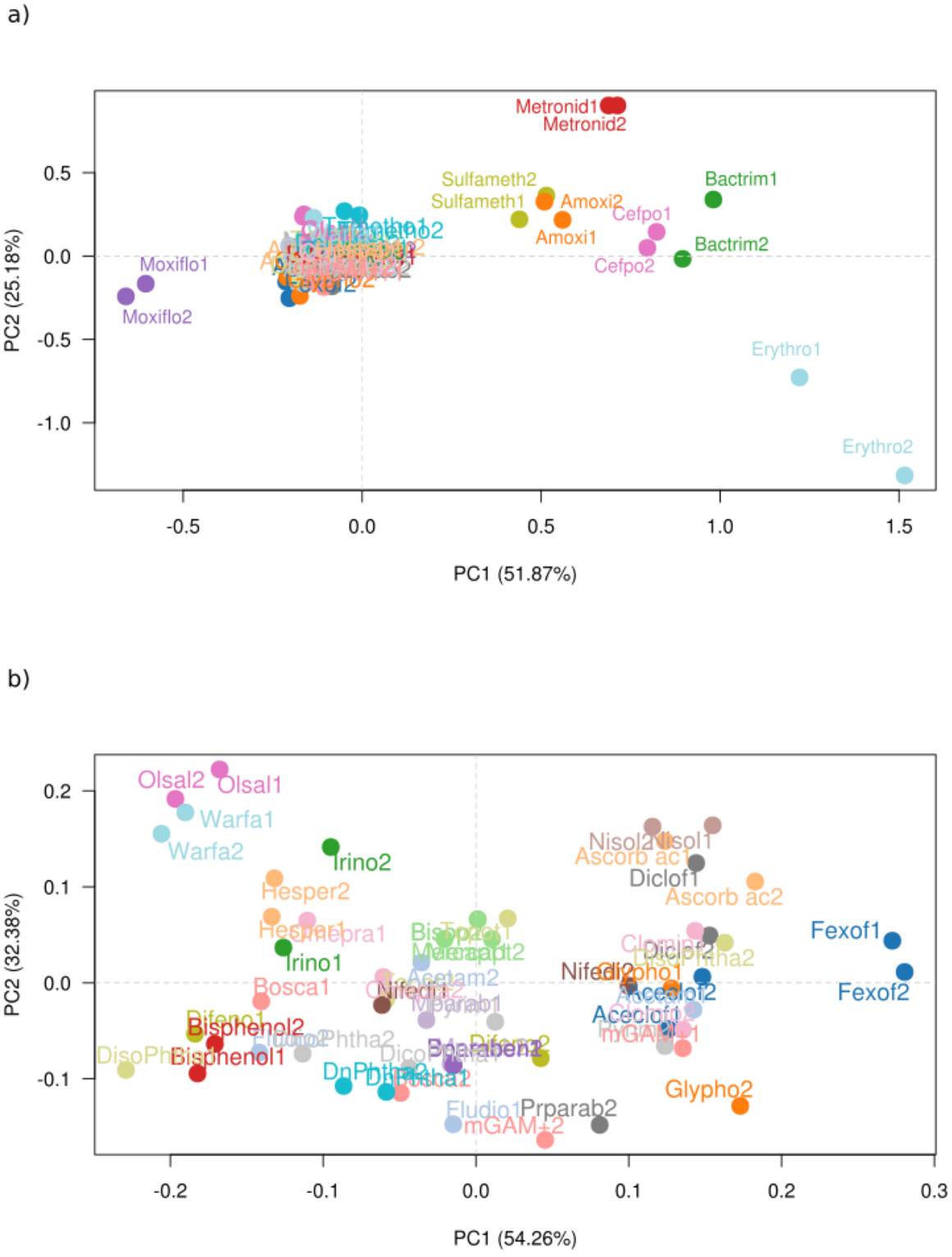


Figure 2: a) Comparison of the distribution of the tested molecules, based on the abundances of the V5-V7 region of the 16S rRNA gene of the microbial communities constructing the human gut microbiota model, by the principal component analysis using the weighted UniFrac β-diversity metric distance. **b) The same analysis excluding the antibiotics**.

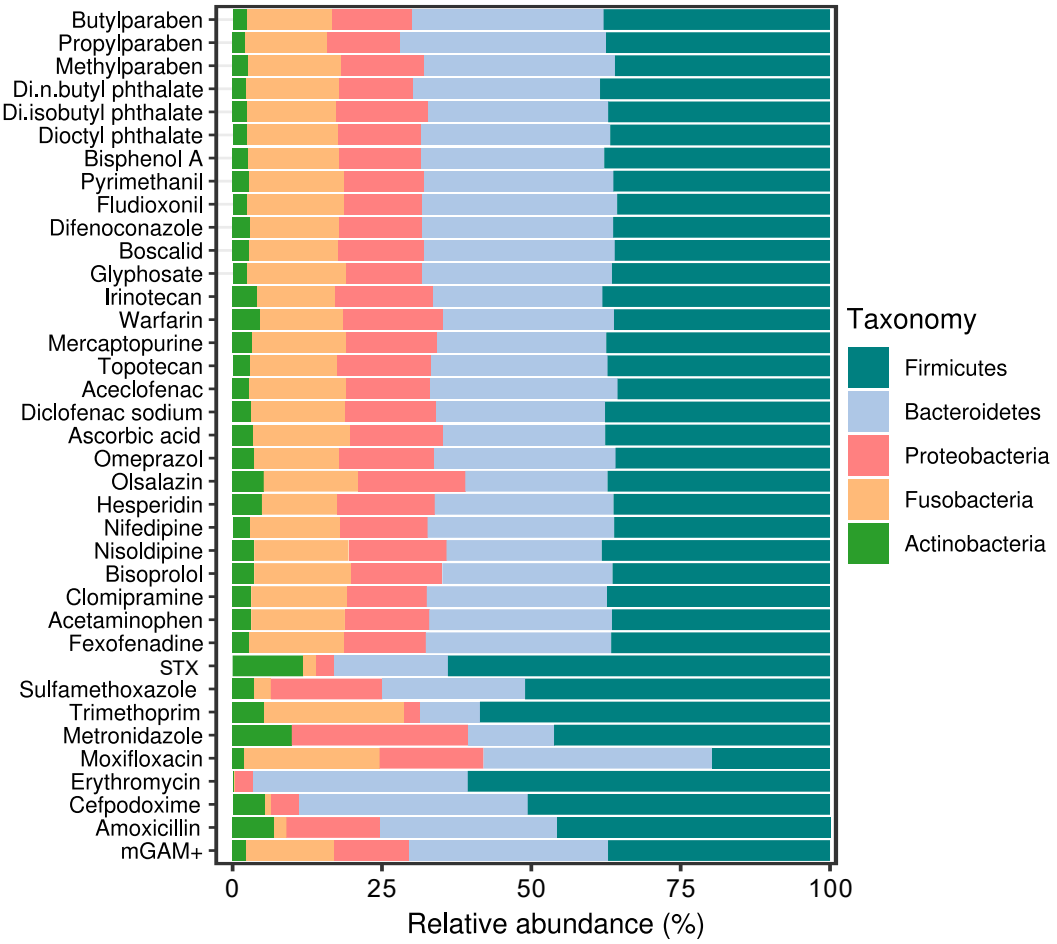


Figure 3: Histogram illustrating the sensitivity of the artificial human gut microbiota model vis-à-vis the tested molecules. The analysis is based on the relative abundances of the V5-V7 region of the 16S rRNA gene of the five different phyla constructing the human gut microbiota model.

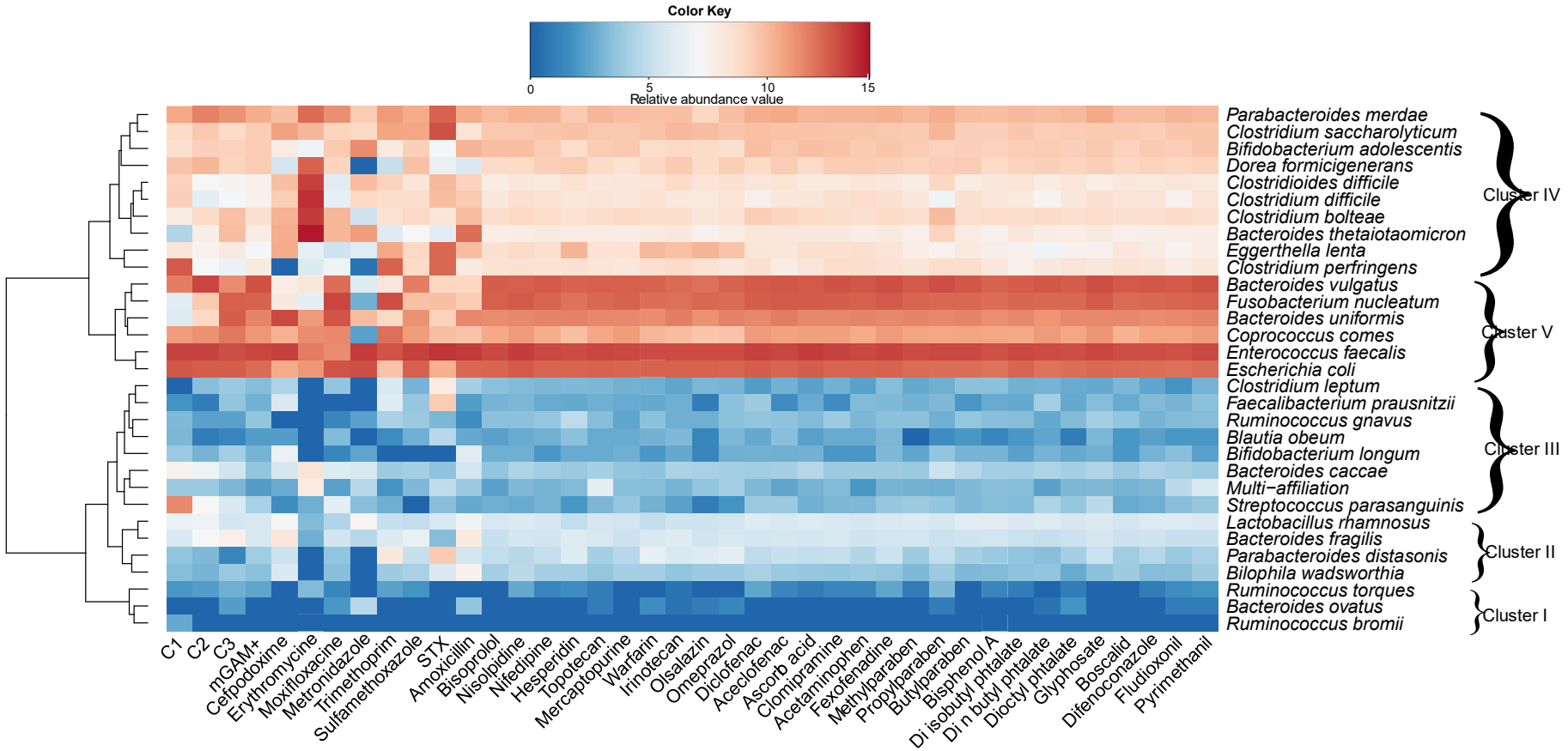


Figure 4: Heatmap illustrating the sensitivity of the strains (on the right) found out into the artificial human gut model after 48h of incubation in the presence of the tested molecules (on the bottom) and compared with the subcultures C1, C2, C3 and the positive control mGAM+. The legend shows the relative abundances (red and blue for resistant and sensitive, respectively). The clusterization of strains (on the left) shows their organisation based on their behaviours vis-à-vis the tested molecules, and not on their taxonomic relationship.

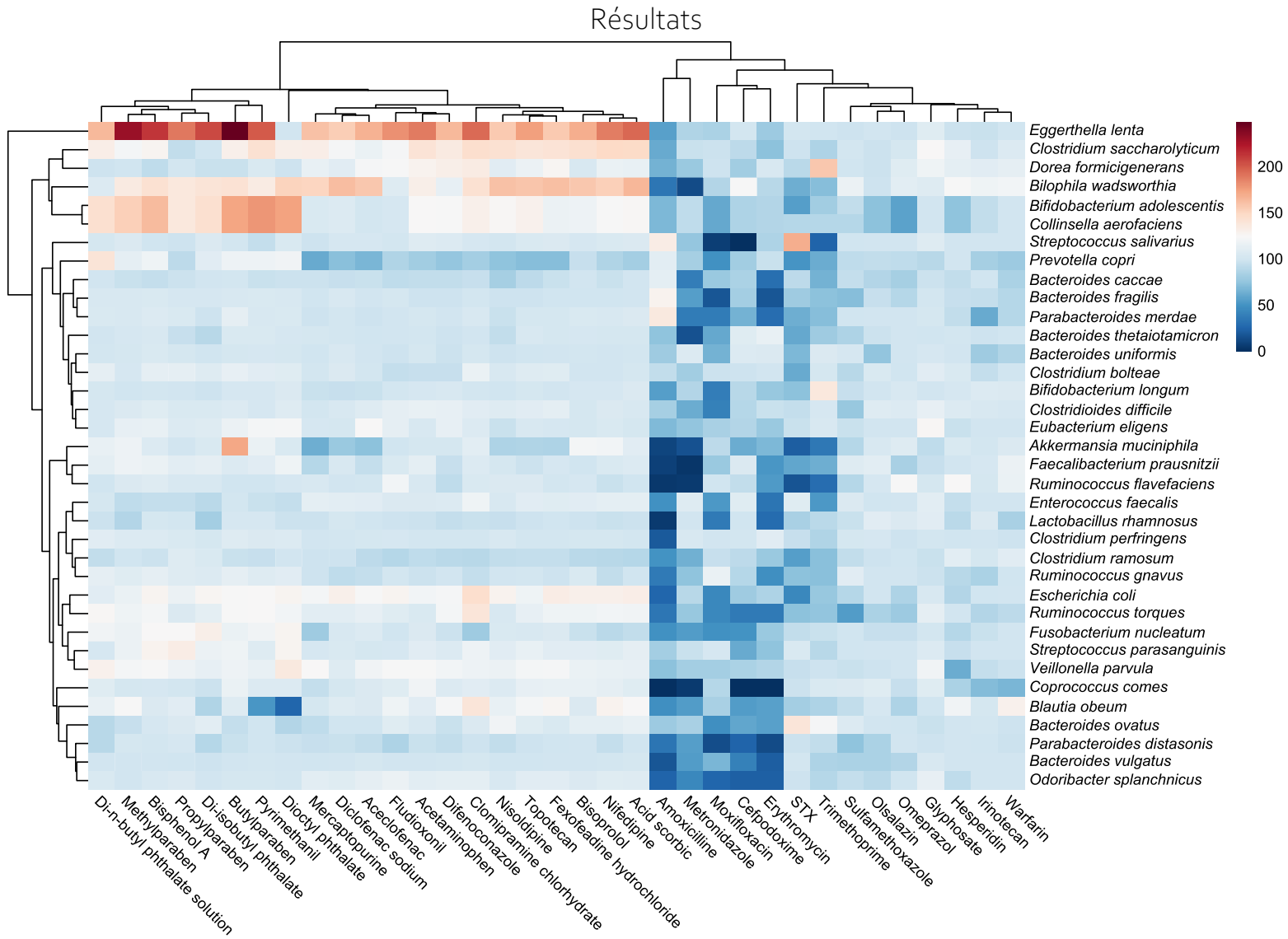


Figure 5: Heat map illustrating the sensitivity of strains in individuals cultures to xenobiotics. The legend shows the growth percentages of each strain in the presence of a xenobiotic as a function of the control culture without the molecules (blue = no growth; red = increased growth).

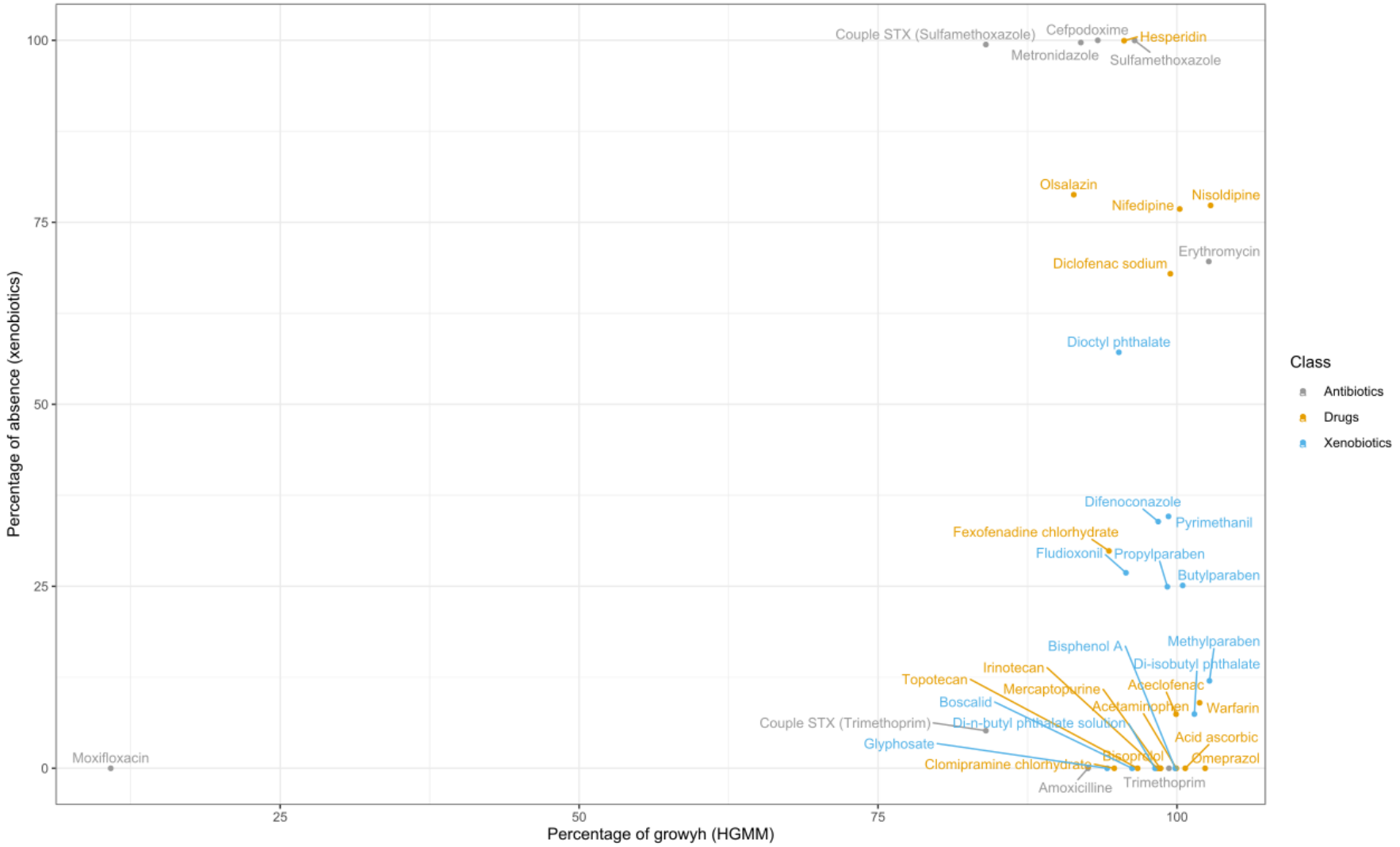


Figure 6 : Biplot showing the percentage of bacterial growth of HGMM versus the percentage of absence of xenobiotics in the culture supernatant. The percentage of growth of HGMM was calculated in the presence of xenobiotics compared to HGMM cultures without xenobiotics. The percentages of absence of xenobiotics were calculated in relation to the controls without the bacteria.

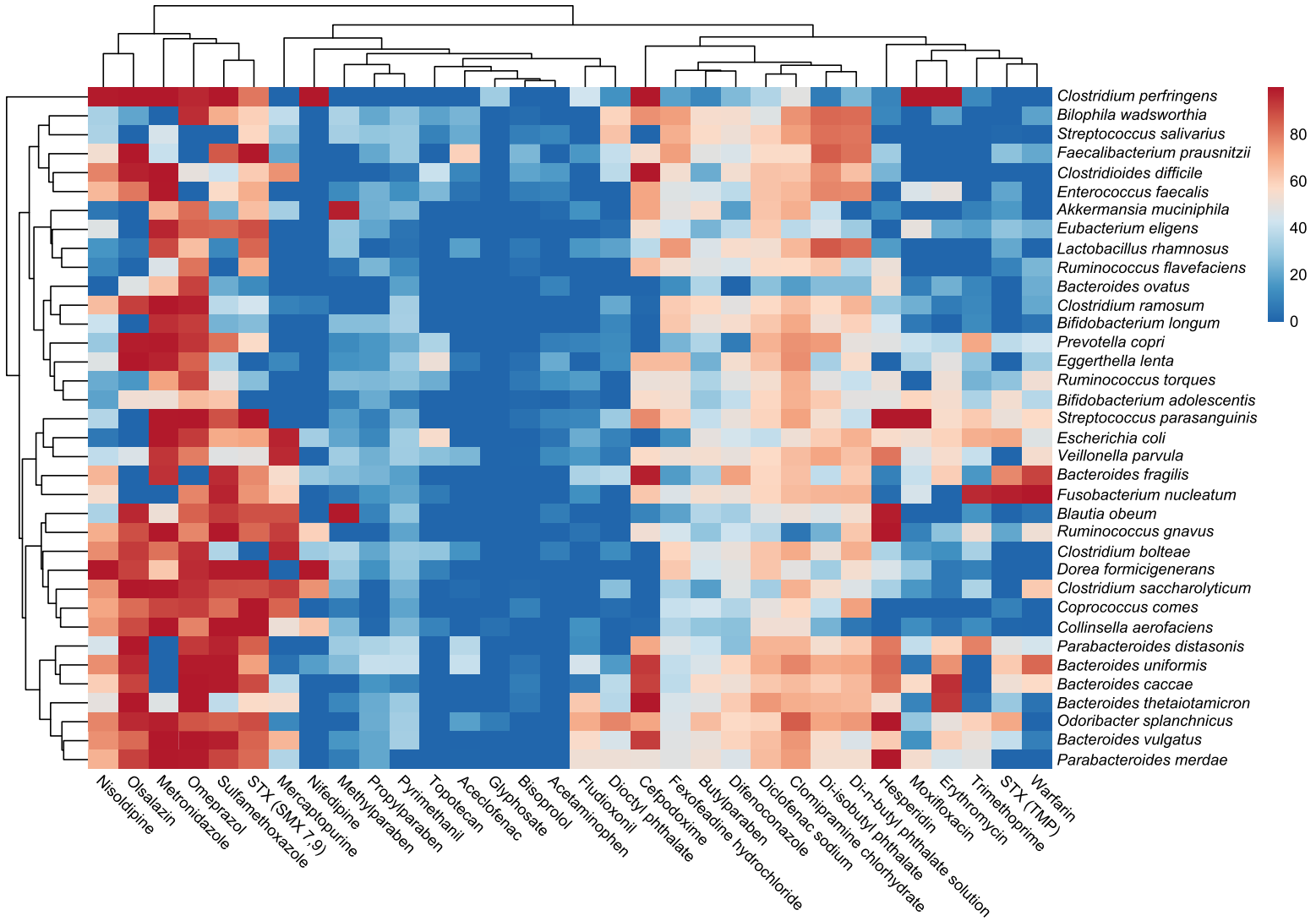


Figure 7 : Heat map illustrating the absence of xenobiotics in culture supernatants of individual strains by UHPLC-MS/MS analysis. The legend shows the percentages of absence of xenobiotics in the culture supernatants in the presence of the individual strains as a function of the controls without the bacteria. (blue = no absence; red = total absence).

References

Almeida, Alexandre, Alex L. Mitchell, Miguel Boland, Samuel C. Forster, Gregory B. Gloor, Aleksandra Tarkowska, Trevor D. Lawley, and Robert D. Finn. 2019. 'A New Genomic Blueprint of the Human Gut Microbiota'. Nature 568 (7753): 499–504. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1.

Anders, Simon, Alejandro Reyes, and Wolfgang Huber. 2012. 'Detecting Differential Usage of Exons from RNA-Seq Data'. Genome Research 22 (10): 2008–17.

Audebert, Christophe, Gaël Even, Amandine Cian, Alexandre Loywick, Sophie Merlin, Eric Viscogliosi, and Magali Chabe. 2016. 'Colonization with the Enteric Protozoa Blastocystis Is Associated with Increased Diversity of Human Gut Bacterial Microbiota'. Scientific Reports 6 (1): 1–11.

Awadel-Kariem, F. Mustafa, P. Patel, J. Kapoor, Jon S. Brazier, and Ellie J. C. Goldstein. 2010. 'First Report of Parabacteroides Goldsteinii Bacteraemia in a Patient with Complicated Intra-Abdominal Infection'. Anaerobe 16 (3): 223–25. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.01.001.

Beckers, Bram, Michiel Op De Beeck, Nele Weyens, Rebecca Van Acker, Marc Van Montagu, Wout Boerjan, and Jaco Vangronsveld. 2016. 'Lignin Engineering in Field-Grown Poplar Trees Affects the Endosphere Bacterial Microbiome'. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113 (8): 2312–17. https://doi.org/10.1073/pnas.1523264113.

Benfield, D. P., C. M. Harries, and D. K. Luscombe. 1980. 'Some Pharmacological Aspects of Desmethylclomipramine'. Postgraduate Medical Journal 56 Suppl 1: 13–18.

Boelsterli, Urs, Matthew Redinbo, and Kyle Saitta. 2012. 'Multiple NSAID-Induced Hits Injure the Small Intestine: Underlying Mechanisms and Novel Strategies'. Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology 131 (October). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs310.

Bolyen, Evan, Jai Ram Rideout, Matthew R Dillon, Nicholas A Bokulich, Christian C Abnet, Gabriel A Al-Ghalith, Harriet Alexander, Eric J Alm, Manimozhiyan Arumugam, and Francesco Asnicar. 2019. 'Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2'. Nature Biotechnology 37 (8): 852–57.

Boonpawa, Rungnapa, Albertus Spenkelink, Ans Punt, and Ivonne M. C. M. Rietjens. 2017. 'Physiologically Based Kinetic Modeling of Hesperidin Metabolism and Its Use to Predict in Vivo Effective Doses in Humans'. Molecular Nutrition & Food Research 61 (8). https://doi.org/10.1002/mnfr.201600894.

Burdet, Charles, Thu Thuy Nguyen, Xavier Duval, Stéphanie Ferreira, Antoine Andremont, Jérémie Guedj, and France Mentré. 2019. 'Impact of Antibiotic Gut Exposure on the Temporal Changes in Microbiome Diversity'. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 63 (10). https://doi.org/10.1128/AAC.00820-19.

Chao, Anne, Nicholas J Gotelli, TC Hsieh, Elizabeth L Sander, KH Ma, Robert K Colwell, and Aaron M Ellison. 2014. 'Rarefaction and Extrapolation with Hill Numbers: A Framework for Sampling and Estimation in Species Diversity Studies'. Ecological Monographs 84 (1): 45–67.

Chelakkot, Chaithanya, Jaewang Ghim, and Sung Ho Ryu. 2018. 'Mechanisms Regulating Intestinal Barrier Integrity and Its Pathological Implications'. Experimental & Molecular Medicine 50 (8): 1–9.

Choi, Min Sun, Jun Sang Yu, Hye Hyun Yoo, and Dong-Hyun Kim. 2018. 'The Role of Gut Microbiota in the Pharmacokinetics of Antihypertensive Drugs'. Pharmacological Research 130 (April): 164–71. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.019.

Clarke, Gerard, Kiran V. Sandhu, Brendan T. Griffin, Timothy G. Dinan, John F. Cryan, and Niall P. Hyland. 2019. 'Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions'. Edited by Charles P. France. Pharmacological Reviews 71 (2): 198–224. https://doi.org/10.1124/pr.118.015768.

Clarke, Siobhan F, Eileen F Murphy, Orla O'Sullivan, Alice J Lucey, Margaret Humphreys, Aileen Hogan, Paula Hayes, et al. 2014. 'Exercise and Associated Dietary Extremes Impact on Gut Microbial Diversity'. Gut 63 (12): 1913–20. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541.

Collins, Stephanie L., and Andrew D. Patterson. 2020. 'The Gut Microbiome: An Orchestrator of Xenobiotic Metabolism'. Acta Pharmaceutica Sinica B 10 (1): 19–32. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.001.

Currò, Diego. 2018. 'The Role of Gut Microbiota in the Modulation of Drug Action: A Focus on Some Clinically Significant Issues'. Expert Review of Clinical Pharmacology 11 (2): 171–83. https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1414598.

Daina, Antoine, and Vincent Zoete. 2016. 'A Boiled-egg to Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules'. ChemMedChem 11 (11): 1117.

Defaye, Manon, Céline Nourrisson, Elodie Baudu, Ivan Warwzyniak, Virginie Bonnin, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, Denis Ardid, Frédéric Delbac, and Frédéric Antonio Carvalho. 2018. 'Efficient and Reproducible Experimental Infections of Rats with Blastocystis Spp.' Plos One 13 (11): e0207669.

Dethlefsen, Les, and David A Relman. 2011. 'Incomplete Recovery and Individualized Responses of the Human Distal Gut Microbiota to Repeated Antibiotic Perturbation'. Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (Supplement 1): 4554–61.

Dethlefsen, Les, Sue Huse, Mitchell L Sogin, and David A Relman. 2008. 'The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S RRNA Sequencing'. PLoS Biol 6 (11): e280.

Dudek-Wicher, Ruth K., Adam Junka, and Marzenna Bartoszewicz. 2018. 'The Influence of Antibiotics and Dietary Components on Gut Microbiota'. Przegląd Gastroenterologiczny 13 (2): 85. https://doi.org/10.5114/pg.2018.76005.

Ejtahed, Hanieh-Sadat, Pooneh Angoorani, Shirin Hasani-Ranjbar, Seyed-Davar Siadat, Nasrin Ghasemi, Bagher Larijani, and Ahmad-Reza Soroush. 2018. 'Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgeries in Morbidly Obese Patients: A Systematic Review'. Microbial Pathogenesis 116: 13–21.

Enright, Elaine F., Cormac G.M. Gahan, Susan A. Joyce, and Brendan T. Griffin. 2016. 'The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome'. The Yale Journal of Biology and Medicine 89 (3): 375–82.

Faith, Jeremiah J, Janaki L Guruge, Mark Charbonneau, Sathish Subramanian, Henning Seedorf, Andrew L Goodman, Jose C Clemente, Rob Knight, Andrew C Heath, and Rudolph L Leibel. 2013. 'The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota'. Science 341 (6141).

Felsenstein, Joseph. 1981. 'Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach'. Journal of Molecular Evolution 17 (6): 368–76.

Forster, Samuel C., Nitin Kumar, Blessing O. Anonye, Alexandre Almeida, Elisa Viciani, Mark D. Stares, Matthew Dunn, et al. 2019. 'A Human Gut Bacterial Genome and Culture Collection for Improved Metagenomic Analyses'. Nature Biotechnology 37 (2): 186–92. https://doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7.

Foster, Kevin R., and Thomas Bell. 2012. 'Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species'. Current Biology 22 (19): 1845–50. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005.

Francino, M. P. 2016. 'Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances'. Frontiers in Microbiology 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543.

Francino, M. P. 2016. 'Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances'. Frontiers in Microbiology 6 (January). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543.

Frankel, Arthur E, Laura A Coughlin, Jiwoong Kim, Thomas W Froehlich, Yang Xie, Eugene P Frenkel, and Andrew Y Koh. 2017. 'Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients'. Neoplasia 19 (10): 848–55.

Franzosa, Eric A, Tiffany Hsu, Alexandra Sirota-Madi, Afrah Shafquat, Galeb Abu-Ali, Xochitl C Morgan, and Curtis Huttenhower. 2015. 'Sequencing and beyond: Integrating Molecular'omics' for Microbial Community Profiling'. Nature Reviews Microbiology 13 (6): 360–72.

Gal, Micaela, and J. S. Brazier. 2004. 'Metronidazole Resistance in Bacteroides Spp. Carrying Nim Genes and the Selection of Slow-Growing Metronidazole-Resistant Mutants'. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54 (1): 109–16. https://doi.org/10.1093/jac/dkh296.

Golosova, Olga, Ross Henderson, Yuriy Vaskin, Andrei Gabrielian, German Grekhov, Vijayaraj Nagarajan, Andrew J. Oler, et al. 2014. 'Unipro UGENE NGS Pipelines and Components for Variant Calling, RNA-Seq and ChIP-Seq Data Analyses'. PeerJ 2 (November). https://doi.org/10.7717/peerj.644.

Goodman, Andrew L, George Kallstrom, Jeremiah J Faith, Alejandro Reyes, Aimee Moore, Gautam Dantas, and Jeffrey I Gordon. 2011. 'Extensive Personal Human Gut Microbiota Culture Collections Characterized and Manipulated in Gnotobiotic Mice'. Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (15): 6252–57.

Gosalbes, María José, Joan Compte, Silvia Moriano-Gutierrez, Yvonne Vallès, Nuria Jiménez-Hernández, Xavier Pons, Alejandro Artacho, and M. Pilar Francino. 2019. 'Metabolic Adaptation in the Human Gut Microbiota during Pregnancy and the First Year of Life'. EBioMedicine 39: 497–509.

Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, and Olivier Gascuel. 2010. 'New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0'. Systematic Biology 59 (3): 307–21.

Haiser, Henry J, Kristen L Seim, Emily P Balskus, and Peter J Turnbaugh. 2014. 'Mechanistic Insight into Digoxin Inactivation by Eggerthella Lenta Augments Our Understanding of Its Pharmacokinetics'. Gut Microbes 5 (2): 233–38. https://doi.org/10.4161/gmic.27915.

Hemarajata, Peera, and James Versalovic. 2013. 'Effects of Probiotics on Gut Microbiota: Mechanisms of Intestinal Immunomodulation and Neuromodulation'. Therapeutic Advances in Gastroenterology 6 (1): 39–51. https://doi.org/10.1177/1756283X12459294.

Hibbing, Michael E, Clay Fuqua, Matthew R Parsek, and S Brook Peterson. 2010. 'Bacterial Competition: Surviving and Thriving in the Microbial Jungle'. Nature Reviews Microbiology 8 (1): 15–25.

Hisada, Takayoshi, Kaori Endoh, and Kiyonori Kuriki. 2015. 'Inter-and Intra-Individual Variations in Seasonal and Daily Stabilities of the Human Gut Microbiota in Japanese'. Archives of Microbiology 197 (7): 919–34.

Huse, Susan M., Yuzhen Ye, Yanjiao Zhou, and Anthony A. Fodor. 2012. 'A Core Human Microbiome as Viewed through 16S RRNA Sequence Clusters'. PLOS ONE 7 (6): e34242. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034242.

I, Cho, Yamanishi S, Cox L, Methé Ba, Zavadil J, Li K, Gao Z, et al. 2012. 'Antibiotics in Early Life Alter the Murine Colonic Microbiome and Adiposity'. Nature. Nature. 30 August 2012. https://doi.org/10.1038/nature11400.

Ianiro, Gianluca, Herbert Tilg, and Antonio Gasbarrini. 2016. 'Antibiotics as Deep Modulators of Gut Microbiota: Between Good and Evil'. Gut 65 (11): 1906–15. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312297.

Iizumi, Tadasu, Thomas Battaglia, Victoria Ruiz, and Guillermo I Perez Perez. 2017. 'Gut Microbiome and Antibiotics'. Archives of Medical Research 48 (8): 727–34.

Iwasaki, Mari, Yasutada Akiba, and Jonathan D Kaunitz. 2019. 'Recent Advances in Vasoactive Intestinal Peptide Physiology and Pathophysiology: Focus on the Gastrointestinal System'. F1000Research 8.

Johnsen, Bjørn Odd, Nina Handal, Roger Meisal, Jørgen Vildershøj Bjørnholt, Peter Gaustad, and Truls Michael Leegaard. 2017. 'Erm Gene Distribution among Norwegian Bacteroides Isolates and Evaluation of Phenotypic Tests to Detect Inducible Clindamycin Resistance in Bacteroides Species'. Anaerobe 47: 226–32.

Johnson, Jethro S., Daniel J. Spakowicz, Bo-Young Hong, Lauren M. Petersen, Patrick Demkowicz, Lei Chen, Shana R. Leopold, et al. 2019. 'Evaluation of 16S RRNA Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis'. Nature Communications 10 (1): 5029. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1.

Jourova, Lenka, Pavel Anzenbacher, and Eva Anzenbacherova. 2016. 'Human Gut Microbiota Plays a Role in the Metabolism of Drugs'. Biomedical Papers 160 (3): 317–26. https://doi.org/10.5507/bp.2016.039.

Klaassen, C. D., and J. Y. Cui. 2015. 'Review: Mechanisms of How the Intestinal Microbiota Alters the Effects of Drugs and Bile Acids'. Drug Metabolism and Disposition 43 (10): 1505–21. https://doi.org/10.1124/dmd.115.065698.

Koch, R. L., and P. Goldman. 1979. 'The Anaerobic Metabolism of Metronidazole Forms N-(2-Hydroxyethyl)-Oxamic Acid'. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 208 (3): 406–10.

Koch, R. L., E. J. Chrystal, B. B. Beaulieu, and P. Goldman. 1979. 'Acetamide--a Metabolite of Metronidazole Formed by the Intestinal Flora'. Biochemical Pharmacology 28 (24): 3611–15. https://doi.org/10.1016/0006-2952(79)90407-6.

Kofteridis, Diamantis P., Sofia Maraki, Ioanna Mixaki, Elpis Mantadakis, and George Samonis. 2004. 'Impact of Prolonged Treatment with Trimethoprim-Sulfamethoxazole on the Human Gut Flora'. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 36 (10): 771–72. https://doi.org/10.1080/00365540410020956a.

Koppel, Nitzan, Vayu Maini Rekdal, and Emily P. Balskus. 2017. 'Chemical Transformation of Xenobiotics by the Human Gut Microbiota'. Science 356 (6344): eaag2770. https://doi.org/10.1126/science.aag2770.

Kump, Patrizia K, Hans-Peter Gröchenig, Stefan Lackner, Slave Trajanoski, Gerhard Reicht, K Martin Hoffmann, Andrea Deutschmann, Heimo H Wenzl, Wolfgang Petritsch, and Guenter J Krejs. 2013. 'Alteration of Intestinal Dysbiosis by Fecal Microbiota Transplantation Does Not Induce Remission in Patients with Chronic Active Ulcerative Colitis'. Inflammatory Bowel Diseases 19 (10): 2155–65.

Lagier, J-C, Fabrice Armougom, M Million, P Hugon, I Pagnier, C Robert, F Bittar, G Fournous, G Gimenez, and Marie Maraninchi. 2012. 'Microbial Culturomics: Paradigm Shift in the Human Gut Microbiome Study'. Clinical Microbiology and Infection 18 (12): 1185–93.

Lange, Kathleen, Martin Buerger, Andreas Stallmach, and Tony Bruns. 2016. 'Effects of Antibiotics on Gut Microbiota'. Digestive Diseases 34 (3): 260–68. https://doi.org/10.1159/000443360.

Lankelma, Jacqueline M, Duncan R Cranendonk, Clara Belzer, Alex F De Vos, Willem M De Vos, Tom Van Der Poll, and W Joost Wiersinga. 2017. 'Antibiotic-Induced Gut Microbiota Disruption during Human Endotoxemia: A Randomised Controlled Study'. Gut 66 (9): 1623–30.

Lau, Jennifer T, Fiona J Whelan, Isiri Herath, Christine H Lee, Stephen M Collins, Premysl Bercik, and Michael G Surette. 2016. 'Capturing the Diversity of the Human Gut Microbiota through Culture-Enriched Molecular Profiling'. Genome Medicine 8 (1): 1–10.

Lau, Jennifer T., Fiona J. Whelan, Isiri Herath, Christine H. Lee, Stephen M. Collins, Premysl Bercik, and Michael G. Surette. 2016. 'Capturing the Diversity of the Human Gut Microbiota through Culture-Enriched Molecular Profiling'. Genome Medicine 8 (1): 72. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0327-7.

Lauritsen, K., J. Hansen, M. Ryde, and J. Rask-Madsen. 1984. 'Colonic Azodisalicylate Metabolism Determined by in Vivo Dialysis in Healthy Volunteers and Patients with Ulcerative Colitis'. Gastroenterology 86 (6): 1496–1500.

Le Bastard, Quentin, Tonya Ward, Dimitri Sidiropoulos, Benjamin M Hillmann, Chan Lan Chun, Michael J Sadowsky, Dan Knights, and Emmanuel Montassier. 2018. 'Fecal Microbiota Transplantation Reverses Antibiotic and Chemotherapy-Induced Gut Dysbiosis in Mice'. Scientific Reports 8 (1): 1–11.

Lima, Ana Carolina Delgado, Clara Cecatti, Melaine Priscila Fidélix, Maria Angela Tallarico Adorno, Isabel Kimiko Sakamoto, Thais Borges Cesar, and Katia Sivieri. 2019. 'Effect of Daily Consumption of Orange Juice on the Levels of Blood Glucose, Lipids, and Gut Microbiota Metabolites: Controlled Clinical Trials'. Journal of Medicinal Food 22 (2): 202–10. https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0080.

Lozupone, Catherine A., Jesse I. Stombaugh, Jeffrey I. Gordon, Janet K. Jansson, and Rob Knight. 2012. 'Diversity, Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota'. Nature 489 (7415): 220–30. https://doi.org/10.1038/nature11550.

Lu, Kun, Ridwan Mahbub, and James G. Fox. 2015. 'Xenobiotics: Interaction with the Intestinal Microflora'. ILAR Journal 56 (2): 218–27. https://doi.org/10.1093/ilar/ilv018.

Maier, Lisa, Mihaela Pruteanu, Michael Kuhn, Georg Zeller, Anja Telzerow, Exene Erin Anderson, Ana Rita Brochado, Keith Conrad Fernandez, Hitomi Dose, and Hirotada Mori. 2018. 'Extensive Impact of Non-Antibiotic Drugs on Human Gut Bacteria'. Nature 555 (7698): 623–28.

Martels, Julius ZH von, Mehdi Sadaghian Sadabad, Arno R Bourgonje, Tjasso Blokzijl, Gerard Dijkstra, Klaas Nico Faber, and Hermie JM Harmsen. 2017. 'The Role of Gut Microbiota in Health and Disease: In Vitro Modeling of Host-Microbe Interactions at the Aerobe-Anaerobe Interphase of the Human Gut'. Anaerobe 44: 3–12.

Martels, Julius Zweder Hubertus von. 2019. 'Towards Novel Biomarkers and Rational Nutritional Interventions in Inflammatory Bowel Disease'.

Marzorati, Massimo, Barbara Vanhoecke, Tine De Ryck, Mehdi Sadaghian Sadabad, Iris Pinheiro, Sam Possemiers, Pieter Van den Abbeele, et al. 2014. 'The HMITM Module: A New Tool to Study the Host-Microbiota Interaction in the Human Gastrointestinal Tract in Vitro'. BMC Microbiology 14 (May): 133. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-133.

Matsunaga, Nozomu, Haruka Shimizu, Kanako Fujimoto, Kanako Watanabe, Tsutomu Yamasaki, Naoya Hatano, Eiji Tamai, Seiichi Katayama, and Yasuo Hitsumoto. 2018. 'Expression of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase on the Surface of Clostridium Perfringens Cells'. Anaerobe 51 (June): 124–30. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.001.

Montandon, Sophie A, and François R Jornayvaz. 2017. 'Effects of Antidiabetic Drugs on Gut Microbiota Composition'. Genes 8 (10): 250.

Nagy, Elisabeth, J Sóki, Edit Urbán, Ildikó Szőke, Eleonóra Fodor, and R Edwards. 2001. 'Occurrence of Metronidazole and Imipenem Resistance among Bacteroides Fragilis Group Clinical Isolates in Hungary'. Acta Biologica Hungarica 52 (2–3): 271–80.

Nguyen, Romario, Sarah Da Won Bae, Gang Zhou, Scott A Read, Golo Ahlenstiel, Jacob George, and Liang Qiao. 2020. 'Application of Organoids in Translational Research of Human Diseases with a Particular Focus on Gastrointestinal Cancers'. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 1873 (2): 188350.

Nguyen, Thanh Tra, Thu Thuy Pham, Michael Packianather, and Chi Hieu Le. 2019. 'Molecular Screening and Genetic Diversity Analysis of Anticancer Azurin-Encoding and Azurin-like Genes in Human Gut Microbiome Deduced through Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Studies'. International Microbiology 22 (4): 437–49.

Niestępski, Sebastian, Monika Harnisz, Ewa Korzeniewska, Ma Guadalupe Aguilera-Arreola, Araceli Contreras-Rodríguez, Zofia Filipkowska, and Adriana Osińska. 2019. 'The Emergence of Antimicrobial Resistance in Environmental Strains of the Bacteroides Fragilis Group'. Environment International 124: 408–19.

Oda, Shingo, Ryoichi Fujiwara, Yuki Kutsuno, Tatsuki Fukami, Tomoo Itoh, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. 2015. 'Targeted Screen for Human UDP-Glucuronosyltransferases Inhibitors and the Evaluation of Potential Drug-Drug Interactions with Zafirlukast'. Drug Metabolism and Disposition 43 (6): 812–18. https://doi.org/10.1124/dmd.114.062141.

Ovesen, Agnes Louise, Miia Riihimäki, Viveca Båverud, and Märit Pringle. 2016. 'Antimicrobial Susceptibility of Bacteroides Spp. From Clinical Samples From Horses'. Journal of Equine Veterinary Science 45 (October): 46–52. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.073.

Panda, Suchita, Ismail El khader, Francesc Casellas, Josefa López Vivancos, Montserrat García Cors, Alba Santiago, Silvia Cuenca, Francisco Guarner, and Chaysavanh Manichanh. 2014. 'Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota'. Edited by Paul D. Cotter. PLoS ONE 9 (4): e95476. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476.

Panek, Marina, Hana Čipčić Paljetak, Anja Barešić, Mihaela Perić, Mario Matijašić, Ivana Lojkić, Darija Vranešić Bender, Željko Krznarić, and Donatella Verbanac. 2018. 'Methodology Challenges in Studying Human Gut Microbiota–Effects of Collection, Storage, DNA Extraction and next Generation Sequencing Technologies'. Scientific Reports 8 (1): 1–13.

Pilla, Rachel, Frederic P. Gaschen, James W. Barr, Erin Olson, Julia Honneffer, Blake C. Guard, Amanda B. Blake, et al. 2020. 'Effects of Metronidazole on the Fecal Microbiome and Metabolome in Healthy Dogs'. Journal of Veterinary Internal Medicine 34 (5): 1853–66. https://doi.org/10.1111/jvim.15871.

Privitera, G., A. Dublanchet, and Madeleine Sebald. 1979. 'Transfer of Multiple Antibiotic Resistance between Subspecies of Bacteroides Fragilis'. The Journal of Infectious Diseases 139 (1): 97–101. https://doi.org/10.1093/infdis/139.1.97.

Rafii, F., and C. E. Cerniglia. 1993. 'Comparison of the Azoreductase and Nitroreductase from Clostridium Perfringens'. Applied and Environmental Microbiology 59 (6): 1731–34. https://doi.org/10.1128/AEM.59.6.1731-1734.1993.

Relman, David A. 2012. 'The Human Microbiome: Ecosystem Resilience and Health'. Nutrition Reviews 70 (suppl_1): S2–9.

Rettedal, Elizabeth A, Heidi Gumpert, and Morten OA Sommer. 2014. 'Cultivation-Based Multiplex Phenotyping of Human Gut Microbiota Allows Targeted Recovery of Previously Uncultured Bacteria'. Nature Communications 5 (1): 1–9.

Rijk, M. C., R. A. van Hogezand, A. van Schaik, and J. H. van Tongeren. 1989. 'Disposition of 5-Aminosalicylic Acid from 5-Aminosalicylic Acid-Delivering Drugs during Accelerated Intestinal Transit in Healthy Volunteers'. Scandinavian Journal of Gastroenterology 24 (10): 1179–85. https://doi.org/10.3109/00365528909090784.

Rinninella, Emanuele, Pauline Raoul, Marco Cintoni, Francesco Franceschi, Giacinto Abele Donato Miggiano, Antonio Gasbarrini, and Maria Cristina Mele. 2019. 'What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases'. Microorganisms 7 (1). https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014.

Saitta, Kyle S., Carmen Zhang, Kang Kwang Lee, Kazunori Fujimoto, Matthew R. Redinbo, and Urs A. Boelsterli. 2014. 'Bacterial β-Glucuronidase Inhibition Protects Mice against Enteropathy Induced by Indomethacin, Ketoprofen or Diclofenac: Mode of Action and Pharmacokinetics'. Xenobiotica 44 (1): 28–35. https://doi.org/10.3109/00498254.2013.811314.

Schumacher, Ulrike K., and Bernd Single. 1998. 'Susceptibility of the Anaerobic Gram-Negative Non-Sporulating Rod, Bilophila Wadsworthia to Beta-Lactams, Beta-Lactamase Inhibitors, Meropenem, Metronidaz'. Zentralblatt Für Bakteriologie 287 (4): 421–25. https://doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80179-5.

Selber-Hnatiw, Susannah, Tarin Sultana, W Tse, Niki Abdollahi, Sheyar Abdullah, Jalal Al Rahbani, Diala Alazar, Nekoula Jean Alrumhein, Saro Aprikian, and Rimsha Arshad. 2020. 'Metabolic Networks of the Human Gut Microbiota'. Microbiology 166 (2): 96–119.

Senghor, Bruno, Cheikh Sokhna, Raymond Ruimy, and Jean-Christophe Lagier. 2018. 'Gut Microbiota Diversity According to Dietary Habits and Geographical Provenance'. Human Microbiome Journal 7–8 (April): 1–9. https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.01.001.

Shah, Pranjul, Joelle Fritz, Matt Estes, Frederic Zenhausern, and Paul Wilmes. 2014. 'HuMiX: A Microfluidics-Based in Vitro Co-Culture Device for Investigating Host-Microbe Molecular Interactions'. In , 300–302. Chemical and Biological Microsystems Society.

Silverman, Justin D, Heather K Durand, Rachael J Bloom, Sayan Mukherjee, and Lawrence A David. 2018. 'Dynamic Linear Models Guide Design and Analysis of Microbiota Studies within Artificial Human Guts'. Microbiome 6 (1): 1–20.

Sommer, Morten OA. 2015. 'Advancing Gut Microbiome Research Using Cultivation'. Current Opinion in Microbiology 27: 127–32.

Song, Yuli, Chengxu Liu, Julia Lee, Mauricio Bolaňos, Marja-Liisa Vaisanen, and Sydney M Finegold. 2005. '"Bacteroides Goldsteinii Sp. Nov." Isolated from Clinical Specimens of Human Intestinal Origin'. Journal of Clinical Microbiology 43 (9): 4522–27.

Sousa, Tiago, Ronnie Paterson, Vanessa Moore, Anders Carlsson, Bertil Abrahamsson, and Abdul W. Basit. 2008. 'The Gastrointestinal Microbiota as a Site for the Biotransformation of Drugs'. International Journal of Pharmaceutics 363 (1–2): 1–25. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.009.

Sun, Chaonan, Ling Chen, and Zhu Shen. 2019. 'Mechanisms of Gastrointestinal Microflora on Drug Metabolism in Clinical Practice'. Saudi Pharmaceutical Journal 27 (8): 1146–56. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.011.

Sung, Jaeyun, Seunghyeon Kim, Josephine Jill T Cabatbat, Sungho Jang, Yong-Su Jin, Gyoo Yeol Jung, Nicholas Chia, and Pan-Jun Kim. 2017. 'Global Metabolic Interaction Network of the Human Gut Microbiota for Context-Specific Community-Scale Analysis'. Nature Communications 8 (1): 1–12.

Tap, Julien, Stanislas Mondot, Florence Levenez, Eric Pelletier, Christophe Caron, Jean-Pierre Furet, Edgardo Ugarte, et al. 2009. 'Towards the Human Intestinal Microbiota Phylogenetic Core'. Environmental Microbiology 11 (10): 2574–84. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.

Teng, Lee-Jene, Po-Ren Hsueh, Jui-Chang Tsai, Shwu-Jen Liaw, Shen-Wu Ho, and Kwen-Tay Luh. 2002. 'High Incidence of Cefoxitin and Clindamycin Resistance among Anaerobes in Taiwan'. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46 (9): 2908–13.

Thiemann, Sophie, Nathiana Smit, and Till Strowig. 2016. 'Antibiotics and the Intestinal Microbiome : Individual Responses, Resilience of the Ecosystem, and the Susceptibility to Infections'. Current Topics in Microbiology and Immunology 398: 123–46. https://doi.org/10.1007/82_2016_504.

Tsitko, Irina, Fanny Wiik-Miettinen, Outi Mattila, Natalia Rosa-Sibakov, Tuulikki Seppänen-Laakso, Johanna Maukonen, Emilia Nordlund, and Maria Saarela. 2019. 'A Small in Vitro Fermentation Model for Screening the Gut Microbiota Effects of Different Fiber Preparations'. International Journal of Molecular Sciences 20 (8): 1925.

Turnbaugh, Peter J., Micah Hamady, Tanya Yatsunenko, Brandi L. Cantarel, Alexis Duncan, Ruth E. Ley, Mitchell L. Sogin, et al. 2009. 'A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins'. Nature 457 (7228): 480–84. https://doi.org/10.1038/nature07540.

Veloo, A. C. M., and A. J. van Winkelhoff. 2015. 'Antibiotic Susceptibility Profiles of Anaerobic Pathogens in The Netherlands'. Anaerobe, Special Issue: Antibiotic resistance of anaerobic bacteria, 31 (February): 19–24. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.011.

Vila, Arnau Vich, Valerie Collij, Serena Sanna, Trishla Sinha, Floris Imhann, Arno R Bourgonje, Zlatan Mujagic, Daisy MAE Jonkers, Ad AM Masclee, and Jingyuan Fu. 2020. 'Impact of Commonly Used Drugs on the Composition and Metabolic Function of the Gut Microbiota'. Nature Communications 11 (1): 1–11.

Villa, Max M, Rachael J Bloom, Justin D Silverman, Heather K Durand, Sharon Jiang, Anchi Wu, Shuqiang Huang, Lingchong You, and Lawrence A David. 2019. 'High-Throughput Isolation and Culture of Human Gut Bacteria with Droplet Microfluidics'. BioRxiv, 630822.

Vrancken, Gino, Ann C Gregory, Geert RB Huys, Karoline Faust, and Jeroen Raes. 2019. 'Synthetic Ecology of the Human Gut Microbiota'. Nature Reviews Microbiology 17 (12): 754–63.

Walsh, Jacinta, Brendan T Griffin, Gerard Clarke, and Niall P Hyland. 2018. 'Drug–Gut Microbiota Interactions: Implications for Neuropharmacology'. British Journal of Pharmacology 175 (24): 4415–29.

Wanga, Xibao, Yao Chena, Yongquan Shanga, Xiaoyang Wua, Qinguo Weia, Jun Chenb, Jiakuo Yana, and Honghai Zhanga. 2019. 'Comparison of the Gut Microbiome in Red Deer (Cervus Elaphus) and Fallow Deer (Dama Dama) by High-Throughput Sequencing of the V3–V4 Region of the 16S RRNA Gene'. SCIENCEASIA 45 (6): 515–24.

Watanabe, K., S. Yamashita, K. Furuno, H. Kawasaki, and Y. Gomita. 1995. 'Metabolism of Omeprazole by Gut Flora in Rats'. Journal of Pharmaceutical Sciences 84 (4): 516–17. https://doi.org/10.1002/jps.2600840425.

Wei, Yan-Xia, Zhuo-Yang Zhang, Chang Liu, Pradeep K Malakar, and Xiao-Kui Guo. 2012. 'Safety Assessment of Bifidobacterium Longum JDM301 Based on Complete Genome Sequences'. World Journal of Gastroenterology : WJG 18 (5): 479–88. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i5.479.

Whittle, G., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers. 2002. 'The Role of Bacteroides Conjugative Transposons in the Dissemination of Antibiotic Resistance Genes'. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 59 (12): 2044–54. https://doi.org/10.1007/s000180200004.

Wilson, Ian D., and Jeremy K. Nicholson. 2017. 'Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism, Efficacy, and Toxicity'. Translational Research 179 (January): 204–22. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002.

Yaffe, Eitan, and David A. Relman. 2020. 'Tracking Microbial Evolution in the Human Gut Using Hi-C Reveals Extensive Horizontal Gene Transfer, Persistence and Adaptation'. Nature Microbiology 5 (2): 343–53.

Zimmermann, Michael, Maria Zimmermann-Kogadeeva, Rebekka Wegmann, and Andrew L Goodman. 2019. 'Mapping Human Microbiome Drug Metabolism by Gut Bacteria and Their Genes'. Nature 570 (7762): 462–67.

Zimmermann, Petra, and Nigel Curtis. 2019. 'The Effect of Antibiotics on the Composition of the Intestinal Microbiota - a Systematic Review'. Journal of Infection 79 (6): 471–89. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.10.008.

Zou, Ling, Peter Spanogiannopoulos, Lindsey M. Pieper, Huan-Chieh Chien, Wenlong Cai, Natalia Khuri, Joshua Pottel, et al. 2020. 'Bacterial Metabolism Rescues the Inhibition of Intestinal Drug Absorption by Food and Drug Additives'. Proceedings of the National Academy of Sciences 117 (27): 16009–18. https://doi.org/10.1073/pnas.1920483117.

Zuo, Tao, Sunny H Wong, Chun Pan Cheung, Kelvin Lam, Rashid Lui, Kitty Cheung, Fen Zhang, Whitney Tang, Jessica YL Ching, and Justin CY Wu. 2018. 'Gut Fungal Dysbiosis Correlates with Reduced Efficacy of Fecal Microbiota Transplantation in Clostridium Difficile Infection'. Nature Communications 9 (1): 1–11.

Table 1: List of strains used to construct the *in vitro* human gut microbiota model.

Phylum	Strain	Collection/Reference [a]
Actinobacteria	*Bifidobacterium adolescentis*	DSM 20083
	Bifidobacterium longum	DSM 20219
	Collinsella aerofaciens	DSM 3979
	Eggerthella lenta	DZM 2243
Bacteroidetes	*Bacteroides caccae*	DSM 19024
	Bacteroidetes fragilis	DSM 2151
	Bacteroidetes ovatus	ATCC 8483
	Bacteroidetes thetaiotaomicron	Clinical strain
	Bacteroidetes uniformis	DSM 6597
	Bacteroidetes vulgatus	ATCC 8482
	Odoribacter splanchnicus	DSM 20712
	Parabacteroides distasonis	DSM 20701
	Parabacteroides merdae	DSM 19495
	Prevotella copri	DSM 18205
Firmicutes	*Blautia obeum*	DSM 25238
	Clostridioides difficile	DSM 27543
	Clostridium bolteae	DSM 15670
	Clostridium leptum	DSM 753
	Clostridium ramosum	DSM 1402
	Clostridium saccharolyticum	DSM 2544
	Clostridium perfringens	DSM 11782
	Coprococcus comes	ATCC 27758
	Dorea formicigenerans	DSM 3992
	Enterococcus faecalis	ATCC 19433
	Eubacterium eligens	DSM 3376
	Faecalibacterium prausnitzii	DSM 17677
	Lactobacillus rhamnosus	DSM 20021
	Roseburia intestinali	DSM 14610
	Ruminococcus bromii	ATCC 27255
	Ruminococcus flavefaciens	ATCC 49949
	Ruminococcus gnavus	ATCC 29149
	Ruminococcus torques	ATCC 27756
	Streptococcus parasanguinis	DSM 6778
	Streptococcus salivarius	DSM 20617
	Veillonella parvula	DSM 2008
Fusobacteria	*Fusobacterium nucleatum*	DSM 15643
Proteobacteria	*Bilophila wadsworthia*	ATCC 49260
	Escherichia coli	ATCC 8739
Verrucomicrobia	*Akkermansia muciniphila*	DSM 22959

[a] Bacterial strains were obtained from various culture collections: ATCC (American Type Culture Collection, USA), DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Germany). Other strains were from the laboratory culture collection from University Hospital Center of Poitiers in France.

Table 2: Antibiotics, drugs and xenobiotics tested within the *in vitro* human gut bacteria model.

Category	Tested molecules	Abbreviations	Tested concentration (µM)
Allergy	Fexofenadine hydrochloride	Fexof	5.00
Analgesics	Acetaminophen	Acetam	5.00
Antibiotics	Cefpodoxime	Cefpo	2.34
	Erythromycin	Erythro	2.04
	Moxifloxacin	Moxiflo	2.49
	Metronidazole	Metronid	8.76
	Trimethoprim (TMP)	Trimetho	6.89
	Sulfamethoxazole (SMP)	Sulfameth	7.90
	Amoxicillin	Amoxi	3.41
	STX	STX	TMP 6.89 + SMT 7.90
Antidepressant	Clomipramine chlorhydrate	Clomip	5.00
Cardiology-angiology	Bisoprolol	Bisop	5.00
	Nisoldipine	Nisol	5.00
	Nifedipine	Nifedi	5.00
	Hesperidin	Hesper	0.82
Hepatology-gastroenterology	Olsalazin	Olsal	6.62
	Omeprazol	Omepra	8.69
Metabolism-nutrient	Ascorbic acid	Ascorb ac	5.00
Nonsteroidal anti-inflammatory	Diclofenac sodium	Diclof	5.00
	Aceclofenac	Aceclof	5.00
Oncology-haematology	Topotecan	Topot	5.00
	Mercaptopurine	Mercapt	5.00
	Warfarin	Warfa	8.11
	Irinotecan	Irino	5.00
Pesticides	Glyphosate	Glypho	5.00
	Boscalid	Bosca	5.00
	Difenoconazole	Difeno	5.00
	Fludioxonil	Fludio	5.00
	Pyrimethanil	Pyrim	5.00
Plastics industry	Bisphenol A	Bisphenol	5.00
	Di-isobutyl phthalate	DisoPhtha	5.00
	Di-n-butyl phthalate solution	DnPhtha	5.00
	Dioctyl phthalate	DicoPhtha	5.00
Preservatives	Methylparaben	Mparab	5.00
	Propylparaben	Prparab	5.00
	Butylparaben	Bparaben	5.00
Positive control	mGAM inoculated	mGAM+	-
Negative control	mGAM non-inoculated	mGAM-	-
Gut Microbiota consortium	Subculture 1	C1	-
	Subculture 2	C2	-
	Subculture 3	C3	-

C. Effect of parabens on commensal and pathogenic staphylococci of the aerobic skin microbiota and reciprocal effect: culture and HPLC-MS/MS approaches

Les produits cosmétiques sont largement utilisés pour améliorer la qualité de la peau et/ou pour la nettoyer. Pour préserver ces produits, les industriels introduisent des conservateurs tels que les parabènes. Ces parabènes sont reconnus pour être des perturbateurs endocriniens sur l'organisme humain mais leurs effets sur la flore de la peau restent encore méconnus. C'est pourquoi nous avons décidé d'explorer les effets que pouvaient avoir 3 parabènes autorisés dans la composition des produits cosmétiques (le méthylparabène, l'éthylparabène et le propylparabène) sur la croissance de 13 souches de staphylocoques du microbiote cutané et l'effet que pouvaient avoir ces souches sur les molécules via des analyses en UHPLC-MS/MS. Parmi les 13 souches sélectionnées, on retrouve 10 *S. epidermidis* (une de référence et 9 isolées de patients), *S. haemolyticus*, *S. hominis* et une souche pathogène *S. aureus*.

En présence des 3 parabènes, nous n'avons pas mis en évidence d'inhibition de croissance, excepté pour la souche *S. epidermidis* S5 qui a vu sa croissance retardée en présence d'éthylparabène. Nous avons observé une augmentation de la croissance significative pour la souche *S. epidermidis* P3 en présence de méthylparabène après une semaine de croissance. Pour ce qui est de la souche pathogène, *S. aureus*, nous avons observé une légère inhibition de croissance en présence d'éthylparabène. L'analyse des résultats d'UHPLC-MS/MS a montré que les souches ne se comportent pas toutes de la même manière vis-à-vis des parabènes. Le méthylparabène est retrouvé à la moitié de sa concentration initiale en présence de *S. aureus* par rapport au contrôle sans bactérie. C'est également le cas en présence de *S. haemolyticus* où il reste environ 45% de méthylparabène dans les surnageants de culture. En présence des autres souches, le méthylparabène n'est pas ou peu retrouvé dans les surnageants de culture (maximum 10% de la concentration initiale). Globalement, l'ethylparabène est retrouvé de manière identique au contrôle dans tous les surnageants de culture sauf pour les souches *S. aureus*, *S. haemolyticus*, et *S. epidermidis* P1. En effet, en présence de *S. aureus,* l'éthylparabène n'est plus retrouvé dans son surnageant de culture, il est diminué de moitié dans celui de *S. haemolyticus* et on n'en retrouve plus que 25% dans celui de *S. epidermidis* P1. En ce qui concerne le propylparabène, les résultats sont souches dépendants. En effet, il est complétement absent du surnageant de culture de *S. aureus* et est retrouvé en faible quantité dans ceux de *S. epidermidis* ATCC 1228, *S. epidermidis* S2, S3, P1, P2, P3 et P4. On le retrouve à la moitié de sa concentration initiale dans les surnageants de *S. haemolyticus*, et de *S. epidermidis* S4 et, finalement entre 50% et 100% de sa concentration initiale pour les autres souches.

Grâce à cette étude, nous avons montré que les parabènes n'affectaient pas la croissance des staphylocoques aérobies qui composent le microbiote cutané. Nous avons mis en évidence grâce à l'analyse des surnageants de culture par UHLPC-MS/MS que les structures de base des parabènes peuvent être dégradés par les souches. Cette dégradation, due aux bactéries, pourrait permettre de protéger l'organisme de l'absorption et des effets néfastes de ces perturbateurs endocriniens.

Ce travail est actuellement en cours de rédaction et fera l'objet d'une publication.

Effect of parabens on staphylococci of the aerobic skin microbiota and reciprocal effect: culture and UHPLC-MS/MS approaches

Florine Ecale[1], Mohammed Benlaassri[2], Nicolas Venisse[3], Jean-Marc Berjeaud[1], Marie-Hélène Rodier[1-3], Alexandre Crépin[1]

[1] Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France.

[2] Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU La Milétrie, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers Cedex, France.

[3] CIC INSERM 1402, Service de Toxicologie et Pharmacocinétique, UFR Médecine Pharmacie, CHU, Poitiers, France.

Keywords : Skin microbiota, paraben, endocrine disruptor, UHPLC-MS/MS, *Staphylococcus*, *S. aureus*, *S. epidermidis, S. hominis, S. haemolyticus*

Abstract

The skin microbiota is defined as a set of microorganisms that have an important role in protecting against external aggressions in addition to their role in the immune system. This cutaneous microbiota comes into contact with many cosmetics used to improve the quality of the skin or to cleanse it. To guarantee the preservation of these products, preservatives are added such as parabens. Although they safeguard the integrity of the products from a microbiological point of view, they are now recognised as endocrine disruptors. In this study, we are testing the effect of 3 parabens authorised in cosmetics on the growth of 13 strains of *Staphylococcus* making part of the aerobic cutaneous microbiota, including one pathogenic strain. We showed that parabens had no effect on the growth of these strains. Furthermore, we evaluated the capacity of these strains to modify the basic structure of the parabens by UHPLC-MS/MS analyses. We found very little methylparaben in the culture supernatants except in the culture supernatants of *S. aureus* and *S. haemolyticus*. As for ethylparaben is not impacted and propylparaben has a dependent strain profile. Thanks to this study, we have shown that the pathogenic strain *S. aureus* behaves differently from the commensal strains of the cutaneous microbiota with respect to parabens and that the bacteria are capable of modifying the parabens although their growth is not impacted.

Introduction

The skin is colonized by hundreds of microorganisms including bacteria, yeasts and protozoa known as the skin microbiota or skin flora (Byrd, Belkaid, et Segre 2018a). This cutaneous microbiota plays a fundamental role in homeostasis between the external environment and the human body. In particular, it is involved in the development of the immune system, in the immune response following an aggression and plays a role as a barrier against external chemical and physical aggressions (Sanford et Gallo 2013a). Two types of bacterial communities are found within the skin, one called "resident" and another called "transient" (Kong et Segre 2012). The transient flora is characterized by microorganisms and in particular bacteria from the external environment, which are in contact with the skin but which will not establish themselves there durably (Ruocco et al. 2007). Indeed, they will not be adapted to the physiological conditions of the skin or they will be eliminated by niche competition by the resident flora. However, some “pathogenic” bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, may succeed in establishing themselves permanently. Approximately 20-50% of the population would be healthy carriers of *S. aureus* (Dunyach-Remy, Sotto, et Lavigne 2015). The resident flora, permanently present, is composed of facultative aerobic or aero-anaerobic commensal microorganisms that are mainly Gram-positive. The genera most commonly found in the cutaneous microbiota are *Staphylococcus*, *Corynebacterium* and *Propionibacterium* (Grice et Segre 2011c).

Among Staphylococci, the three most represented species are *S. epidermidis* (up to 90% of the aerobic skin flora), *S. hominis* and *S. haemolyticus* (Cogen, Nizet, et Gallo 2008b). However, it happens that a disturbance, which is called dysbiosis, can upset this balance. This dysbiosis can then result in skin pathologies. It can also eventually cause a decrease in bacterial diversity, leaving place for pathogenic transient flora bacteria (Wallen-Russell et Wallen-Russell 2017a). The elements triggering dysbiosis can be multiple. Among them are lifestyle, age, stress, genetic factors, antibiotics or cosmetics (Schommer et Gallo 2013b). Cosmetics are defined as a mixture of substances that come into contact with the skin. To avoid contamination of preparations, manufacturers introduce preservatives, among them parabens (Nicolopoulou-Stamati, Hens, et Sasco 2015). The use of parabens is highly regulated, and their maximum concentration must not exceed 0.4% when a single one is used and 0.8% when used in combination in a cosmetic product (**Annex V CE No. 1223/2009**). However, their use is controversial because they are known to be endocrine disruptors and could also cause skin pathologies such as atopic dermatitis (Ju et Zouboulis 2016). Moreover, their effect on the skin microbiota is poorly documented. Research is focusing more on one or two bacterial strains and in particular on *S. aureus* (Crovetto et al. 2017; Pierson, Smoot, et Vantassell 1980; Steczko et al. 2010). In this study we analyzed the effect of 3 parabens most commonly found in cosmetics: methylparaben, ethylparaben and propylparaben on 13 strains of the *Staphylococcus* genera that can be recovered in the aerobic skin microbiota, including one potential pathogenic bacteria *S. aureus.*

Materials and methods

Bacterial strains, media, chemicals:

The bacterial strains used in this study are listed in the table 1. Some were purchased from ATCC (American Type Culture Collection) and DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Other used strains were taken in patients of CHU (University Hospital Center) of Poitiers in France. Strains called « S » are taken in the surface of arm in healthy patients and strains called « P » are taken at the level of infected hips prosthesis. Before experiments, all strains were grown for 48 h in Luria Bertoni agar medium (for 1L of: 5 g of peptone, 5 g of NaCl, 2.5 g of yeast extract and 15 g of agar) at 30°C. The reaction medium used is Luria Bertani without agar diluted to ½ with sterile water and adjusted at pH 5 before sterilization. Methylparaben, ethylparaben and propylparaben, purchased from Sigma Aldrich, were dissolved in DMSO (Sigma Aldrich) and stocked at -20°C before use.

Parabens effects on bacteria growth:

The sensitivity of the 13 strains was determined with respect to the 3 parabens. A bacterial pre-culture is adjusted to 1.10^6 CFU/mL (1 = OD_{595nm} corresponding to 1.10^9 UFC/mL) and deposited in a 96-well plate. Parabens are added to 1 mM for methylparaben and ethylparaben and 100 µM for propylparaben (the maximum concentration allowed in cosmetics is lower than for methylparaben and ethylparaben) for each strain and the plates were incubated at 30°C. The DMSO condition was used for control during this study. A growth monitoring was carried out during one week, with a reading of OD_{595nm} at T24, T48, T72, T144 and T168 in the spectrophotometer (**TECANTM, Sunrise Remote, Austria**). Each bacterial growth was evaluated with and without paraben (DMSO condition).

Determination of parabens concentrations:

Quantification of methyl-, ethyl- and propyl-paraben was performed using liquid-chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). For this purpose, the bacterial cultures were centrifuged (30 min, 4°C, 2500 rpm) and supernatants were recovered for analysis. Broth samples were simply diluted 1:15000 (methylparaben and ethylparaben) and 1:1500 (propylparaben) with ultrapure water and acetonitrile (50:50) and 20 µL of dilution were injected into the UHPLC-MS/MS system consisting in a Shimadzu (Nexera X2 (Kyoto, Japan)) UHPLC system coupled to a 6500+ QTrap mass spectrometer from Sciex (Concord, Canada). Chromatographic separation of target compounds was achieved with a 3.5 µm CSH column (Waters® Acquity CSH C18, 2.1 x 100 mm, Milford, USA) heated at 40° C. The mobile phase consisting in pure water (phase A) and acetonitrile (phase B) was delivered at 0.35 mL/min in the gradient mode, according to the following gradient program: from 0 to 1 minute, 0% of B ; from 1 to 4 minutes, linear increase to 20% of B ; from 4 to 7 minutes, linear increase to 98.6%; from 7 to 8 minutes, mobile phase concentration kept to 98.6%; from 8 to 10.5 minutes, back to initial conditions to equilibrate the column for the next run. Ionization of target compounds was achieved by electrospray source in negative mode and the formed ions were detected by the mass spectrometer operating in the multiple reaction monitoring mode (MRM) with two specific daughter fragment transitions for each parent precursor ion, one for quantification and the second for confirmation. Data acquisition was performed with Analyst® software and quantification with MultiQuant® software.

Results

The sensitivity of the 13 strains of *Staphylococcus* was determined with respect to 3 parabens authorized as preservatives in cosmetics (Figure 1). We observed no inhibition of the growth of *S. epidermidis* ATCC 12228 in the presence of the parabens under our conditions compared to the control condition. *S. epidermidis* strains S1, S2, S3, S4, P1, P2 and P4 behave identically to the reference strain.

Growth retardation is observed in the presence of ethylparaben for the *S. epidermidis* S5 strain, but this growth delay is caught up after 144 hours of culture. Concerning the *S. epidermidis* P3 strain, we observe a slight increase in growth in the presence of 1mM of methylparaben after 1 week of culture compared to the control condition. The growth of *S. hominis* and *S. haemolyticus* strains in the presence of parabens is identical to the growth of strains without these compounds. The growth of the *S. aureus* strain is slightly reduced in the presence of ethylparaben.

In order to determine the effects of bacterial strains on the concentration of parabens, culture supernatants were analysed in HPLC-MS/MS. Both conditions (bacteria in culture medium with or without parabens) were incubated for 7 days at 30°C. Figure 2 shows the percentages of parabens found in the bacterial supernatants compared to the 100% standard controls. Our results indicate that methylparaben is only minimally found in the bacterial supernatants. 60% of the initial concentration of methylparaben is found in the *S. aureus* ATCC 29213 supernatant and approximately 40% in the *S. haemolyticus* DSM 20263 supernatant whereas approximately 5% of the initial concentration is found in the other supernatants and a total absence of methylparaben is found in the supernatant of *S. epidermidis* ATCC 1228. Regarding ethylparaben, we observed that it is found identically to the control in 7 bacterial supernatants (*S. hominis* DSM 20328, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* S2, *S. epidermidis* S3, *S. epidermidis* S4, *S. epidermidis* S5 and *S. epidermidis* P4). Ethylparaben concentration between 60% and 80% compared to control is found in the supernatants of *S. epidermidis S1*, *S. epidermidis P2* and *S. epidermidis P3*. The concentration was halved in the supernatant of *S. haemolyticus* DSM 20263 and 70% in the supernatant of *S. epidermidis* P1. Ethylparaben and propylparaben are absent from the culture supernatant of *S. aureus* ATCC 29213. Propylparaben is present at low concentrations in the supernatants of *S. epidermidis* ATCC 1228 (22%), *S. epidermidis S2* (20%), *S. epidermidis* P1 (11%), *S. epidermidis* P3 (14%), and *S. epidermidis* P4 (21%) and is found in higher concentrations in the supernatants of *S. haemolyticus* DSM 20263 (50%), *S. hominis* (66%), *S. epidermidis* S3 (36%), *S. epidermidis* S4 (53%), *S. epidermidis* S5 (77%), *S. epidermidis P2* (30%). No difference was observed in the supernatant of *S. epidermidis* S1 compared to the control.

Discussion

A Spanish study showed in 2009 that 99% of creams and lotions contain parabens compared to 77% of make-up removers (Tavares et al. 2009). It is therefore important to explore the effects of parabens on the bacteria that make up the skin microbiota. The aim of our study was therefore to determine the effects of 3 parabens authorised in the composition of cosmetics on 13 strains of *Staphylococci* including one potential pathogenic strain of the aerobic skin microbiota. The concentrations used in this work were determined from the maximum concentrations authorised by the legal texts in Europe.

(« RÈGLEMENT (UE) No 358/2014 DE LA COMMISSION - du 9 avril 2014 - modifiant les annexes II et V du règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques - »)

We demonstrated that parabens have very little impact on the growth of *Staphylococcus* strains. Indeed, only the growth of the pathogenic strain *S. aureus* was slightly inhibited by the presence of parabens. This result is consistent with that of Crovetto and his team who showed that at high concentration (500 µg/mL or 3.28 mM) of methylparaben, the growth of *S. aureus* was not inhibited (Crovetto et al. 2017). However, an earlier study showed significant growth inhibition of *S. aureus* in the presence of 500 ppm (2.778 mM) propylparaben but not at lower concentrations (250 ppm (1.40 mM), 100 ppm (0.556 mM) (Pierson, Smoot, et Vantassell 1980). The growth of the strains tested was not affected either, except for *S. epidermidis* S5 which shows growth retardation in the presence of ethylparaben and for *S. epidermidis* P3 which shows a higher growth than the control in the presence of methylparaben. These results differ from some studies found in the literature since it is described that parabens are more effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria (Matwiejczuk, Galicka, et Brzóska 2020) and that the antimicrobial activity is proportional to the length of the alkyl chain (Routledge et al. 1998). We showed in the present study that, in our conditions, parabens do not inhibit the growth of the Gram+ strains tested. However, the bactericidal action of parabens is not clearly established at the concentrations authorised in the composition of cosmetics (Crovetto et al. 2017). It is therefore important to carry out these tests on the bacteria of the cutaneous microbiota encountered by parabens used in cosmetics. The superior growth of *S. epidermidis* P3 in the presence of methylparaben could be explained by the fact that the bacterium is capable of using this paraben as a carbon source. In fact, we found very little methylparaben in its culture supernatant (10% of the initial concentration), suggesting that this bacteria can use the available carbons to feed itself and increase its metabolism. Some authors have also submitted this hypothesis for the bacteria *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*, which are capable of degrading methylparaben and propylparaben without paraben degradation products being recovered (Amin et al. 2010). In addition to the *S. epidermidis* P3 strain, other strains are capable of modifying the structure of parabens so that the basic structure is no longer found in culture supernatants. This is the case of methylparaben, which is very little found or absent (between 0% and 15%) in the supernatants of all strains except for *S. aureus* and *S. haemolyticus*. It has been reported that Gram + soil bacteria are capable of degrading methylparaben and thus eliminating this pollutant from the soil (Juárez-Jiménez et al. 2019). We can then assume that bacteria in the skin microbiota do the same to eliminate the methylparaben present in cosmetics. Interestingly, two strains behave differently with regard to methylparaben. In fact, about 50% of the initial concentration is found in the supernatants of *S. aureus* and *S. haemolyticus*. These

two bacteria are frequently isolated from the skin microbiota but are also responsible for nosocomial infections **(Cogen et al., 2008b; Perl and Golub, 1998; Vignaroli et al., 2006)** and behave differently towards methylparaben. Indeed, these bacterial strains are known to produce an important biofilm (Archer et al. 2011; Fredheim et al. 2009) in response to external stimuli. Methylparaben could then increase biofilm formation by these strains, making them less metabolically active to degrade the compound. We also showed that propylparaben was found in small quantities in the supernatants of several strains (*S. aureus*, *S. epidermidis* ATCC, *S. epidermidis* S2, *S. epidermidis* P1, *S. epidermidis* P3 and *S. epidermidis* P4). Here we can hypothesize that bacteria internalize propylparaben for degradation purposes and or to use the carbon to grow. The degradation of parabens due to bacteria in the skin microbiota could also explain the fact that parabens are no longer found on the skin several hours after their application via cosmetic products. (Fischmeister, Hellgren, et Vincent 1975; Ishiwatari et al. 2007).

Conclusion

Our study showed that parabens at the concentrations used in cosmetic product formulations did not inhibit or to an almost negligible extent the growth of *Staphylococci* strains of the skin microbiota, including the pathogenic strain *S. aureus*. UHPLC-MS analyses have also shown that all the bacteria are capable of modifying the structure of parabens, particularly methylparaben. So, the ability of the bacteria that make up the skin microbiota to partially or totally degrade the parabens could help the organism to avoid these endocrine disruptors.

Acknowledgements

We thank Marie-Hélène Rodier and the CHU of Poitiers for the strains gift. We would also like to thank Nicolas Venisse for carrying out the analyses by HPLC-MS.

Author contribution statement

F.E., A.C., MH.R., JM.B., and N.V. conceived and designed the study. F.E., M.B. and NV conducted the experiments. F.E., A.C., and MH.R. analysed the results and wrote the paper. All authors reviewed the final manuscript.

Funding

This work was support by internal funding of the CNRS UMR 7267, Laboratory and partly granted by the following 2015–2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER).

Transparency declaration

No transparency declarations.

References

Amin, A., Chauhan, S., Dare, M., and Bansal, A.K. (2010). Degradation of parabens by Pseudomonas beteli and Burkholderia latens. Eur. J. Pharm. Biopharm. *75*, 206–212.

Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., and Shirtliff, M.E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms. Virulence *2*, 445–459.

Byrd, A.L., Belkaid, Y., and Segre, J.A. (2018). The human skin microbiome. Nat. Rev. Microbiol. *16*, 143–155.

Cogen, A.L., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2008a). Skin microbiota: a source of disease or defence?: Skin microbiota. Br. J. Dermatol. *158*, 442–455.

Crovetto, S.I., Moreno, E., Dib, A.L., Espigares, M., and Espigares, E. (2017). Bacterial toxicity testing and antibacterial activity of parabens. Toxicol. Environ. Chem. *99*, 858–868.

Dunyach-Remy, C., Sotto, A., and Lavigne, J.-P. (2015). Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. Rev. Francoph. Lab. *2015*, 51–58.

Fischmeister, I., Hellgren, L., and Vincent, J. (1975). Infrared spectroscopy for tracing of topically applied ointment vehicles and active substances on healthy skin. Arch. Dermatol. Res. *253*, 63–69.

Fredheim, E.G.A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T., and Sollid, J.E. (2009). Biofilm Formation by Staphylococcus haemolyticus. J. Clin. Microbiol. *47*, 1172–1180.

Grice, E.A., and Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 244–253.

Ishiwatari, S., Suzuki, T., Hitomi, T., Yoshino, T., Matsukuma, S., and Tsuji, T. (2007). Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. J. Appl. Toxicol. JAT *27*, 1–9.

Ju, Q., and Zouboulis, C.C. (2016). Endocrine-disrupting chemicals and skin manifestations. Rev. Endocr. Metab. Disord. *17*, 449–457.

Juárez-Jiménez, B., Pesciaroli, C., Maza-Márquez, P., López-Martínez, S., Vílchez-Quero, J.L., and Zafra-Gómez, A. (2019). Biodegradation of methyl and butylparaben by bacterial strains isolated from amended and non-amended agricultural soil. Identification, behavior and enzyme activities of microorganisms. J. Environ. Manage. *245*, 245–254.

Kong, H.H., and Segre, J.A. (2012). Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. J. Invest. Dermatol. *132*, 933–939.

Matwiejczuk, N., Galicka, A., and Brzóska, M.M. (2020). Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. J. Appl. Toxicol. *40*, 176–210.

Nicolopoulou-Stamati, P., Hens, L., and Sasco, A.J. (2015). Cosmetics as endocrine disruptors: are they a health risk? Rev. Endocr. Metab. Disord. *16*, 373–383.

Perl, T.M., and Golub, J.E. (1998). New approaches to reduce Staphylococcus aureus nosocomial infection rates: treating S. aureus nasal carriage. Ann. Pharmacother. *32*, S7-16.

Pierson, M.D., Smoot, L.A., and Vantassell, K.R. (1980). Inhibition of Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus by Butylated Hydroxyanisole and the Propyl Ester of p-Hydroxybenzoic Acid. J. Food Prot. *43*, 191–194.

Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., and Sumpter, J.P. (1998). Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. Toxicol. Appl. Pharmacol. *153*, 12–19.

Ruocco, E., Donnarumma, G., Baroni, A., and Tufano, M.A. (2007). Bacterial and Viral Skin Diseases. Dermatol. Clin. *25*, 663–676.

Sanford, J.A., and Gallo, R.L. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. Semin. Immunol. *25*, 370–377.

Schommer, N.N., and Gallo, R.L. (2013). Structure and function of the human skin microbiome. Trends Microbiol. *21*, 660–668.

Steczko, J., Ash, S.R., Brewer, L., and Guillem, A. (2010). In vitro and in vivo evaluation of efficacy of citrate/methylene blue/parabens/IPA solution as a skin disinfectant. J. Infect. *60*, 36–43.

Tavares, R.S., Martins, F.C., Oliveira, P.J., Ramalho-Santos, J., and Peixoto, F.P. (2009). Parabens in male infertility-is there a mitochondrial connection? Reprod. Toxicol. Elmsford N *27*, 1–7.

Vignaroli, C., Biavasco, F., and Varaldo, P.E. (2006). Interactions between Glycopeptides and β-Lactams against Isogenic Pairs of Teicoplanin-Susceptible and -Resistant Strains of Staphylococcus haemolyticus. Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 2577–2582.

Wallen-Russell, C., and Wallen-Russell, S. (2017). Meta Analysis of Skin Microbiome: New Link between Skin Microbiota Diversity and Skin Health with Proposal to Use This as a Future Mechanism to Determine Whether Cosmetic Products Damage the Skin. Cosmetics *4*, 14.

RÈGLEMENT (UE) No 358/2014 DE LA COMMISSION - du 9 avril 2014 - modifiant les annexes II et V du règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques -. 5.

Table 1: Strains used in this study

No. Accession	Strains	Phyla	Gram
ATCC 29213	*Staphylococcus aureus*	Firmicutes	Gram +
ATCC 12228	*Staphylococcus epidermidis*	Firmicutes	Gram +
clinical, surface 1	*Staphylococcus epidermidis S1*	Firmicutes	Gram +
clinical, surface 2	*Staphylococcus epidermidis S2*	Firmicutes	Gram +
clinical, surface 3	*Staphylococcus epidermidis S3*	Firmicutes	Gram +
clinical, surface 4	*Staphylococcus epidermidis S4*	Firmicutes	Gram +
clinical, surface 5	*Staphylococcus epidermidis S5*	Firmicutes	Gram +
clinical, profond 1	*Staphylococcus epidermidis P1*	Firmicutes	Gram +
clinical, profond 2	*Staphylococcus epidermidis P2*	Firmicutes	Gram +
clinical, profond 3	*Staphylococcus epidermidis P3*	Firmicutes	Gram +
clinical, profond 4	*Staphylococcus epidermidis P4*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 20263	*Staphylococcus haemolyticus*	Firmicutes	Gram +
DSMZ 20328	*Staphylococcus hominis*	Firmicutes	Gram +

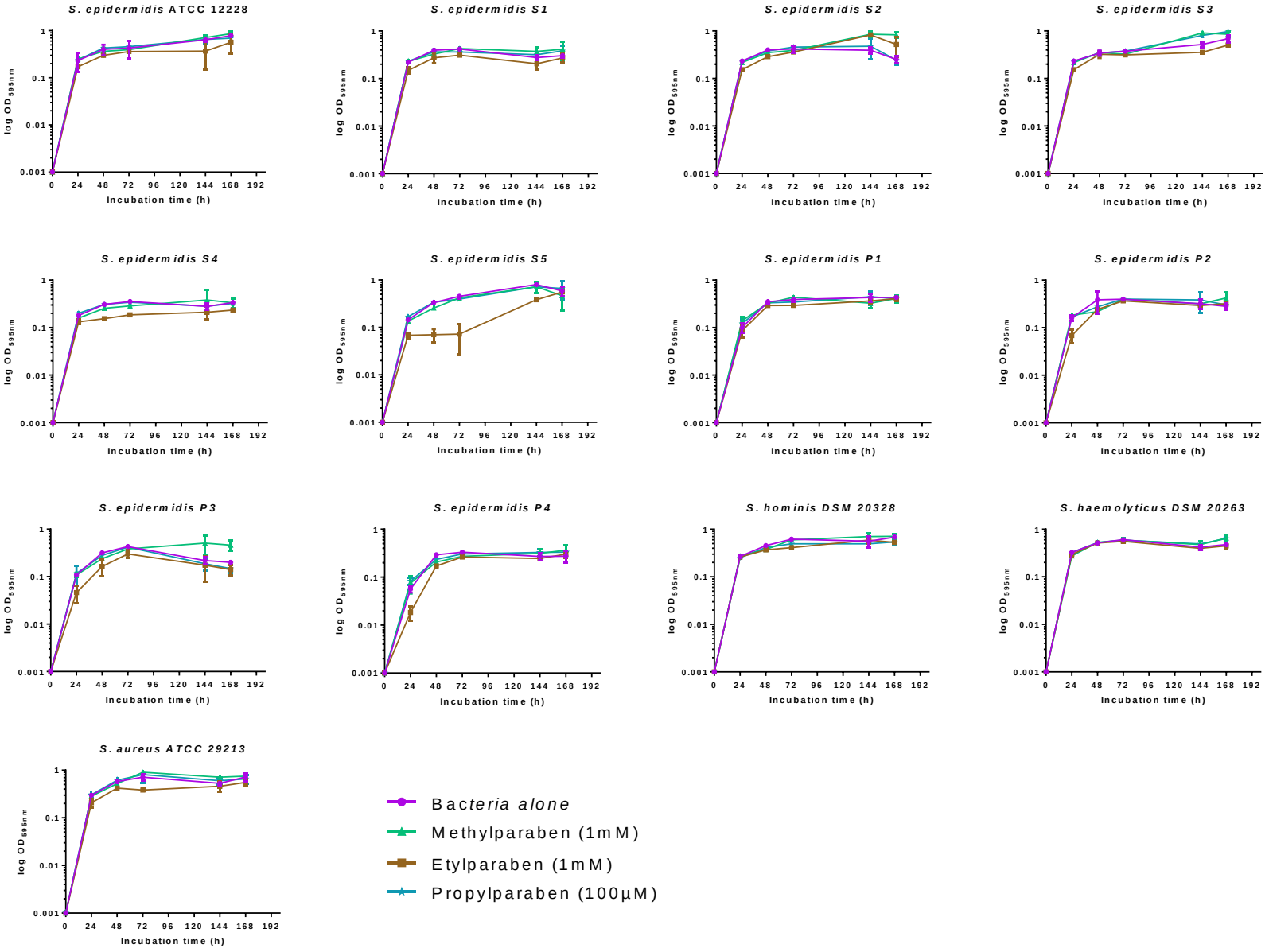

S. epidermidis ATCC 12228
S. epidermidis S1
S. epidermidis S2
S. epidermidis S3
S. epidermidis S4
S. epidermidis S5
S. epidermidis P1
S. epidermidis P2
S. epidermidis P3
S. epidermidis P4
S. hominis DSM 20328
S. haemolyticus DSM 20263
S. aureus ATCC 29213
log OD595nm
Incubation time (h)
Bacteria alone
Methylparaben (1mM)
Etylparaben (1mM)
Propylparaben (100µM)

Figure 1: Growth monitoring of the 13 strains representing the aerobic cutaneous microbiota in the presence of 3 parabens used in cosmetics. *The different strains were incubated in LB ½ medium, pH 5, at 30°C in the presence or not of parabens. A measurement of DO_{595nm} was performed at different times. The experiment was carried out in triplicate. Standard deviations correspond to the dispersion around the mean calculated from the triplicates.*

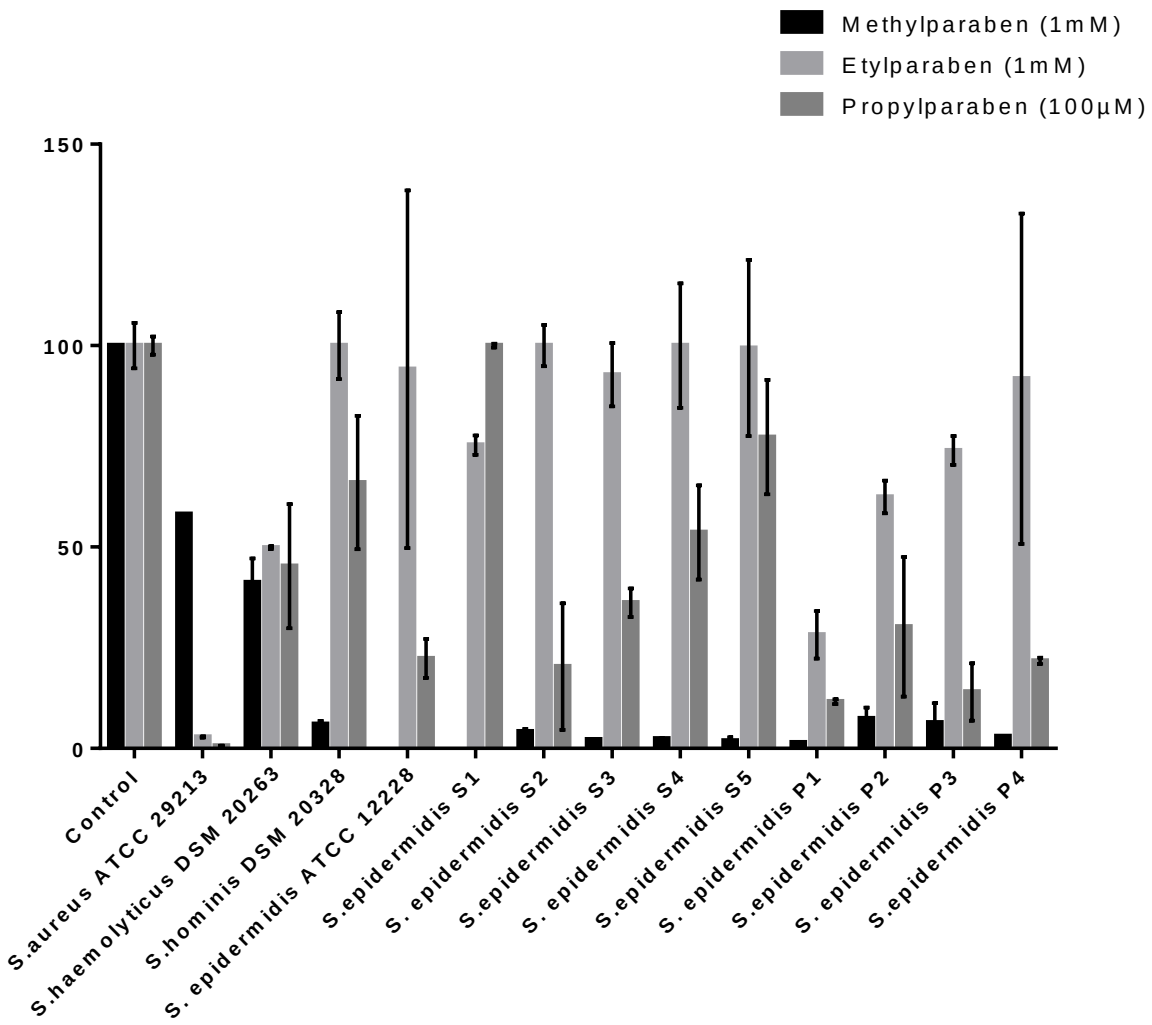


Figure 2: Residual parabens expressed in % in the bacterial supernatants of 13 strains of Staphylococci of the skin microbiota. *The controls correspond to the amount of parabens found in the bacteria-free condition. The results are expressed according to these controls. Standard deviations correspond to the dispersion around the mean calculated from the duplicates.*

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

IV. Discussion générale et perspectives

Le microbiote intestinal est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme car il est impliqué dans de nombreuses fonctions **(Cummings et Macfarlane 1997; Macpherson et Harris 2004; Ridlon, Kang, et Hylemon 2006; Gérard et Bernalier-Donadille 2007; Khosravi et Mazmanian 2013)**. De plus, il participe au métabolisme des xénobiotiques qu'il peut influencer **(S. F. Clarke et al. 2014)**. En effet, de nombreuses études ont montré que le microbiote intestinal est en mesure d'inactiver, d'activer ou même de réactiver certains xénobiotiques **(Collins et Patterson 2020)**. Ces données indiquent qu'il est nécessaire de prendre en compte ce microbiote dans le développement de nouvelles molécules pharmaceutiques ou agro-alimentaires. Pendant très longtemps, l'étude du microbiote intestinal est passée par l'utilisation des souches cultivables au laboratoire à partir de fèces **(Gossling et Slack 1974; Mata, Carrillo, et Villatoro 1969)**. Or, la diversité microbienne, le fait que la plupart des souches soient non cultivables, l'anaérobiose et les milieux de culture très spécifiques nécessaires n'ont pas permis une identification complète des espèces le composant **(Fraher, O'Toole, et Quigley 2012; W.-L. Wang et al. 2015)**. L'avènement des techniques de séquençage et des conditions de culture spécifiques à l'anaérobiose a en partie permis de pallier ce problème et d'étendre les connaissances sur ce microbiote et notamment sur l'abondance des différents phyla et espèces présentes **(E. Nagy, Boyanova, et Justesen 2018; Qin et al. 2010)**. Ces études ont révélé la grande complexité et variabilité inter-individus, cependant un noyau commun d'une cinquantaine d'espèces, le core microbiote, est présent chez tous les individus sains **(Turnbaugh et al. 2009; Huse et al. 2012)**. Par ailleurs, l'avancée des connaissances dans les techniques de culture et dans la mise en place de modèles, animaux ou non, de microbiote intestinal a également contribué à l'étude plus approfondie de sa composition, de ses implications dans les pathologies humaines et dans le métabolisme des xénobiotiques **(Turner 2018; Collins et Patterson 2020; Ichim, Kesari, et Shafer 2018)**. Bien que ces modèles soient indispensables pour la compréhension de nombreuses fonctions de ce microbiote, ils sont néanmoins complexes à mettre en œuvre. Pour la plupart d'entre eux, il est nécessaire de disposer d'un échantillon de fèces pour commencer les expériences **(Molly, Vande Woestyne, et Verstraete 1993; Venema et van den Abbeele 2013)**. Or, la composition microbienne est différente suivant les échantillons et peut induire des biais expérimentaux dans la caractérisation du métabolisme des xénobiotiques. Par ailleurs, le matériel nécessaire pour leur mise en place est conséquent et les modèles nécessitent, pour certains, plusieurs jours d'étalonnage avant utilisation **(Molly, Vande Woestyne, et Verstraete 1993).** Outre les temps de mise en route, la durée de l'expérience, elle, est souvent restreinte. Par exemple, le modèle TNO ne permet pas plus de 3 jours d'acquisition **(Venema**

et van den Abbeele 2013). Des modèles animaux, allant des plus simples aux plus complexes, ont également été mis au point pour l'étude du microbiote intestinal. Cependant, tous comportent des inconvénients propres à l'espèce utilisée, tels que la différence en termes de communauté bactérienne et d'anatomie digestive, le coût important du maintien dans de bonnes conditions de vie et d'hygiène, le style de vie et la perception du grand public quant à leur utilisation parfois contestée **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013; T. L. A. Nguyen et al. 2015 ; Ericsson 2019)**.

Afin de pallier en grande partie ces difficultés, il semble nécessaire de concevoir un modèle simple, robuste, et répétable de microbiote intestinal pour l'étude de ses interactions avec les xénobiotiques.

Nous avons dans un premier temps voulu valider notre concept par l'analyse des interactions entre les antibiotiques et 30 souches individuelles du core microbiote intestinal.

La première partie de nos travaux a donc consisté à déterminer les effets des antibiotiques les plus couramment utilisés en France sur la croissance de 30 souches appartenant au core microbiote intestinal. En parallèle, nous avons également voulu déterminer le devenir de ces antibiotiques dans les surnageants de culture à l'aide d'analyses en UHPLC-MS/MS. Cette partie du travail a permis de nous assurer que les souches sélectionnées se développaient dans le milieu de culture choisi **(Maier et al. 2018)** et de valider notre méthode pour l'analyse des surnageants de culture.

Nos résultats ont montré que les antibiotiques impactaient la croissance d'un grand nombre des souches testées et que la structure de base de certains d'entre eux était absente des surnageants de culture de différentes bactéries.

Nous avons mis en évidence que le métronidazole affectait la croissance de certaines souches de Bacteroidetes. Ces résultats sont cohérents avec des études indiquant une sensibilité de ce phyla à l'antibiotique entrainant une diminution de la diversité en son sein **(Narimani et al. 2016b; Haak et al. 2019b)**. Par ailleurs, le métronidazole inhibe la croissance à plus de 50 % de 4 des souches étudiées. Cependant, sa structure initiale n'a été que très peu retrouvée dans les surnageants de culture. En effet, l'antibiotique est absent de 11 de ces surnageants dont ceux de *C. perfringens* et *E. faecalis*. *C. perfringens* a déjà été caractérisée pour être capable de métaboliser le métronidazole en N-(acide 2-hydroxyéthyl oxamique) et en acétamide **(Sousa et al. 2008b)** et la bactérie *E. faecalis* a été décrite dans plusieurs articles pour contrer l'effet bactéricide du métronidazole sur les Bacteroidetes en co-culture **(E. Nagy, Heizmann, et Werner 1991)**. Nos résultats semblent confirmer l'implication de ces deux bactéries dans la métabolisation du métronidazole car il n'est pas retrouvé dans leurs surnageants de culture. Cependant, il sera nécessaire de rechercher les potentiels métabolites produits, dans ces surnageants, mais également dans ceux des 9 autres souches d'intérêt. Lors de cette étude nous avons également montré que le sulfaméthoxazole ou le triméthoprime utilisés seuls

n'avaient aucun effet notable sur la croissance des souches individuelles. Cependant, utilisés en couple, ils agissent en synergie et inhibent la croissance de 13 souches. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature. En effet, il a été montré que l'administration de triméthoprime à des patients n'avait aucune incidence sur les bactéries anaérobies retrouvées dans leurs selles **(Guerrant et al. 1981)**, alors qu'utilisés en combinaison avec le sulfaméthoxazole, les deux composés ont une action synergique **(Elwell et al. 1986)**. Contrairement au triméthoprime, le sulfaméthoxazole n'a été que très peu retrouvé dans les surnageants de culture. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant le métabolisme du sulfaméthoxazole par l'organisme, mais il semblerait que l'antibiotique ne soit pas complétement métabolisé, car il est retrouvé dans les stations d'épuration sous sa forme initiale **(Zhang et al. 2015)**. En effet, des études ont montré que le sulfaméthoxazole était métabolisé et éliminé à seulement 29% en présence de *Rhodococcus erythropolis,* une bactérie retrouvée dans les boues activées des stations d'épuration **(Larcher et Yargeau 2011)**, tandis que Xiong *et al*., ont proposé un schéma de métabolisation par l'algue *Chlorella pyrenoidosa* **(Xiong et al. 2020)**. L'analyse de nos surnageants de culture pourrait permettre d'identifier les métabolites potentiels qu'ils contiennent. En ce qui concerne la cefpodoxime, nous avons mis en évidence une inhibition de croissance importante (>50%) pour 6 bactéries. La souche *E. coli* ATCC 8739 n'est pas sensible à la cefpodoxime dans nos conditions expérimentales (1 mg/L) alors que l'EUCAST mentionne une CMI pour *E. coli* ATCC 25922 de 0,5 mg/L et qu'une étude mentionne une diminution de la croissance de *E. coli* en présence de céphalosporines **(Eucast 2020; ANSM 2018)**. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales différentes. En effet, nous avons travaillé en anaérobiose, avec un milieu et une souche différents des études mentionnées précédemment. Certaines des souches insensibles à la cefpodoxime, dont *C. perfringens* et *C. difficile* sont cependant capables de modifier la structure de l'antibiotique à plus de 90%. Une étude menée en 2006 a montré que la cefpodoxime pouvait être dégradée en trois composés en fonction des conditions d'humidité et de pH **(Fukutsu et al. 2006)**. Dans nos conditions les bactéries pourraient modifier le pH du milieu, entraînant une modification structurelle de l'antibiotique. Pour confirmer cette hypothèse, la valeur du pH devrait être mesurée au cours de la culture et en point final et les métabolites recherchés dans les surnageants de culture. Concernant la moxifloxacine, nous avons montré qu'elle inhibait la croissance de 12 souches de notre panel. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature indiquant une diminution de la diversité bactérienne lors d'un traitement avec cette fluoroquinolone **(Noel, Bowker, et MacGowan 2005; Burdet et al. 2019)**. Cependant, nos résultats concernant la croissance de *C. perfringens* sont en contradiction avec ceux de la littérature. Nous avons montré que la croissance de cette bactérie n'était pas inhibée en présence de l'antibiotique alors qu'une étude a démontré une CMI comprise entre 0,25 mg/L et 1 mg/L **(Noel, Bowker, et MacGowan 2005b)**. Là encore, les résultats divergents pourraient s'expliquer par les conditions expérimentales différentes

entre les deux études. Dans notre étude, seules deux bactéries, *C. perfringens* et *S. parasanguinis,* sont aptes à modifier la structure de la moxifloxacine sans que leur croissance n'en soit affectée. Ces modifications de structure pourraient être dues à un mécanisme bactérien établi pour se protéger contre les antibiotiques. De manière identique à la moxifloxacine, nous avons observé que seulement 3 souches sont capables de modifier la structure de l'érythromycine à plus de 95%. De façon surprenante, la bactérie *B. caccae* modifie la structure de l'antibiotique (>95%) alors que sa croissance est inhibée à plus de 70%. Une étude ayant montré que cet antibiotique est dégradé en milieu acide, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette souche acidifie le milieu de culture, modifiant ainsi la structure de l'érythromycine et produisant des métabolites secondaires toxiques pour la bactérie **(Hassanzadeh et al. 2007b)**. En présence de cet antibiotique, nous avons également mis en évidence des inhibitions de croissance des souches de Bacteroidetes. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature rapportant une diminution des Bacteroidetes et des *Clostridia* dans les matières fécales lors de la prise de cet antibiotique **(Brismar, Edlund, et Nord 1991; P. Zimmermann et Curtis 2019)**. La croissance de la souche *E. coli* ATCC 8739 utilisée dans cette étude, initialement isolée dans les fèces, n'est pas affectée en présence de l'antibiotique. Ces résultats sont contradictoires avec une étude qui montre une disparition globale de la bactérie dans les fèces de patients traités par érythromycine **(Hartley, Clements, et Linton 1978)**. Cependant, leur étude a été menée dans des conditions aérobies, ce qui peut expliquer la différence entre les résultats. Concernant l'amoxicilline, nos résultats ont montré une inhibition de la croissance supérieure à 50% pour 7 souches appartenant aux Actinobacteria, aux Bacteroidetes, aux Firmicutes et aux Proteobacteria. Ces données sont en accord avec celles de la littérature qui mentionnent une augmentation des Bacteroidetes et des *Gammaprotéobacteria* et une diminution des Firmicutes **(P. Zimmermann et Curtis 2019 ; Graversen et al. 2020)**. Cependant, les souches *P. distasonis* et *B. vulgatus*, qui sont des Bacteroidetes, sont inhibées en présence de l'antibiotique, ce qui n'est pas totalement contradictoire, puisqu'une étude de 2014 a montré une augmentation de certains taxons de Bacteroidetes **(Panda et al. 2014)**. L'amoxicilline étant une molécule instable, il a été impossible dans nos conditions expérimentales de réaliser les analyses en UHPLC-MS/MS **(Concannon et al. 1986)**.

A la suite de ces résultats, il va être nécessaire de caractériser par de nouvelles analyses en UPHLC-MS/MS les métabolites secondaires produits. Il serait également utile de s'intéresser aux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les souches dont la croissance n'est pas inhibée et dont les structures de base sont absentes des surnageants

Grâce à cette première partie de thèse, nous avons mis en évidence, en condition d'anaérobiose, que les antibiotiques les plus couramment utilisés en France peuvent impacter la croissance des souches individuelles du microbiote intestinal. Nous avons également montré que

certaines souches modifient la structure de ces antibiotiques avec ou sans effet sur leur croissance. Les résultats obtenus ont été confrontés aux données de la littérature, ce qui nous a permis de juger notre protocole expérimental pertinent. En effet, le milieu choisi a permis la croissance des 30 souches utilisées et nos méthodes de détection des antibiotiques dans les surnageants de culture ont été validées pour tous les antibiotiques sauf pour l'amoxicilline où des mises au point supplémentaires et / ou changement de méthode sont encore nécessaires.

Compte tenu de ces résultats encourageants, nous avons décidé d'augmenter le nombre de souches, de les cultiver en consortium afin de créer un microbiote intestinal *in vitro* et d'étendre le nombre de xénobiotiques testés. Ces expériences ont fait l'objet de la deuxième partie du travail de thèse.

Pour réaliser ce travail, nous avons sélectionné 39 souches appartenant au core microbiote intestinal **(Qin et al. 2010; Schloissnig et al. 2013b; Maier et al. 2018)** et faisant partie des principaux phyla composant le microbiote intestinal à savoir les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobactéries, les Fusobactéries, les Protéobactéries et les Verrucomicrobies **(Turnbaugh et al. 2009; Huse et al. 2012)**. Le modèle Human Gut Microbiota Model (HGMM) que nous proposons a été construit au départ avec les 39 souches se développant isolément ou non dans un même milieu le mGam **(Maier et al. 2018)**. Cependant, le fait que seules 29 souches aient réussi à s'implanter dans ce modèle nous a amenés à formuler différentes hypothèses. En effet, pour beaucoup d'entre elles, les souches choisies ont besoin d'apports nutritifs particuliers. Par exemple, la bactérie *Akkermansia muciniphila* a besoin d'un milieu contenant de la mucine pour se développer **(Ouwerkerk et al. 2017)**. Notre expérience de culture nous ayant montré que certaines souches absentes du HGMM avaient de grandes difficultés à croitre lorsqu'elles se trouvaient seules dans le milieu, il est probable que la croissance des autres souches a inhibé leur développement. A l'inverse, une étude a mis en évidence que certaines souches du microbiote intestinal permettaient la croissance de souches jusque-là incultivables, notamment grâce à la production de ménaquinone par le métabolisme de *E. coli* **(Fenn et al. 2017)**. Il est possible également que les souches non retrouvées dans le modèle soient en si faible quantité qu'elles ne sont pas détectables lors de l'analyse du séquençage. En effet, pour éliminer les singletons et les séquences les moins abondantes (majoritairement des chimères) nous avons fait le choix de supprimer les OTUs dont les abondances relatives étaient inférieures à 0.005% **(Bokulich et al. 2013)**. Si certaines bactéries étaient représentées avec un très faible nombre de copies, elles ont été supprimées lors des filtres qualités. On peut également envisager que les bactéries qui ne sont pas retrouvées dans le consortium ne s'implantent pas en raison d'une compétition au niveau nutritionnel ou bien à cause de la production de facteurs antibactériens. Une étude a montré que *Streptococcus. salivarius* produisait une bactériocine capable de moduler subtilement les abondances relatives d'un modèle de microbiote

intestinal *in vitro*, avec une augmentation des *Bifidobacterium* et des *Streptococcus* et une diminution des *Clostridium* et des *Blautia* **(Guinane et al. 2016)**. Par ailleurs, plusieurs bactériocines produites par *E. coli* et ayant une activité sur les bactéries du microbiote intestinal, ont été découvertes ces dernières années **(Laviña, Gaggero, et Moreno 1990; Gaillard-Gendron et al. 2000 ; Patzer et al. 2003)**. D'autres bactériocines produites par *R. gnavus*, *B. obeum*, *E. faecalis* ou bien même *B. longum* ont également été mises en évidence **(Garcia-Gutierrez et al. 2019)**. Le facteur inoculation peut également être une hypothèse dans la disparition de certaines espèces au niveau du HGMM. En effet, l'inoculation du HGMM a été effectuée par l'ajout de 5% de préculture de chaque souche et non en fonction des densités optiques. En inoculant à 5%, il est possible que nous ayons induit un biais dans la construction de notre modèle. Si la mise en commun des souches a eu lieu après 48h de culture pour laisser le temps aux bactéries de se développer, elles n'ont sans doute pas atteint le même stade de croissance. Ainsi, certaines souches ont pu être plus fortement représentées dès le début de l'expérience. Cependant l'inoculation à 5% nous a permis de contrôler les volumes introduits afin qu'ils soient identiques entre chaque souche. C'est un choix de notre part et nous avons conscience qu'il peut avoir eu un impact sur la suite de l'expérience. A terme, le développement du modèle par l'ajout d'autres souches en essayant d'optimiser les conditions de culture serait envisageable ainsi que la mise au point de modèles plus spécifiques pour les pathologies où il est reconnu que le microbiote intestinal est modifié afin d'étudier i) les interactions entre les différentes souches et ii) l'effet de médicaments et de nouvelles formules pharmaceutiques sur la composition de ces microbiotes spécifiques. Un modèle de microbiote intestinal d'étude de la maladie de Crohn ou du côlon irritable comporterait par exemple une abondance plus importante en *Actinomyces*, *Veillonella* et *E. coli*, alors que les Christensenellaceae, Corobacteriaceae et *F. prausnitzii* seraient, eux, peu représentés **(Pittayanon et al. 2020)**. Un modèle d'étude de l'obésité comporterait quant à lui une abondance plus élevée en Firmicutes et moins de Bacteroidetes **(Klancic et Reimer 2020)**.

Une fois stable, notre modèle de microbiote intestinal *in vitro* nous a permis d'étudier l'effet que peuvent avoir les xénobiotiques sur l'abondance des souches en parallèle de leur effet sur la croissance de ces mêmes souches, mais en culture individuelle. Globalement, nos résultats ont montré que les antibiotiques affectaient la croissance des souches en culture unique comme nous l'avions déjà montré précédemment mais également les abondances relatives des phyla composant notre HGMM. Ces résultats confirment ce que de nombreux auteurs ont déjà mentionné, à savoir que la prise d'antibiotiques affectait la diversité microbienne du microbiote intestinal **(Lange et al. 2016 ; Ianiro, Tilg, et Gasbarrini 2016a)**. L'antibiotique affectant le plus la croissance des souches en culture individuelle est la moxifloxacine. C'est également le seul xénobiotique testé qui inhibe totalement la croissance du HGMM. Cet antibiotique est déjà connu pour moduler la diversité bactérienne du

microbiote intestinal **(Moura et al. 2019 ; Burdet et al. 2019b)**. En effet, une étude a montré une diminution du nombre de bactéries cultivables dans un modèle de côlon humain traité avec de la moxifloxacine, et notamment dans les populations d'Entérocoques, de *B. fragilis*, de Bifidobactéries mais aussi de Lactobacilles **(de Gunzburg et al. 2018)**. Si les souches étudiées séparément ne semblent pas toutes affectées en présence de l'antibiotique, elles se comportent différemment lorsqu'elles sont ensemble puisque nous avons noté une absence complète de la croissance du HGMM en sa présence. Cependant, nos résultats indiquant simplement une inhibition de croissance, il est impossible de savoir si ce phénomène est réversible ou non. Pour répondre à cette interrogation, il serait nécessaire de récupérer la culture, la centrifuger, faire des lavages avec une solution tampon, resuspendre le culot bactérien dans du milieu frais et laisser incuber durant 48h. Une re-croissance bactérienne révèlerait un effet uniquement bactériostatique de l'antibiotique.

En présence d'érythromycine nous avons noté une disparition complète de *F. nucleatum* dans le HGMM. De manière surprenante, la souche n'est pas inhibée en culture individuelle en présence de la même concentration d'antibiotique. Une étude analysant la sensibilité de souches (isolées de 20 patients souffrant de parodonties) à l'érythromycine a montré que *F. nucleatum* y était sensible dans 54% des cas **(Lakhssassi et Sixou 2005)**. Une autre étude analysant la résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques en Espagne a mentionné une résistance de 75% des Fusobactéries à l'érythromycine **(Baquero et Reig 1992)**. Pour expliquer nos résultats, on peut émettre l'hypothèse qu'en culture individuelle, la bactérie pourrait, pour se protéger, mettre en place des mécanismes de résistance (tels que des pompes à efflux ou une inactivation enzymatique) qu'elle serait incapable de développer en présence d'autres bactéries dans le HGMM. Globalement, les antibiotiques ont augmenté l'abondance des Firmicutes dans notre modèle, sauf dans le cas de la moxifloxacine. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude menée sur des souris montrant qu'un traitement avec certains antibiotiques (pénicilline, vancomycine et tétracycline) augmentait l'abondance des Firmicutes **(I et al. 2012)**. Par ailleurs, de nombreuses études évoquent un déséquilibre dans le ratio Firmicutes/Bacteroidetes lors d'un traitement antibiotique **(Panda et al. 2014 ; Dudek-Wicher, Junka, et Bartoszewicz 2018)**. Dans ce contexte, il est reconnu qu'il est important de prendre en compte les effets que peuvent avoir les antibiotiques sur le microbiote intestinal pour éviter une importante dysbiose pouvant mener à des infections à *C. difficile* graves **(Samarkos, Mastrogianni, et Kampouropoulou 2018; Mullish et Williams 2018)**, à certaines pathologies ou bien à l'acquisition de résistance **(Modi, Collins, et Relman 2014; Lange et al. 2016)**. La prise en compte de la modulation bactérienne du microbiote intestinal par les antibiotiques pourrait également permettre d'associer des probiotiques à chaque prise d'antimicrobiens en cas de fragilité intestinale connue. Cependant, bien qu'ils puissent être utiles dans certains cas, les probiotiques peuvent également augmenter le temps

de reconstruction du microbiote intestinal après un traitement antibiotique, engendrant alors des effets secondaires plus durables **(Suez et al. 2018)**.

Globalement, les autres xénobiotiques testés, médicaments, conservateurs, pesticides, phtalates n'impactent ni la croissance des souches en culture individuelle ni les abondances relatives dans notre modèle. L'irinotecan, un anti cancéreux, n'a impliqué aucune inhibition de croissance sauf en ce qui concerne la souche *S. salivarius* en culture individuelle. La molécule n'a pas modulé la composition de notre modèle contrairement à une étude menée sur la souris. En effet, des auteurs ont montré, grâce à un séquençage du gène de l'ARN 16S des contenus des caecums, qu'un traitement à l'irinotecan diminuait la diversité au sein du microbiote intestinal mais aussi augmentait l'abondance relative des Protéobactéries **(W.-L. Wang et al. 2015)**. Nous ne retrouvons pas ce profil dans notre travail. Cependant, cette différence entre les résultats peut s'expliquer par le fait que l'étude de Wang *et al* ait été menée chez le rongeur. En effet, ce modèle animal ne possède pas un tractus digestif identique au nôtre, est coprophage et n'a par conséquent pas les mêmes espèces dans son microbiote intestinal **(Kostic, Howitt, et Garrett 2013 ; T. L. A. Nguyen et al. 2015)**. Le glyphosate, un pesticide largement utilisé jusqu'à maintenant, n'affecte pas la croissance des souches en culture individuelle ni les abondances relatives du HGMM. Ces résultats sont cohérents avec une étude très récente qui a démonté que le microbiote intestinal de porc cultivé dans des bioréacteurs avec des concentrations élevées en glyphosate (228 mg/jour correspondant à une dose fréquemment rencontrée dans le fourrage) ne voyait pas ses communautés varier **(Krause et al. 2020)**. Nos résultats concernant les parabènes et les phtalates n'ont également montré aucune différence entre les cultures contrôles et celles traitées (culture individuelle ou HGMM), confirmant les résultats d'une étude menée chez le rat qui a montré qu'une exposition au diéthyle phtalate, au méthylparabène et au triclosan n'entrainait pas de changements dans la composition microbienne chez l'adulte **(Hu et al. 2016)**. Nous avons mis en évidence que la bactéries *E. lenta* avait une croissance augmentée en présence d'un grand nombre de xénobiotiques (sauf en présence des antibiotiques, de l'olsalazine, de l'oméprazole, du glyphosate, de l'hespéridine, de l'irinotecan et de la warfarine). Ces résultats sont surprenants car ils sont propres à cette bactérie. Le milieu de culture en présence de ces xénobiotiques pourrait s'être modifié, permettant à la souche un meilleur développement que celui de la souche contrôle sans les molécules. Une différence de pH, de viscosité ou une disponibilité plus importante des substrats nécessaires à sa croissance pourraient par exemple être envisagées.

Les travaux suivants ont concerné l'analyse des surnageants de culture des souches individuelles et du HGMM en UHPLC-MS/MS pour déterminer si les bactéries et /ou le HGMM avaient un effet sur

la structure des xénobiotiques. En effet, il est connu que le microbiote intestinal est capable de métaboliser les xénobiotiques, cependant les espèces impliquées n'ont pas toutes été mises en évidence **(M. Zimmermann et al. 2019a ; Collins et Patterson 2020)**. Nos résultats ont montré que plusieurs xénobiotiques testés n'étaient plus retrouvés dans les surnageants de culture des souches individuelles et/ou du HGMM. Parmi les antibiotiques, la structure de base du métronidazole n'a été que très peu retrouvée dans les surnageants des cultures individuelles (absente dans 16 surnageants) et dans celui du HGMM (totalement absente). La littérature mentionne que cet antibiotique peut être métabolisé par *C. perfringens* **(Koch et Goldman 1979 ; Koch et al. 1979 ; Sousa et al. 2008b)**. Nous confirmons dans notre étude que la souche de *C. perfringens* utilisée est capable de modifier la structure de base de l'antibiotique de manière qu'elle ne soit plus retrouvée dans son surnageant de culture. Par la suite, la recherche des métabolites comme l'acide N-(2-hydorxyéthyl)-oxamique et l'acétamide **(Sousa et al. 2008b)** dans ces surnageants permettrait de déterminer la cinétique de métabolisation du métronidazole par *C. perfringens* dans un modèle de culture individuelle et dans celle du HGMM. La recherche de ces métabolites dans les autres surnageants pourrait également permettre de déterminer si d'autres bactéries participent à la métabolisation de l'antibiotique. Nous avons également montré que la structure de base de la cefpodoxime était totalement absente du surnageant de culture du HGMM. Une étude a montré que 90 % de la cefpodoxime est excrétée par les reins sous forme inchangée et les 10% restant sont éliminés par les fèces après métabolisation par le microbiote intestinal **(Chugh et Agrawal 2003)** alors qu'une autre mentionne que la cefpodoxime subit une biotransformation minimale chez l'Homme **(Borin 1991)**. Nous montrons ici que la structure de la cefpodoxime serait dégradée par le microbiote intestinal et particulièrement par nos souches *C. difficile*, *B. fragilis* et *B. thetaiotaomicron*. Là encore, l'identification des métabolites dans les surnageants de cultures via des analyses en HPLC-MS/MS plus ciblées serait nécessaire **(Fukutsu et al. 2006b)**. Par ailleurs, pour déterminer si les métabolites ou produits de dégradation sont toujours actifs, nous pourrions vérifier si les surnageants de culture inhibent toujours la croissance des souches. La structure de base de l'érythromycine est absente à 75% dans le surnageant du HGMM alors qu'elle n'est absente (> de 90%) que dans le surnageant de 3 souches en cultures individuelles (*C. perfringens*, *B thetaiotaomicron* et *B. caccae*). Nous avons précédemment indiqué que l'érythromycine pouvait être dégradée en milieu acide, et nous pouvons émettre l'hypothèse que certaines souches acidifient le milieu dans le HGMM, de la même manière qu'elles le faisaient individuellement, aboutissant à la dégradation de la structure de base de l'antibiotique et expliquant son absence dans certains surnageants. Pour valider ou infirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser des cultures en présence ou non de l'érythromycine et de noter les valeurs de pH au cours du temps. Des analyses plus complètes en HLPC-MS/MS pourraient par ailleurs mettre en évidence d'hypothétiques métabolites secondaires indiquant que l'érythromycine serait en partie métabolisée par le microbiote intestinal.

D'autre part, le métronidazole est très faiblement retrouvé dans les surnageants de culture des souches individuelles et est complétement absent de celui du HGMM (qu'il soit testé seul ou bien en combinaison avec le triméthoprime). Comme précédemment mentionné, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant le métabolisme du sulfaméthoxazole par l'organisme. Nous avons déjà rapporté dans cette discussion que l'antibiotique semblait ne pas être complétement métabolisé par l'organisme car il est retrouvé dans les stations d'épuration sous sa forme initiale **(Zhang et al. 2015)**. L'analyse des surnageants de culture pourrait permettre l'identification de métabolites potentiels. En effet, nos résultats montrent que la structure de base du sulfaméthoxazole est absente en présence des bactéries et du HGMM, indiquant une possible métabolisation de la molécule.

En ce qui concerne les autres xénobiotiques, nous avons mis en évidence que l'olsalazine était peu retrouvée dans les surnageants de culture des souches individuelles mais aussi dans ceux du HGMM (75% d'absence). Cette molécule est connue pour être métabolisée par des azoréductases bactériennes en mésalazine et en acetyl-mésalazine **(Lauritsen et al. 1984 ; Rijk et al. 1989)**. Ces métabolites pourraient être recherchés dans le surnageant du HGMM et, en cas de recherche positive, dans les surnageants des cultures individuelles. Quant au diclofénac, il n'a été que très peu retrouvé dans les surnageants des souches individuelles et est absent à 65 % dans celui du HGMM. De nombreuses études ont suggéré que la molécule était métabolisée en diclofénac glucuronide par les bactéries du microbiote intestinal grâce à des enzymes bêta glucuronidases **(Boelsterli, Redinbo, et Saitta 2012; Saitta et al. 2014)**. Il serait alors intéressant de vérifier si les bactéries modifiant la structure de la molécule possèdent ces enzymes. La féxofénadine est également une molécule dont la structure de base est peu retrouvée dans les surnageants de cultures des souches individuelles et est absente à 30% dans celui du HGMM. Normalement, la molécule est absorbée au niveau intestinal mais si une partie arrive jusqu'au côlon, les bactéries résidentes peuvent en modifier la structure **(Zou et al. 2020)**. Les structures de base de la nisolpidine et de la nifédipine, par ailleurs très proches sont absentes des surnageants de cultures de *C. perfringens* et *D. formicigenerans* et d'environ 75% des surnageants de notre modèle. Certaines études suggèrent que ces molécules seraient métabolisées par les bactéries du microbiote intestinal grâce à des enzymes nitroréductases et/ou déshydrogénase que possèdent ces deux bactéries **(Choi et al. 2018 ; Matsunaga et al. 2018)** et qui pourraient participer à la métabolisation de la nisolpidine et de la nifédipine au sein de notre modèle. Pour le démontrer, la recherche des métabolites associés (le BAY o 3199 *&* le BAY r 9425 pour la nisolpidine et le 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-5-methoxycarbonyl-pyridine-3-carboxylic acide *&* le 2-hydroxymethyl-pyridinecarboxylic acide pour la nifédipine) devrait être réalisée **(Raemsch et Sommer 1983; Komura et al. 2002)**. La clomipramine est seulement absente du surnageant de culture de la bactérie *O.*

splanchnicus qui n'est pas représentée dans notre modèle. Une précédente étude a montré que le métabolite de la clomipramine était la desméthylclomipramine **(Benfield, Harries, et Luscombe 1980)**. On peut alors penser que la bactérie *O. splanchnicus* est capable de métaboliser la clomipramine. Nos résultats ont également mis en évidence que la structure de base de l'hespéridine était absente du surnageant du HGMM et de 5 surnageants de souches en cultures individuelles. D'après certaines études, l'hespéridine serait métabolisée en hespéritine par le microbiote intestinal et notamment par des enzymes bêta glucosidases **(Yamamoto et al. 2013 ; Boonpawa et al. 2017 ; Nectoux et al. 2019)**. Ces résultats suggèrent que ces bactéries pourraient faire partie du processus de métabolisation de la molécule et devraient être confirmés par la recherche des métabolites dans les surnageants bactériens. La structure de l'oméprazole est elle aussi peu retrouvée dans les surnageants des souches pures et notamment dans celui de *B. ovatus* mais est retrouvée de manière identique au contrôle dans celui du HGMM. Bien qu'une étude ait démontré que la molécule pouvait être métabolisée par le microbiote intestinal de rats **(Watanabe et al. 1995)**, une autre a noté qu'il était peu probable que cette molécule le soit par le microbiote intestinal humain cas car elle est absorbée par l'organisme avant son arrivée dans le côlon **(Jourova, Anzenbacher, et Anzenbacherova 2016)**.

Toutes ces données indiquent qu'une fois ensemble, les souches se comportent de manière différente qu'individuellement, montrant l'importance, en plus des expériences sur les souches en culture unique, de tester un consortium de souches pour l'étude de la métabolisation des xénobiotiques par le microbiote intestinal. Bien que des analyses complémentaires soient nécessaires pour identifier les métabolites produits, ces résultats nous confortent dans le fait que le HGMM constitue un bon modèle pour étudier les interactions entre les xénobiotiques et le microbiote intestinal. Il permettrait en effet de prédire i) certains effets des composés testés sur le microbiote intestinal dans les études préliminaires visant à mettre au point de nouvelles molécules pharmaceutiques ou alimentaires ii) le devenir de ces nouveaux xénobiotiques afin d'éviter que ces derniers ne soient complétement métabolisés par le microbiote intestinal, et ne deviennent par conséquent inefficaces.

A ce jour, il peut être complémentaire des modèles mimant le microbiote intestinal tels que le SHIME, le TNO ou bien les modèles animaux, car il a l'avantage d'être reproductible, rapide et peu coûteux à mettre en place dans le cadre de tests préliminaires.

La dernière partie de la thèse a été ciblée sur les parabènes, retrouvés dans les cosmétiques et leur interaction potentielle avec un autre microbiote, le microbiote cutané. En effet, ce microbiote entre en contact étroit avec de nombreux produits cosmétiques utilisés pour nettoyer la peau ou en améliorer la qualité. Pour garantir leur intégrité microbiologique, les fabricants de cosmétiques

utilisent des conservateurs dont les parabènes **(Tavares et al. 2009)** qui sont cependant des perturbateurs endocriniens **(Fransway et al. 2019)** capables de jouer le rôle de nos hormones et d'agir sur nos systèmes reproductif, neurologique ou bien immunitaire **(Monneret 2017)**. Bien qu'ils soient reconnus comme néfastes pour la santé humaine, très peu de données sont disponibles quant à leur effet sur le microbiote cutané. Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier les effets que pouvaient avoir les parabènes, aux concentrations autorisées dans les formulations des produits cosmétiques, sur la croissance de 13 souches de staphylocoques dont une souche pathogène du microbiote cutané. En parallèle, nous avons voulu déterminer si les souches bactériennes pouvaient avoir un effet sur la structure des parabènes grâce à des analyses en UHPLC-MS/MS.

Nos résultats ont montré que les parabènes n'affectaient pas la croissance des souches testées contrairement à ce qui a été démontré dans une étude montrant que ces composés avaient une activité plus importante sur les bactéries à Gram + que sur celles à Gram - **(Matwiejczuk, Galicka, et Brzóska 2020)**. Ils confirment néanmoins de nombreuses études qui ont rapporté que les parabènes n'affectaient pas la croissance de *S. aureus* à 3,28 mM de méthylparabène ou à 1,4 mM de propylparabène **(Pierson, Smoot, et Vantassell 1980 ; Crovetto et al. 2017)**. Bien que les parabènes n'affectent pas la croissance des souches testées, nous avons mis en évidence que leur structure était modifiée par les bactéries. En effet, le méthylparabène est très peu retrouvé dans les surnageants de culture des souches sauf concernant *S. haemolyticus* et *S. aureus* où il y est retrouvé à 50% de sa concentration initiale. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que ces souches, connues pour former du biofilm, pourraient se retrouver dans cette conformation dans nos conditions d'expérimentation **(Fredheim et al. 2009 ; Archer et al. 2011)**. Sous cette forme, les bactéries sont alors métaboliquement moins actives, elles seraient donc moins en capacité d'interagir avec le méthylparabène et d'en modifier la structure. En outre, on pourrait également envisager le fait que si les bactéries sont sous forme de biofilm, le parabène est moins accessible pour elles et par conséquent moins modifié. Pour confirmer ou non cette hypothèse, il serait nécessaire de quantifier le biofilm formé par ces souches en présence ou non de méthylparabène. Cette quantification pourrait être également réalisée pour les autres souches bactériennes avec ou sans parabènes. Nous pourrions comparer l'effet des parabènes sur la formation de biofilm et une fois le biofilm formé en mesurant la hauteur du biofilm par apotome **(Di Domenico et al. 2020)** ou en utilisant des colorations au cristal violet ou en XTT pour déterminer la biomasse **(Xu et al. 2016)**. Il serait également intéressant de rechercher les métabolites du méthylparabène dans les surnageants où il n'est pas retrouvé, l'absence de la structure de base dans les surnageants pouvant être induite par la dégradation due aux bactéries. En effet, des auteurs ont démontré que des bactéries du sol à gram + sont capables de dégrader le méthylparabène et donc de l'éliminer des sols pollués **(Juárez-Jiménez et al. 2019)**. L'éthylparabène, quant à lui a été retrouvé

dans tous les surnageants de culture à la même concentration qu'initialement sauf en ce qui concerne le surnageant de *S. aureus* d'où il est absent. Il serait alors intéressant de rechercher les métabolites de dégradation connus des parabènes **(Abbas et al. 2010)** dans le surnageant de culture de cette souche qui semble avoir un profil spécifique. Le propylparabène est retrouvé de manière identique au contrôle dans certains surnageants alors qu'il est absent dans d'autres sans que ce phénomène ne puisse être clairement expliqué. Néanmoins, il a déjà été démontré que certaines bactéries telles que *Pseudomonas beteli* et *Burkholderia latens*, pouvaient dégrader le propylparabène et se servir du carbone comme source d'énergie **(Amin et al. 2010)**.

Nos résultats ont ainsi montré que les parabènes n'affectaient pas la croissance des souches de staphylocoques du microbiote cutané bien que leurs structures soient modifiées. A terme, la recherche des métabolites dans les surnageants de culture pour chaque parabène et la quantification des molécules au cours du temps devrait être envisagées. Par ailleurs, d'autres expérimentations utilisant des mélanges de souches, mais également des mélanges de parabènes pourraient montrer des profils de modifications différents. Bien que les produits cosmétiques soient contrôlés par des règles très strictes en Europe **(« Reglementation des produits cosmetiques » 2014)**, ces études préliminaires montrent ici qu'ils peuvent interagir avec une partie des souches bactériennes du microbiote cutané.

CONCLUSION GÉNÉRALE

V. Conclusion générale

Les objectifs de ces travaux de thèse ont été de mettre en place des modèles simplifiés de microbiote intestinal et cutané *in vitro* afin de déterminer l'effet de différents xénobiotiques sur ces microbiotes reconstitués mais aussi sur les souches le composant.

Pour cela, nous avons sélectionné des souches appartenant au core microbiote intestinal qui ont été cultivées dans un milieu unique permettant la croissance de la majorité de ces bactéries. Ces souches ont ensuite été regroupées pour former un modèle stable de microbiote intestinal *in vitro* que nous avons nommé Human Gut Microbiota Model (HGMM).

Nos travaux ont montré que seuls les antibiotiques affectaient les abondances relatives de notre modèle et qu'ils impactaient également la croissance des souches en cultures individuelles. Globalement, les autres xénobiotiques testés, médicaments, pesticides, perturbateurs endocriniens (parabènes et phtalates) n'ont pas provoqué de modification des abondances relatives au sein de notre modèle ni dans les cultures individuelles. Parallèlement, les effets du microbiote sur les xénobiotiques ont été étudiés. Les résultats obtenus ont permis de confirmer les travaux de nombreux auteurs mentionnant l'implication du microbiote intestinal dans le métabolisme d'un grand nombre de xénobiotiques. Nous pouvons alors considérer le HGMM comme un modèle intéressant pour l'étude des effets réciproques entre les xénobiotiques et le microbiote intestinal dans le cadre des étapes préliminaires de la mise au point de nouvelles molécules pharmaceutiques, alimentaires ou environnementales. En effet, il a l'avantage d'être simple et rapide à mettre en place, en plus d'être peu coûteux en terme financier et matériel.

En parallèle, des souches de staphylocoques ont été choisies pour l'étude de leurs interactions avec des parabènes utilisés couramment dans les cosmétiques. Nous avons montré que ces parabènes n'impactaient pas la croissance de ces bactéries retrouvées au niveau du microbiote cutané. Nos résultats ont néanmoins mis en évidence que les bactéries influaient sur la structure des parabènes, notamment sur le méthylparabène. Ce phénomène pourrait être impliqué dans la protection de l'organisme des effets néfastes de certains perturbateurs endocriniens.

Durant ces travaux nous avons été confrontés à certaines contraintes expérimentales et temporelles. En effet, nous n'avons pas pu utiliser toutes les souches préalablement sélectionnées, car certaines avaient besoin d'apport nutritif et/ou de conditions d'anaérobiose très spécifiques. Le nombre de souches utilisées pour la conception de notre HGMM s'est donc trouvé réduit. Par manque de temps et d'automates, nous n'avons pas pu rechercher les métabolites secondaires des

xénobiotiques potentiellement métabolisés par les souches testées que ce soit en culture individuelles ou dans le modèle mis au point. Par manque de temps également, la mise en commun des souches de staphylocoques pour recréer un microbiote cutané *in vitro* n'a pu être finalisée, de même que la recherche des métabolites des parabènes.

Les perspectives de ces travaux nous paraissent se décomposer en deux temps, Dans un premier temps, comme nous l'avons déjà souligné à plusieurs reprises, il sera utile de rechercher et/ou caractériser les métabolites secondaires des xénobiotiques dans les surnageants de culture des souches individuelles ou du HGMM. Ensuite, et afin de consolider notre HGMM, il sera rapidement nécessaire d'augmenter le nombre de souches utilisées et d'adapter le milieu de culture et les inoculums. La création de modèles spécifiques d'une pathologie peut être envisagée à plus long terme pour permettre à l'industrie pharmaceutique l'élaboration de nouveaux médicaments en prenant en compte le microbiote intestinal. Pour cette utilisation la miniaturisation du modèle pourrait en faire un outil de référence dans l'analyse de l'interaction entre le microbiote intestinal et les xénobiotiques.

En ce qui concerne le microbiote cutané, il sera là aussi indispensable dans un premier temps de caractériser les métabolites secondaires des parabènes. L'utilisation de cocktail de parabènes devra être envisagée pour se rapprocher des conditions d'utilisation dans les produits cosmétiques. A terme, l'introduction d'autres modèles bactériens tels que des *Cutibacterium* et des *Corynebacterium* pourrait être envisagée, ainsi que la prise en compte de résultats obtenus avec des modèles fongiques des genres C*andida, Cryptococcus, Rhodotorula* et *Malassezia*. L'ensemble de tous ces microorganismes permettrait de créer un modèle simplifié de microbiote cutané, toujours dans le but d'étudier les interactions entre les xénobiotiques et le microbiote de la peau. Ce modèle pourrait particulièrement intéresser les industries cosmétiques dans l'élaboration de nouveaux produits en combinaison avec les modèles de peaux reconstruites.

BIBLIOGRAPHIE

VI. Bibliographie

Abbas, Suzanne, Hélène Greige-Gerges, Nancy Karam, Marie-Hélène Piet, Patrick Netter, et Jacques Magdalou. 2010. « Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man ». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 25 (6): 568-77. https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-013.

Abreu, Maria T. 2010. « Toll-like Receptor Signalling in the Intestinal Epithelium: How Bacterial Recognition Shapes Intestinal Function ». *Nature Reviews Immunology* 10 (2): 131-44. https://doi.org/10.1038/nri2707.

Abreu, Murilo S. de, Ana C.V.V. Giacomini, Maksim Sysoev, Konstantin A. Demin, Polina A. Alekseeva, Sean T. Spagnoli, et Allan V. Kalueff. 2019. « Modeling Gut-Brain Interactions in Zebrafish ». *Brain Research Bulletin* 148 (mai): 55-62. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.03.003.

Ali, S, et G Yosipovitch. 2013. « Skin PH: From Basic SciencE to Basic Skin Care ». *Acta Dermato Venereologica* 93 (3): 261-67. https://doi.org/10.2340/00015555-1531.

Almeida, Alexandre, Alex L. Mitchell, Miguel Boland, Samuel C. Forster, Gregory B. Gloor, Aleksandra Tarkowska, Trevor D. Lawley, et Robert D. Finn. 2019. « A New Genomic Blueprint of the Human Gut Microbiota ». *Nature* 568 (7753): 499-504. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1.

Amin, Aeshna, Sateesh Chauhan, Manish Dare, et Arvind Kumar Bansal. 2010. « Degradation of Parabens by Pseudomonas Beteli and Burkholderia Latens ». *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 75 (2): 206-12. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.001.

Anders, Simon, Alejandro Reyes, et Wolfgang Huber. 2012a. « Detecting differential usage of exons from RNA-seq data ». *Genome research* 22 (10): 2008-17.

———. 2012b. « Detecting differential usage of exons from RNA-seq data ». *Genome Research* 22 (10): 2008-17. https://doi.org/10.1101/gr.133744.111.

ANSM. 2005. « Répertoire des spectres d'activité antimicrobienne validés par la Commission d'autorisation de mise sur le marché ».

———. 2018a. « Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : une infection évitée c'est un antibiotique préservé ! - Plaquette (ANSM -Santé publique France - Anses - Assurance Maladie - Inserm) (14/11/2018) ».

Anukam, Kingsley C, et Gregor Reid. 2007. « Probiotics: 100 Years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation ». . . *M*, 9.

Archer, Nathan K, Mark J Mazaitis, J William Costerton, Jeff G Leid, Mary Elizabeth Powers, et Mark E Shirtliff. 2011. « Staphylococcus aureus biofilms ». *Virulence* 2 (5): 445-59. https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724.

Audebert, Christophe, Gaël Even, Amandine Cian, Alexandre Loywick, Sophie Merlin, Eric Viscogliosi, et Magali Chabe. 2016. « Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota ». *Scientific reports* 6 (1): 1-11.

Awadel-Kariem, F. Mustafa, P. Patel, J. Kapoor, Jon S. Brazier, et Ellie J. C. Goldstein. 2010. « First Report of Parabacteroides Goldsteinii Bacteraemia in a Patient with Complicated Intra-Abdominal Infection ». *Anaerobe* 16 (3): 223-25. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.01.001.

Baizabal-Carvallo, José Fidel, et Marlene Alonso-Juarez. 2020. « The Link between Gut Dysbiosis and Neuroinflammation in Parkinson's Disease ». *Neuroscience* 432 (avril): 160-73. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.030.

Balato, Anna, Sara Cacciapuoti, Roberta Di Caprio, Claudio Marasca, Anna Masarà, Annunziata Raimondo, et Gabriella Fabbrocini. 2019. « Human Microbiome: Composition and Role in Inflammatory Skin Diseases ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 67 (1): 1-18. https://doi.org/10.1007/s00005-018-0528-4.

Baquero, F., et M. Reig. 1992. « Resistance of Anaerobic Bacteria to Antimicrobial Agents in Spain ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the*

European Society of Clinical Microbiology 11 (11): 1016-20. https://doi.org/10.1007/BF01967792.

Barko, P.C., M.A. McMichael, K.S. Swanson, et D.A. Williams. 2018. « The Gastrointestinal Microbiome: A Review ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32 (1): 9-25. https://doi.org/10.1111/jvim.14875.

Barry, J. L., C. Hoebler, G. T. Macfarlane, S. Macfarlane, J. C. Mathers, K. A. Reed, P. B. Mortensen, I. Nordgaard, I. R. Rowland, et C. J. Rumney. 1995. « Estimation of the Fermentability of Dietary Fibre in Vitro: A European Interlaboratory Study ». *The British Journal of Nutrition* 74 (3): 303-22. https://doi.org/10.1079/bjn19950137.

Beckers, Bram, Michiel Op De Beeck, Nele Weyens, Rebecca Van Acker, Marc Van Montagu, Wout Boerjan, et Jaco Vangronsveld. 2016. « Lignin Engineering in Field-Grown Poplar Trees Affects the Endosphere Bacterial Microbiome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, janvier. https://doi.org/10.1073/pnas.1523264113.

Belkaid, Yasmine, et Oliver J. Harrison. 2017. « Homeostatic Immunity and the Microbiota ». *Immunity* 46 (4): 562-76. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008.

Belkaid, Yasmine, et Samira Tamoutounour. 2016. « The Influence of Skin Microorganisms on Cutaneous Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 16 (6): 353-66. https://doi.org/10.1038/nri.2016.48.

Belstrøm, Daniel. 2020. « The salivary microbiota in health and disease ». *Journal of Oral Microbiology* 12 (1). https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1723975.

Beltrán, D., M. D. Frutos-Lisón, J. C. Espín, et R. García-Villalba. 2019. « Re-Examining the Role of the Gut Microbiota in the Conversion of the Lipid-Lowering Statin Monacolin K (Lovastatin) into Its Active β-Hydroxy Acid Metabolite ». *Food & Function* 10 (4): 1787-91. https://doi.org/10.1039/C8FO02594K.

Benfield, D. P., C. M. Harries, et D. K. Luscombe. 1980. « Some Pharmacological Aspects of Desmethylclomipramine ». *Postgraduate Medical Journal* 56 Suppl 1: 13-18.

Bentley, David R., Shankar Balasubramanian, Harold P. Swerdlow, Geoffrey P. Smith, John Milton, Clive G. Brown, Kevin P. Hall, et al. 2008. « Accurate Whole Human Genome Sequencing Using Reversible Terminator Chemistry ». *Nature* 456 (7218): 53-59. https://doi.org/10.1038/nature07517.

Bergman, P., S. Seyedoleslami Esfahani, et Y. Engström. 2017. « Drosophila as a Model for Human Diseases—Focus on Innate Immunity in Barrier Epithelia ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 121:29-81. Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.002.

Berner, Annina Zihler, Susana Fuentes, Alexandra Dostal, Amanda N. Payne, Pamela Vazquez Gutierrez, Christophe Chassard, Franck Grattepanche, Willem M. de Vos, et Christophe Lacroix. 2013. « Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for Controlled Ecological Studies: Validation and Effect of PH ». *PLOS ONE* 8 (10): e77772. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077772.

Billingham, R. E., et P. B. Medawar. 1951. « The Technique of Free Skin Grafting in Mammals ». *Journal of Experimental Biology* 28 (3): 385-402.

Blaak, Jürgen, et Peter Staib. 2018. « The Relation of PH and Skin Cleansing ». *Current Problems in Dermatology* 54: 132-42. https://doi.org/10.1159/000489527.

Blaser, Martin J. 2014a. « The microbiome revolution ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (10): 4162-65. https://doi.org/10.1172/JCI78366.

Boelsterli, Urs, Matthew Redinbo, et Kyle Saitta. 2012. « Multiple NSAID-Induced Hits Injure the Small Intestine: Underlying Mechanisms and Novel Strategies ». *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 131 (octobre). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs310.

Bokulich, Nicholas A., Sathish Subramanian, Jeremiah J. Faith, Dirk Gevers, Jeffrey I. Gordon, Rob Knight, David A. Mills, et J. Gregory Caporaso. 2013. « Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing ». *Nature methods* 10 (1): 57-59. https://doi.org/10.1038/nmeth.2276.

Bolyen, Evan, Jai Ram Rideout, Matthew R Dillon, Nicholas A Bokulich, Christian C Abnet, Gabriel A Al-Ghalith, Harriet Alexander, Eric J Alm, Manimozhiyan Arumugam, et Francesco Asnicar. 2019. « Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 ». *Nature biotechnology* 37 (8): 852-57.

Boonpawa, Rungnapa, Albertus Spenkelink, Ans Punt, et Ivonne M. C. M. Rietjens. 2017. « Physiologically Based Kinetic Modeling of Hesperidin Metabolism and Its Use to Predict in Vivo Effective Doses in Humans ». *Molecular Nutrition & Food Research* 61 (8). https://doi.org/10.1002/mnfr.201600894.

Borin, M. T. 1991. « A Review of the Pharmacokinetics of Cefpodoxime Proxetil ». *Drugs* 42 Suppl 3: 13-21. https://doi.org/10.2165/00003495-199100423-00005.

Boureau, L. Hartmann, T. Karjalaine, H. 2000. « Models to Study Colonisation and Colonisation Resistance ». *Microbial Ecology in Health and Disease* 12 (2): 247-58. https://doi.org/10.1080/08910600050216246.

Bouslimani, Amina, Ricardo da Silva, Tomasz Kosciolek, Stefan Janssen, Chris Callewaert, Amnon Amir, Kathleen Dorrestein, et al. 2019. « The Impact of Skin Care Products on Skin Chemistry and Microbiome Dynamics ». *BMC Biology* 17 (1): 47. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0660-6.

Braun, Tzipi, Ayelet Di Segni, Marina BenShoshan, Sandra Neuman, Nina Levhar, Michael Bubis, Orit Picard, et al. 2019. « Individualized Dynamics in the Gut Microbiota Precede Crohn's Disease Flares »: *The American Journal of Gastroenterology* 114 (7): 1142-51. https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000136.

Brismar, Bo, Charlotta Edlund, et Carl ERIK Nord. 1991a. « Comparative Effects of Clarithromycin and Erythromycin on the Normal Intestinal Microflora ». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 23 (5): 635-42. https://doi.org/10.3109/00365549109105189.

Brown, Bonnie L., Mick Watson, Samuel S. Minot, Maria C. Rivera, et Rima B. Franklin. 2017. « MinION™ Nanopore Sequencing of Environmental Metagenomes: A Synthetic Approach ». *GigaScience* 6 (3): 1-10. https://doi.org/10.1093/gigascience/gix007.

Burdet, Charles, Thu Thuy Nguyen, Xavier Duval, Stéphanie Ferreira, Antoine Andremont, Jérémie Guedj, et France Mentré. 2019a. « Impact of Antibiotic Gut Exposure on the Temporal Changes in Microbiome Diversity ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (10). https://doi.org/10.1128/AAC.00820-19.

Byrd, Allyson L., Yasmine Belkaid, et Julia A. Segre. 2018a. « The Human Skin Microbiome ». *Nature Reviews Microbiology* 16 (3): 143-55. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157.

Caldwell, J., et G. M. Hawksworth. 1973. « The Demethylation of Methamphetamine by Intestinal Microflora ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 25 (5): 422-24. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1973.tb10043.x.

Callewaert, Chris, Prawira Hutapea, Tom Van de Wiele, et Nico Boon. 2014. « Deodorants and Antiperspirants Affect the Axillary Bacterial Community ». *Archives of Dermatological Research* 306 (8): 701-10. https://doi.org/10.1007/s00403-014-1487-1.

Cerquetella, Matteo. 2010. « Inflammatory Bowel Disease in the Dog: Differences and Similarities with Humans ». *World Journal of Gastroenterology* 16 (9): 1050. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i9.1050.

Chao, Anne, Nicholas Gotelli, T. C. Hsieh, Elizabeth Sander, K. Ma, Robert Colwell, et Aaron Ellison. 2014a. « Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies ». *Ecological Monographs* 84 (février): 45-67. https://doi.org/10.1890/13-0133.1.

Chao, Anne, Nicholas J Gotelli, TC Hsieh, Elizabeth L Sander, KH Ma, Robert K Colwell, et Aaron M Ellison. 2014b. « Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies ». *Ecological Monographs* 84 (1): 45-67.

Chelakkot, Chaithanya, Jaewang Ghim, et Sung Ho Ryu. 2018. « Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications ». *Experimental & molecular medicine* 50 (8): 1-9.

Cho, Ilseung, et Martin J. Blaser. 2012. « The Human Microbiome: at the interface of health and disease ». *Nature reviews. Genetics* 13 (4): 260-70. https://doi.org/10.1038/nrg3182.

Choi, Min Sun, Jun Sang Yu, Hye Hyun Yoo, et Dong-Hyun Kim. 2018. « The Role of Gut Microbiota in the Pharmacokinetics of Antihypertensive Drugs ». *Pharmacological Research* 130 (avril): 164-71. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.019.

Chong-Nguyen, Caroline, Henri Duboc, et Harry Sokol. 2017. « Le microbiote, un nouveau facteur de risque cardiovasculaire ? » *La Presse Médicale* 46 (7-8): 708-13. https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.06.005.

Chu, Derrick M., Jun Ma, Amanda L. Prince, Kathleen M. Antony, Maxim D. Seferovic, et Kjersti M. Aagaard. 2017. « Maturation of the Infant Microbiome Community Structure and Function Across Multiple Body Sites and in Relation to Mode of Delivery ». *Nature medicine* 23 (3): 314-26. https://doi.org/10.1038/nm.4272.

Chugh, Krishan, et Shruti Agrawal. 2003. « Cefpodoxime: Pharmacokinetics and Therapeutic Uses ». *Indian Journal of Pediatrics* 70 (3): 227-31. https://doi.org/10.1007/BF02725589.

Clarke, Gerard, Kiran V. Sandhu, Brendan T. Griffin, Timothy G. Dinan, John F. Cryan, et Niall P. Hyland. 2019. « Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions ». Édité par Charles P. France. *Pharmacological Reviews* 71 (2): 198-224. https://doi.org/10.1124/pr.118.015768.

Clarke, Siobhan F, Eileen F Murphy, Orla O'Sullivan, Alice J Lucey, Margaret Humphreys, Aileen Hogan, Paula Hayes, et al. 2014. « Exercise and Associated Dietary Extremes Impact on Gut Microbial Diversity ». *Gut* 63 (12): 1913-20. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306541.

Claudel, Jean-Paul, Nicole Auffret, Marie-Thérèse Leccia, Florence Poli, Stéphane Corvec, et Brigitte Dréno. 2019. « ***Staphylococcus Epidermidis***: A Potential New Player in the Physiopathology of Acne? » *Dermatology* 235 (4): 287-94. https://doi.org/10.1159/000499858.

Clooney, Adam G., Fiona Fouhy, Roy D. Sleator, Aisling O' Driscoll, Catherine Stanton, Paul D. Cotter, et Marcus J. Claesson. 2016. « Comparing Apples and Oranges?: Next Generation Sequencing and Its Impact on Microbiome Analysis ». *PLOS ONE* 11 (2): e0148028. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148028.

Coates, Margaret, Min Jin Lee, Diana Norton, et Amanda S. MacLeod. 2019. « The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems ». *Frontiers in Immunology* 10 (décembre). https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02950.

Cogen, A. L., V. Nizet, et R. L. Gallo. 2008a. « Skin microbiota: a source of disease or defence? » *The British journal of dermatology* 158 (3): 442-55. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x.

Collins, Stephanie L., et Andrew D. Patterson. 2020. « The Gut Microbiome: An Orchestrator of Xenobiotic Metabolism ». *Acta Pharmaceutica Sinica B* 10 (1): 19-32. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.001.

Concannon, Jan, Helen Lovitt, Michael Ramage, Lau Hoon Tai, Charles McDonald, et V. Bruce Sunderland. 1986a. « Stability of Aqueous Solutions of Amoxicillin Sodium in the Frozen and Liquid States ». *American Journal of Health-System Pharmacy* 43 (12): 3027-30. https://doi.org/10.1093/ajhp/43.12.3027.

Crovetto, Sara I., Elena Moreno, Amira L. Dib, Miguel Espigares, et Elena Espigares. 2017. « Bacterial Toxicity Testing and Antibacterial Activity of Parabens ». *Toxicological & Environmental Chemistry* 99 (5-6): 858-68. https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1300905.

Cummings, J.H., et G.T. Macfarlane. 1997. « Role of Intestinal Bacteria in Nutrient Metabolism ». *Clinical Nutrition* 16 (1): 3-11. https://doi.org/10.1016/S0261-5614(97)80252-X.

Currò, Diego. 2018. « The Role of Gut Microbiota in the Modulation of Drug Action: A Focus on Some Clinically Significant Issues ». *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11 (2): 171-83. https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1414598.

Dagnelie, Marie-Ange, Emmanuel Montassier, Amir Khammari, Carine Mounier, Stéphane Corvec, et Brigitte Dréno. 2019. « Inflammatory Skin Is Associated with Changes in the Skin Microbiota

Composition on the Back of Severe Acne Patients ». *Experimental Dermatology* 28 (8): 961-67. https://doi.org/10.1111/exd.13988.

Daina, Antoine, et Vincent Zoete. 2016. « A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules ». *ChemMedChem* 11 (11): 1117.

De La Cochetière, M. F., T. Durand, P. Lepage, A. Bourreille, J. P. Galmiche, et J. Doré. 2005. « Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (11): 5588-92. https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5588-5592.2005.

Dedrick, Sandra, Bharathi Sundaresh, Qian Huang, Claudia Brady, Tessa Yoo, Catherine Cronin, Caitlin Rudnicki, et al. 2020. « The Role of Gut Microbiota and Environmental Factors in Type 1 Diabetes Pathogenesis ». *Frontiers in Endocrinology* 11 (février). https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00078.

Defaye, Manon, Céline Nourrisson, Elodie Baudu, Ivan Warwzyniak, Virginie Bonnin, Mathilde Bonnet, Nicolas Barnich, Denis Ardid, Frédéric Delbac, et Frédéric Antonio Carvalho. 2018. « Efficient and reproducible experimental infections of rats with Blastocystis spp. » *Plos one* 13 (11): e0207669.

Dethlefsen, L., et D. A. Relman. 2011. « Incomplete Recovery and Individualized Responses of the Human Distal Gut Microbiota to Repeated Antibiotic Perturbation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (Supplement_1): 4554-61. https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107.

Dethlefsen, Les, Sue Huse, Mitchell L Sogin, et David A Relman. 2008. « The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing ». *PLoS biol* 6 (11): e280.

Dethlefsen, Les, et David A Relman. 2011. « Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (Supplement 1): 4554-61.

Di Domenico, Enea Gino, Barbara De Angelis, Ilaria Cavallo, Francesca Sivori, Fabrizio Orlandi, Margarida Fernandes Lopes Morais D'Autilio, Chiara Di Segni, et al. 2020. « Silver Sulfadiazine Eradicates Antibiotic-Tolerant Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa Biofilms in Patients with Infected Diabetic Foot Ulcers ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (12): 3807. https://doi.org/10.3390/jcm9123807.

Dickson, Robert P., John R. Erb-Downward, Fernando J. Martinez, et Gary B. Huffnagle. 2016. « The Microbiome and the Respiratory Tract ». *Annual review of physiology* 78 (février): 481-504. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105238.

Dortet, Laurent, Rémy Bonnin, et Thierry Naas. 2017. « Impact du séquençage d'ADN à haut débit sur la surveillance des épidémies de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques ». *Feuillets de biologie* 354 (janvier).

Douglas, Angela E. 2018. « The Drosophila Model for Microbiome Research ». *Lab Animal* 47 (6): 157-64. https://doi.org/10.1038/s41684-018-0065-0.

———. 2019. « Simple Animal Models for Microbiome Research ». *Nature Reviews. Microbiology* 17 (12): 764-75. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0242-1.

Drago, Lorenzo, Casini Valentina, et Pace Fabio. 2019. « Gut Microbiota, Dysbiosis and Colon Lavage ». *Digestive and Liver Disease* 51 (9): 1209-13. https://doi.org/10.1016/j.dld.2019.06.012.

Dudek-Wicher, Ruth K., Adam Junka, et Marzenna Bartoszewicz. 2018. « The Influence of Antibiotics and Dietary Components on Gut Microbiota ». *Przegląd Gastroenterologiczny* 13 (2): 85. https://doi.org/10.5114/pg.2018.76005.

Dunyach-Remy, Catherine, Albert Sotto, et Jean-Philippe Lavigne. 2015. « Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2015 (469): 51-58. https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)72821-2.

Edlund, C. 2000. « Pharmacokinetics and comparative effects of telithromycin (HMR 3647) and clarithromycin on the oropharyngeal and intestinal microflora ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46 (5): 741-49. https://doi.org/10.1093/jac/46.5.741.

Eiseman, Silen, Bascom, Kauvar. 1958. « Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis ». Surgery 44(5): 854-859

Ejtahed, Hanieh-Sadat, Pooneh Angoorani, Shirin Hasani-Ranjbar, Seyed-Davar Siadat, Nasrin Ghasemi, Bagher Larijani, et Ahmad-Reza Soroush. 2018. « Adaptation of human gut microbiota to bariatric surgeries in morbidly obese patients: a systematic review ». *Microbial pathogenesis* 116: 13-21.

Elfil, Mohamed, Serageldin Kamel, Mohamed Kandil, Brian B. Koo, et Sara M. Schaefer. 2020. « Implications of the Gut Microbiome in Parkinson's Disease ». *Movement Disorders*, février. https://doi.org/10.1002/mds.28004.

Elias, Peter M. 2007. « The Skin Barrier as an Innate Immune Element ». *Seminars in Immunopathology* 29 (1): 3-14. https://doi.org/10.1007/s00281-007-0060-9.

Elwell, L P, H R Wilson, V B Knick, et B R Keith. 1986a. « In Vitro and in Vivo Efficacy of the Combination Trimethoprim-Sulfamethoxazole against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 29 (6): 1092-94. https://doi.org/10.1128/AAC.29.6.1092.

Emmert, Hila, Franziska Rademacher, Regine Gläser, et Jürgen Harder. s. d. « Skin Microbiota Analysis in Human 3D Skin Models—"Free Your Mice" ». *Experimental Dermatology* n/a (n/a). Consulté le 5 novembre 2020. https://doi.org/10.1111/exd.14164.

Enright, Elaine F., Cormac G.M. Gahan, Susan A. Joyce, et Brendan T. Griffin. 2016. « The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 89 (3): 375-82.

Ericsson, Aaron C. 2019. « The Use of Non-Rodent Model Species in Microbiota Studies ». *Laboratory Animals* 53 (3): 259-70. https://doi.org/10.1177/0023677219834593.

Escherich, Theodor Auteur du texte. 1886. *Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung, von Dr Theodor Escherich,...* https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k841569w.

Eucast 2020. 2020. « EUCAST, Comité de l'antibiogrammede la Société Française de Microbiologie, avril 2020 ». 11 mai 2020. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf.

Fahlén, Annika, Lars Engstrand, Barbara S. Baker, Anne Powles, et Lionel Fry. 2012. « Comparison of Bacterial Microbiota in Skin Biopsies from Normal and Psoriatic Skin ». *Archives of Dermatological Research* 304 (1): 15-22. https://doi.org/10.1007/s00403-011-1189-x.

Faith, Jeremiah J, Janaki L Guruge, Mark Charbonneau, Sathish Subramanian, Henning Seedorf, Andrew L Goodman, Jose C Clemente, Rob Knight, Andrew C Heath, et Rudolph L Leibel. 2013. « The long-term stability of the human gut microbiota ». *Science* 341 (6141).

Fan, Yong, et Oluf Pedersen. 2020. « Gut Microbiota in Human Metabolic Health and Disease ». *Nature Reviews Microbiology*, septembre, 1-17. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9.

Fei, Na, Beatriz Peñalver Bernabé, Louise Lie, Danny Baghdan, Kweku Bedu-Addo, Jacob Plange-Rhule, Terrence E. Forrester, et al. 2019. « The Human Microbiota Is Associated with Cardiometabolic Risk across the Epidemiologic Transition ». Édité par Juan J. Loor. *PLOS ONE* 14 (7): e0215262. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215262.

Felsenstein, J. 1981. « Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach ». *Journal of Molecular Evolution* 17 (6): 368-76. https://doi.org/10.1007/BF01734359.

Fenn, Kathrin, Philip Strandwitz, Eric J. Stewart, Eric Dimise, Sarah Rubin, Shreya Gurubacharya, Jon Clardy, et Kim Lewis. 2017. « Quinones Are Growth Factors for the Human Gut Microbiota ». *Microbiome* 5 (1): 161. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0380-5.

Ferretti, Pamela, Stefania Farina, Mario Cristofolini, Giampiero Girolomoni, Adrian Tett, et Nicola Segata. 2017. « Experimental Metagenomics and Ribosomal Profiling of the Human Skin Microbiome ». *Experimental Dermatology* 26 (3): 211-19. https://doi.org/10.1111/exd.13210.

Finegold, Sydney M., Scot E. Dowd, Viktoria Gontcharova, Chengxu Liu, Kathleen E. Henley, Randall D. Wolcott, Eunseog Youn, et al. 2010a. « Pyrosequencing Study of Fecal Microflora of Autistic

and Control Children ». *Anaerobe* 16 (4): 444-53. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008.

Fischmeister, I., L. Hellgren, et J. Vincent. 1975. « Infrared Spectroscopy for Tracing of Topically Applied Ointment Vehicles and Active Substances on Healthy Skin ». *Archives for Dermatological Research = Archiv Fur Dermatologische Forschung* 253 (1): 63-69. https://doi.org/10.1007/BF00557981.

Forster, Samuel C., Nitin Kumar, Blessing O. Anonye, Alexandre Almeida, Elisa Viciani, Mark D. Stares, Matthew Dunn, et al. 2019. « A Human Gut Bacterial Genome and Culture Collection for Improved Metagenomic Analyses ». *Nature Biotechnology* 37 (2): 186-92. https://doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7.

Foster, Kevin R., et Thomas Bell. 2012. « Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species ». *Current Biology* 22 (19): 1845-50. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005.

Fouladi, Farnaz, Maximilian J. Bailey, William B. Patterson, Michael Sioda, Ivory C. Blakley, Anthony A. Fodor, Roshonda B. Jones, et al. 2020. « Air Pollution Exposure Is Associated with the Gut Microbiome as Revealed by Shotgun Metagenomic Sequencing ». *Environment International* 138 (mai): 105604. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105604.

Fournière, Mathilde, Thomas Latire, Djouhar Souak, Marc G. J. Feuilloley, et Gilles Bedoux. 2020. « Staphylococcus Epidermidis and Cutibacterium Acnes: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics ». *Microorganisms* 8 (11): 1752. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111752.

Fraher, Marianne H., Paul W. O'Toole, et Eamonn M. M. Quigley. 2012. « Techniques Used to Characterize the Gut Microbiota: A Guide for the Clinician ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 9 (6): 312-22. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44.

Francino, M. P. 2016a. « Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances ». *Frontiers in Microbiology* 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543.

Frankel, Arthur E, Laura A Coughlin, Jiwoong Kim, Thomas W Froehlich, Yang Xie, Eugene P Frenkel, et Andrew Y Koh. 2017. « Metagenomic shotgun sequencing and unbiased metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients ». *Neoplasia* 19 (10): 848-55.

Fransway, Anthony F., Paulina J. Fransway, Donald V. Belsito, et James A. Yiannias. 2019. « Paraben Toxicology »: *Dermatitis* 30 (1): 32-45. https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000428.

Franzosa, Eric A, Tiffany Hsu, Alexandra Sirota-Madi, Afrah Shafquat, Galeb Abu-Ali, Xochitl C Morgan, et Curtis Huttenhower. 2015. « Sequencing and beyond: integrating molecular'omics' for microbial community profiling ». *Nature Reviews Microbiology* 13 (6): 360-72.

Fredheim, Elizabeth Gladys Aarag, Claus Klingenberg, Holger Rohde, Stephanie Frankenberger, Peter Gaustad, Trond Flægstad, et Johanna Ericson Sollid. 2009. « Biofilm Formation by Staphylococcus haemolyticus ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (4): 1172-80. https://doi.org/10.1128/JCM.01891-08.

Freeman, Aaron E., Howard J. Igel, Brenda J. Herrman, et Karen L. Kleinfeld. 1976. « Growth and characterization of human skin epithelial cell cultures ». *In vitro* 12 (5): 352–362.

Fukutsu, Naoto, Takao Kawasaki, Koichi Saito, et Hiroyuki Nakazawa. 2006a. « Application of High-Performance Liquid Chromatography Hyphenated Techniques for Identification of Degradation Products of Cefpodoxime Proxetil ». *Journal of Chromatography A* 1129 (2): 153-59. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.102.

Gaillard-Gendron, S., D. Vignon, G. Cottenceau, M. Graber, N. Zorn, A. van Dorsselaer, et A. M. Pons. 2000. « Isolation, Purification and Partial Amino Acid Sequence of a Highly Hydrophobic New Microcin Named Microcin L Produced by Escherichia Coli ». *FEMS Microbiology Letters* 193 (1): 95-98. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09408.x.

Gal, Micaela, et J. S. Brazier. 2004. « Metronidazole resistance in Bacteroides spp. carrying nim genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54 (1): 109-16. https://doi.org/10.1093/jac/dkh296.

Gallo, Richard L., et Lora V. Hooper. 2012. « Epithelial Antimicrobial Defence of the Skin and Intestine ». *Nature Reviews Immunology* 12 (7): 503-16. https://doi.org/10.1038/nri3228.

Gao, Zhan, Chi-hong Tseng, Bruce E. Strober, Zhiheng Pei, et Martin J. Blaser. 2008. « Substantial Alterations of the Cutaneous Bacterial Biota in Psoriatic Lesions ». *PLoS ONE* 3 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002719.

Garcia-Gutierrez, Enriqueta, Melinda J. Mayer, Paul D. Cotter, et Arjan Narbad. 2019. « Gut Microbiota as a Source of Novel Antimicrobials ». *Gut Microbes* 10 (1): 1-21. https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1455790.

Geoghegan, Joan A., Alan D. Irvine, et Timothy J. Foster. 2018. « Staphylococcus Aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship ». *Trends in Microbiology* 26 (6): 484-97. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008.

Gérard, Philippe. 2016. « Gut Microbiota and Obesity ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (1): 147-62. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5.

Gérard, Philippe, et Annick Bernalier-Donadille. 2007. « Les fonctions majeures du microbiote intestinal ». *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 42 (avril): 28-36. https://doi.org/10.1016/S0007-9960(07)91318-8.

Gerber, Peter Arne, Bettina Alexandra Buhren, Holger Schrumpf, Bernhard Homey, Albert Zlotnik, et Peter Hevezi. 2014. « The Top Skin-Associated Genes: A Comparative Analysis of Human and Mouse Skin Transcriptomes ». *Biological Chemistry* 395 (6): 577-91. https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0279.

Gibbs, Sue, Johannes J. M. van de Sandt, Hans F. Merk, David J. Lockley, Ruth U. Pendlington, et Camilla K. Pease. 2007. « Xenobiotic Metabolism in Human Skin and 3D Human Skin Reconstructs: A Review ». *Current Drug Metabolism* 8 (8): 758-72. https://doi.org/10.2174/138920007782798225.

Gibson, G R, J H Cummings, et G T Macfarlane. 1988. « Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. » *Applied and Environmental Microbiology* 54 (11): 2750-55.

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, et K. E. Nelson. 2006. « Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome ». *Science* 312 (5778): 1355-59. https://doi.org/10.1126/science.1124234.

Glatz, Martin, Jay-Hyun Jo, Elizabeth A. Kennedy, Eric C. Polley, Julia A. Segre, Eric L. Simpson, et Heidi H. Kong. 2018. « Emollient Use Alters Skin Barrier and Microbes in Infants at Risk for Developing Atopic Dermatitis ». Édité par Gilberto E Flores. *PLOS ONE* 13 (2): e0192443. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192443.

Gledhill, Karl, Zongyou Guo, Noriko Umegaki-Arao, Claire A. Higgins, Munenari Itoh, et Angela M. Christiano. 2015. « Melanin Transfer in Human 3D Skin Equivalents Generated Exclusively from Induced Pluripotent Stem Cells ». *PLOS ONE* 10 (8): e0136713. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136713.

Golosova, Olga, Ross Henderson, Yuriy Vaskin, Andrei Gabrielian, German Grekhov, Vijayaraj Nagarajan, Andrew J. Oler, et al. 2014a. « Unipro UGENE NGS Pipelines and Components for Variant Calling, RNA-Seq and ChIP-Seq Data Analyses ». *PeerJ* 2 (novembre): e644. https://doi.org/10.7717/peerj.644.

Goodman, Andrew L, George Kallstrom, Jeremiah J Faith, Alejandro Reyes, Aimee Moore, Gautam Dantas, et Jeffrey I Gordon. 2011. « Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (15): 6252-57.

Gosalbes, María José, Joan Compte, Silvia Moriano-Gutierrez, Yvonne Vallès, Nuria Jiménez-Hernández, Xavier Pons, Alejandro Artacho, et M. Pilar Francino. 2019. « Metabolic adaptation in the human gut microbiota during pregnancy and the first year of life ». *EBioMedicine* 39: 497-509.

Gossling, Jennifer, et John M. Slack. 1974. « Predominant Gram-Positive Bacteria in Human Feces: Numbers, Variety, and Persistence ». *Infection and Immunity* 9 (4): 719-29.

Götz, Christine, Roland Pfeiffer, Julia Tigges, Karsten Ruwiedel, Ulrike Hübenthal, Hans F. Merk, Jean Krutmann, et al. 2012. « Xenobiotic Metabolism Capacities of Human Skin in Comparison with a 3D-Epidermis Model and Keratinocyte-Based Cell Culture as in Vitro Alternatives for Chemical Testing: Phase II Enzymes ». *Experimental Dermatology* 21 (5): 364-69. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01478.x.

Graversen, Katrine Bækby, Martin Iain Bahl, Jeppe Madura Larsen, Anne-Sofie Ravn Ballegaard, Tine Rask Licht, et Katrine Lindholm Bøgh. 2020. « Short-Term Amoxicillin-Induced Perturbation of the Gut Microbiota Promotes Acute Intestinal Immune Regulation in Brown Norway Rats ». *Frontiers in Microbiology* 11: 496. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00496.

Grice, Elizabeth A., Heidi H. Kong, Sean Conlan, Clayton B. Deming, Joie Davis, Alice C. Young, Gerard G. Bouffard, et al. 2009. « Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5931): 1190-92. https://doi.org/10.1126/science.1171700.

Grice, Elizabeth A., et Julia A. Segre. 2011a. « The skin microbiome ». *Nature reviews. Microbiology* 9 (4): 244-53. https://doi.org/10.1038/nrmicro2537.

Guerra, Aurélie, Lucie Etienne-Mesmin, Valérie Livrelli, Sylvain Denis, Stéphanie Blanquet-Diot, et Monique Alric. 2012. « Relevance and Challenges in Modeling Human Gastric and Small Intestinal Digestion ». *Trends in Biotechnology* 30 (11): 591-600. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001.

Guerrant, R L, S J Wood, L Krongaard, R A Reid, et R H Hodge. 1981a. « Resistance among Fecal Flora of Patients Taking Sulfamethoxazole-Trimethoprim or Trimethoprim Alone. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 19 (1): 33-38. https://doi.org/10.1128/AAC.19.1.33.

Guinane, Caitriona M., Elaine M. Lawton, Paula M. O'Connor, Órla O'Sullivan, Colin Hill, R. Paul Ross, et Paul D. Cotter. 2016. « The Bacteriocin Bactofencin A Subtly Modulates Gut Microbial Populations ». *Anaerobe* 40 (août): 41-49. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.05.001.

Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, et Olivier Gascuel. 2010a. « New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 ». *Systematic biology* 59 (3): 307-21.

Gumienna, Małgorzata, Małgorzata Lasik, et Zbigniew Czarnecki. 2011. « Bioconversion of Grape and Chokeberry Wine Polyphenols during Simulated Gastrointestinal in Vitro Digestion ». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62 (3): 226-33. https://doi.org/10.3109/09637486.2010.532115.

Gunzburg, Jean de, Amine Ghozlane, Annie Ducher, Emmanuelle Le Chatelier, Xavier Duval, Etienne Ruppé, Laurence Armand-Lefevre, et al. 2018. « Protection of the Human Gut Microbiome From Antibiotics ». *The Journal of Infectious Diseases* 217 (4): 628-36. https://doi.org/10.1093/infdis/jix604.

Gurung, Manoj, Zhipeng Li, Hannah You, Richard Rodrigues, Donald B Jump, Andrey Morgun, et Natalia Shulzhenko. 2020. « Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology ». *EBioMedicine* 51 (janvier). https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051.

Haak, Bastiaan W, Jacqueline M Lankelma, Floor Hugenholtz, Clara Belzer, Willem M de Vos, et W Joost Wiersinga. 2019a. « Long-Term Impact of Oral Vancomycin, Ciprofloxacin and Metronidazole on the Gut Microbiota in Healthy Humans ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74 (3): 782-86. https://doi.org/10.1093/jac/dky471.

Haiser, Henry J, Kristen L Seim, Emily P Balskus, et Peter J Turnbaugh. 2014. « Mechanistic Insight into Digoxin Inactivation by *Eggerthella Lenta* Augments Our Understanding of Its Pharmacokinetics ». *Gut Microbes* 5 (2): 233-38. https://doi.org/10.4161/gmic.27915.

Harrington, Colleen T., Elaine I. Lin, Matthew T. Olson, et James R. Eshleman. 2013. « Fundamentals of Pyrosequencing ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137 (9): 1296-1303. https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0463-RA.

Hartley, C. L., H. M. Clements, et K. B. Linton. 1978. « Effects of Cephalexin, Erythromycin and Clindamycin on the Aerobic Gram-Negative Faecal Flora in Man ». *Journal of Medical Microbiology* 11 (2): 125-35. https://doi.org/10.1099/00222615-11-2-125.

Hasegawa, Satoru, Sae Goto, Hirokazu Tsuji, Tatsuya Okuno, Takashi Asahara, Koji Nomoto, Akihide Shibata, et al. 2015. « Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease ». *PLoS ONE* 10 (11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142164.

Hassanzadeh, Abdolreza, Jill Barber, Gareth A. Morris, et Peter A. Gorry. 2007a. « Mechanism for the Degradation of Erythromycin A and Erythromycin A 2'-Ethyl Succinate in Acidic Aqueous Solution ». *The Journal of Physical Chemistry A* 111 (40): 10098-104. https://doi.org/10.1021/jp073030y.

Hemarajata, Peera, et James Versalovic. 2013. « Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation ». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 6 (1): 39-51. https://doi.org/10.1177/1756283X12459294.

Hibbing, Michael E, Clay Fuqua, Matthew R Parsek, et S Brook Peterson. 2010. « Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle ». *Nature reviews microbiology* 8 (1): 15-25.

Hisada, Takayoshi, Kaori Endoh, et Kiyonori Kuriki. 2015. « Inter-and intra-individual variations in seasonal and daily stabilities of the human gut microbiota in Japanese ». *Archives of microbiology* 197 (7): 919-34.

Hong, Ki-Bae, Yang Hee Hong, Eun Young Jung, Kyungae Jo, et Hyung Joo Suh. 2020. « Changes in the Diversity of Human Skin Microbiota to Cosmetic Serum Containing Prebiotics: Results from a Randomized Controlled Trial ». *Journal of Personalized Medicine* 10 (3): 91. https://doi.org/10.3390/jpm10030091.

Houpt, Katherine A, et WILSON G PONDb. s. d. « The Pig as a Model for the Study of Obesity and of Control of Food Intake: A Review », 23.

Hu, Jianzhong, Vincent Raikhel, Kalpana Gopalakrishnan, Heriberto Fernandez-Hernandez, Luca Lambertini, Fabiana Manservisi, Laura Falcioni, et al. 2016. « Effect of Postnatal Low-Dose Exposure to Environmental Chemicals on the Gut Microbiome in a Rodent Model ». *Microbiome* 4 (1): 26. https://doi.org/10.1186/s40168-016-0173-2.

Huang, Yu-Feng, Sheng-Chung Chen, Yih-Shien Chiang, Tzu-Han Chen, et Kuo-Ping Chiu. 2012. « Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism ». *BMC Systems Biology* 6 (Suppl 2): S10. https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-S2-S10.

Huse, Susan M., Yuzhen Ye, Yanjiao Zhou, et Anthony A. Fodor. 2012. « A Core Human Microbiome as Viewed through 16S RRNA Sequence Clusters ». *PLOS ONE* 7 (6): e34242. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034242.

I, Cho, Yamanishi S, Cox L, Methé Ba, Zavadil J, Li K, Gao Z, et al. 2012. « Antibiotics in Early Life Alter the Murine Colonic Microbiome and Adiposity ». Nature. Nature. 30 août 2012. https://doi.org/10.1038/nature11400.

Ianiro, Gianluca, Herbert Tilg, et Antonio Gasbarrini. 2016a. « Antibiotics as Deep Modulators of Gut Microbiota: Between Good and Evil ». *Gut* 65 (11): 1906-15. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312297.

Ichim, Thomas E., Santosh Kesari, et Kim Shafer. 2018. « Protection from Chemotherapy- and Antibiotic-Mediated Dysbiosis of the Gut Microbiota by a Probiotic with Digestive Enzymes Supplement ». *Oncotarget* 9 (56): 30919-35. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25778.

Iizumi, Tadasu, Thomas Battaglia, Victoria Ruiz, et Guillermo I Perez Perez. 2017. « Gut microbiome and antibiotics ». *Archives of medical research* 48 (8): 727-34.

Ishiwatari, S., T. Suzuki, T. Hitomi, T. Yoshino, S. Matsukuma, et T. Tsuji. 2007. « Effects of Methyl Paraben on Skin Keratinocytes ». *Journal of Applied Toxicology: JAT* 27 (1): 1-9. https://doi.org/10.1002/jat.1176.

Iwasaki, Mari, Yasutada Akiba, et Jonathan D Kaunitz. 2019. « Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology: focus on the gastrointestinal system ». *F1000Research* 8.

Jandhyala, Sai Manasa, Rupjyoti Talukdar, Chivkula Subramanyam, Harish Vuyyuru, Mitnala Sasikala, et D Nageshwar Reddy. 2015. « Role of the normal gut microbiota ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 21 (29): 8787-8803. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787.

Järbrink-Sehgal, Ellionore, et Anna Andreasson. 2020. « The Gut Microbiota and Mental Health in Adults ». *Current Opinion in Neurobiology*, Brain, gut, and immune system interactions, 62 (juin): 102-14. https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.01.016.

Jiang, Chunmei, Guangning Li, Pengru Huang, Zhou Liu, et Bin Zhao. 2017. « The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 58 (1): 1-15. https://doi.org/10.3233/JAD-161141.

Johnsen, Bjørn Odd, Nina Handal, Roger Meisal, Jørgen Vildershøj Bjørnholt, Peter Gaustad, et Truls Michael Leegaard. 2017. « erm gene distribution among Norwegian Bacteroides isolates and evaluation of phenotypic tests to detect inducible clindamycin resistance in Bacteroides species ». *Anaerobe* 47: 226-32.

Johnson, Jethro S., Daniel J. Spakowicz, Bo-Young Hong, Lauren M. Petersen, Patrick Demkowicz, Lei Chen, Shana R. Leopold, et al. 2019. « Evaluation of 16S RRNA Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis ». *Nature Communications* 10 (1): 5029. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1.

Jourova, Lenka, Pavel Anzenbacher, et Eva Anzenbacherova. 2016. « Human Gut Microbiota Plays a Role in the Metabolism of Drugs ». *Biomedical Papers* 160 (3): 317-26. https://doi.org/10.5507/bp.2016.039.

Ju, Qiang, et Christos C. Zouboulis. 2016. « Endocrine-Disrupting Chemicals and Skin Manifestations ». *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 17 (3): 449-57. https://doi.org/10.1007/s11154-016-9371-2.

Juárez-Jiménez, Belén, Chiara Pesciaroli, Paula Maza-Márquez, Sergio López-Martínez, José Luís Vílchez-Quero, et Alberto Zafra-Gómez. 2019. « Biodegradation of Methyl and Butylparaben by Bacterial Strains Isolated from Amended and Non-Amended Agricultural Soil. Identification, Behavior and Enzyme Activities of Microorganisms ». *Journal of Environmental Management* 245 (septembre): 245-54. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.122.

Kanwar, Indu Lata, Tanweer Haider, Anju Kumari, Sandeep Dubey, Priyanka Jain, et Vandana Soni. 2018. « Models for Acne: A Comprehensive Study ». *Drug Discoveries & Therapeutics* 12 (6): 329-40. https://doi.org/10.5582/ddt.2018.01079.

Kaoutari, Abdessamad El, Fabrice Armougom, Didier Raoult, et Bernard Henrissat. 2014. « Le microbiote intestinal et la digestion des polysaccharides ». *médecine/sciences* 30 (3): 259-65. https://doi.org/10.1051/medsci/20143003013.

Kasianowicz, John J., Eric Brandin, Daniel Branton, et David W. Deamer. 1996. « Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (24): 13770-73. https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13770.

Kazem, Siamaque, Emma Charlotte Linssen, et Susan Gibbs. 2019. « Skin Metabolism Phase I and Phase II Enzymes in Native and Reconstructed Human Skin: A Short Review ». *Drug Discovery Today* 24 (9): 1899-1910. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.002.

Khanna, Sahil, et Laura E. Raffals. 2017. « The Microbiome in Crohn's Disease ». *Gastroenterology Clinics of North America* 46 (3): 481-92. https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.05.004.

Khosravi, Arya, et Sarkis K. Mazmanian. 2013. « Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections ». *Current opinion in microbiology* 16 (2): 221-27. https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.009.

Kim, Bohkyung, Ha-Neul Choi, et Jung-Eun Yim. 2019. « Effect of Diet on the Gut Microbiota Associated with Obesity ». *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome* 28 (4): 216-24. https://doi.org/10.7570/jomes.2019.28.4.216.

Kim, Hyun Jung, Dongeun Huh, Geraldine Hamilton, et Donald E. Ingber. 2012. « Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-like Motions and Flow ». *Lab on a Chip* 12 (12): 2165-74. https://doi.org/10.1039/c2lc40074j.

Kim, Hyun Jung, et Donald E. Ingber. 2013. « Gut-on-a-Chip Microenvironment Induces Human Intestinal Cells to Undergo Villus Differentiation ». *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 5 (9): 1130-40. https://doi.org/10.1039/c3ib40126j.

Kim, Jung Eun, et Hei Sung Kim. 2019. « Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (4). https://doi.org/10.3390/jcm8040444.

Kirker, Kelly R., et Garth A. James. 2017. « *In Vitro* Studies Evaluating the Effects of Biofilms on Wound-Healing Cells: A Review ». *APMIS* 125 (4): 344-52. https://doi.org/10.1111/apm.12678.

Kirker, Kelly R., Patrick R. Secor, Garth A. James, Philip Fleckman, John E. Olerud, et Philip S. Stewart. 2009. « Loss of Viability and Induction of Apoptosis in Human Keratinocytes Exposed to Staphylococcus Aureus Biofilms in Vitro ». *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17 (5): 690-99. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00523.x.

Klaassen, C. D., et J. Y. Cui. 2015. « Review: Mechanisms of How the Intestinal Microbiota Alters the Effects of Drugs and Bile Acids ». *Drug Metabolism and Disposition* 43 (10): 1505-21. https://doi.org/10.1124/dmd.115.065698.

Klancic, Teja, et Raylene A. Reimer. 2020. « Gut microbiota and obesity: Impact of antibiotics and prebiotics and potential for musculoskeletal health ». *Journal of Sport and Health Science* 9 (2): 110-18. https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.04.004.

Koch, R. L., E. J. Chrystal, B. B. Beaulieu, et P. Goldman. 1979. « Acetamide--a Metabolite of Metronidazole Formed by the Intestinal Flora ». *Biochemical Pharmacology* 28 (24): 3611-15. https://doi.org/10.1016/0006-2952(79)90407-6.

Koch, R. L., et P. Goldman. 1979. « The Anaerobic Metabolism of Metronidazole Forms N-(2-Hydroxyethyl)-Oxamic Acid ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 208 (3): 406-10.

Kofteridis, Diamantis P., Sofia Maraki, Ioanna Mixaki, Elpis Mantadakis, et George Samonis. 2004. « Impact of Prolonged Treatment with Trimethoprim-Sulfamethoxazole on the Human Gut Flora ». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 36 (10): 771-72. https://doi.org/10.1080/00365540410020956a.

Komura, Hiroshi, Motoko Yasuda, Nagahiro H. Yoshida, et Yuichi Sugiyama. 2002. « Species Difference in Nisoldipine Oxidation Activity in the Small Intestine ». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 17 (5): 427-36. https://doi.org/10.2133/dmpk.17.427.

Kong, Heidi H., et Julia A. Segre. 2012. « Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward ». *Journal of Investigative Dermatology* 132 (3): 933-39. https://doi.org/10.1038/jid.2011.417.

Koppel, Nitzan, Vayu Maini Rekdal, et Emily P. Balskus. 2017. « Chemical Transformation of Xenobiotics by the Human Gut Microbiota ». *Science* 356 (6344): eaag2770. https://doi.org/10.1126/science.aag2770.

Kostic, A. D., M. R. Howitt, et W. S. Garrett. 2013. « Exploring Host-Microbiota Interactions in Animal Models and Humans ». *Genes & Development* 27 (7): 701-18. https://doi.org/10.1101/gad.212522.112.

Krause, Jannike L., Sven-Bastiaan Haange, Stephanie S. Schäpe, Beatrice Engelmann, Ulrike Rolle-Kampczyk, Katarina Fritz-Wallace, Zhipeng Wang, et al. 2020. « The Glyphosate Formulation Roundup® LB plus Influences the Global Metabolome of Pig Gut Microbiota in Vitro ». *The Science of the Total Environment* 745 (novembre): 140932. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140932.

Krieken, D, T Ederveen, S Hijum, P Jansen, W Melchers, P Scheepers, J Schalkwijk, et P Zeeuwen. 2016. « An In Vitro Model for Bacterial Growth on Human Stratum Corneum ». *Acta Dermato Venereologica* 96 (7): 873-79. https://doi.org/10.2340/00015555-2401.

Krutmann, Jean. 2009. « Pre- and Probiotics for Human Skin ». *Journal of Dermatological Science* 54 (1): 1-5. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.01.002.

Kumar, Arun, Aiswarya Baruah, Masahiro Tomioka, Yuichi Iino, Mohan C. Kalita, et Mojibur Khan. 2020. « Caenorhabditis Elegans: A Model to Understand Host–Microbe Interactions ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 77 (7): 1229-49. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03319-7.

Kump, Patrizia K, Hans-Peter Gröchenig, Stefan Lackner, Slave Trajanoski, Gerhard Reicht, K Martin Hoffmann, Andrea Deutschmann, Heimo H Wenzl, Wolfgang Petritsch, et Guenter J Krejs. 2013. « Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis ». *Inflammatory bowel diseases* 19 (10): 2155-65.

Lagier, J-C, Fabrice Armougom, M Million, P Hugon, I Pagnier, C Robert, F Bittar, G Fournous, G Gimenez, et Marie Maraninchi. 2012. « Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study ». *Clinical Microbiology and Infection* 18 (12): 1185-93.

Lai, Yuping, Anna Di Nardo, Teruaki Nakatsuji, Anke Leichtle, Yan Yang, Anna L Cogen, Zi-Rong Wu, et al. 2009. « Commensal Bacteria Regulate Toll-like Receptor 3–Dependent Inflammation after Skin Injury ». *Nature Medicine* 15 (12): 1377-82. https://doi.org/10.1038/nm.2062.

Lakhssassi, N., et M. Sixou. 2005. « Variabilité de l'efficacité de l'érythromycine et de la spiramycine sur les pathogènes parodontaux dans les parodontites agressives. Étude in vitro comparative ». *Pathologie Biologie* 53 (8-9): 527-35. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2005.06.008.

Langan, Ewan A., Andreas Recke, Therezia Bokor-Billmann, Franck Billmann, Birgit K. Kahle, et Detlef Zillikens. 2020. « The Role of the Cutaneous Microbiome in Hidradenitis Suppurativa—Light at the End of the Microbiological Tunnel ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (4). https://doi.org/10.3390/ijms21041205.

Lange, Kathleen, Martin Buerger, Andreas Stallmach, et Tony Bruns. 2016. « Effects of Antibiotics on Gut Microbiota ». *Digestive Diseases* 34 (3): 260-68. https://doi.org/10.1159/000443360.

Lankelma, Jacqueline M, Duncan R Cranendonk, Clara Belzer, Alex F De Vos, Willem M De Vos, Tom Van Der Poll, et W Joost Wiersinga. 2017. « Antibiotic-induced gut microbiota disruption during human endotoxemia: a randomised controlled study ». *Gut* 66 (9): 1623-30.

Lapanje, Ales, Alexis Zrimec, Damjana Drobne, et Maja Rupnik. 2010. « Long-Term Hg Pollution-Induced Structural Shifts of Bacterial Community in the Terrestrial Isopod (Porcellio Scaber) Gut ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 158 (10): 3186-93. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.07.001.

Larcher, Simone, et Viviane Yargeau. 2011. « Biodegradation of Sulfamethoxazole by Individual and Mixed Bacteria ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (1): 211-18. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3257-8.

Lau, Jennifer T, Fiona J Whelan, Isiri Herath, Christine H Lee, Stephen M Collins, Premysl Bercik, et Michael G Surette. 2016a. « Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling ». *Genome medicine* 8 (1): 1-10. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0327-7.

Lauritsen, K., J. Hansen, M. Ryde, et J. Rask-Madsen. 1984. « Colonic Azodisalicylate Metabolism Determined by in Vivo Dialysis in Healthy Volunteers and Patients with Ulcerative Colitis ». *Gastroenterology* 86 (6): 1496-1500.

Laviña, M., C. Gaggero, et F. Moreno. 1990. « Microcin H47, a Chromosome-Encoded Microcin Antibiotic of Escherichia Coli. » *Journal of Bacteriology* 172 (11): 6585-88. https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6585-6588.1990.

Le Bastard, Quentin, Tonya Ward, Dimitri Sidiropoulos, Benjamin M Hillmann, Chan Lan Chun, Michael J Sadowsky, Dan Knights, et Emmanuel Montassier. 2018. « Fecal microbiota transplantation reverses antibiotic and chemotherapy-induced gut dysbiosis in mice ». *Scientific reports* 8 (1): 1-11.

« Le diabète en France en 2016 : état des lieux ». s. d. Consulté le 1 avril 2020. /liste-des-actualites/le-diabete-en-france-en-2016-etat-des-lieux.

Lee, Hyo Jung, Sang Eun Jeong, Soyoun Lee, Sungwoo Kim, Hyuntak Han, et Che Ok Jeon. 2018. « Effects of Cosmetics on the Skin Microbiome of Facial Cheeks with Different Hydration Levels ». *MicrobiologyOpen* 7 (2): e00557. https://doi.org/10.1002/mbo3.557.

Lee, Young Bok, Eun Jung Byun, et Hei Sung Kim. 2019. « Potential Role of the Microbiome in Acne: A Comprehensive Review ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (7). https://doi.org/10.3390/jcm8070987.

Lemoine, Lisa, Ralf Dieckmann, Sascha Al Dahouk, Szilvia Vincze, Andreas Luch, et Tewes Tralau. 2020. « Microbially Competent 3D Skin: A Test System That Reveals Insight into Host–Microbe Interactions and Their Potential Toxicological Impact ». *Archives of Toxicology* 94 (10): 3487-3502. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02841-z.

Li, Dongqing, Hu Lei, Zhiheng Li, Hongquan Li, Yue Wang, et Yuping Lai. 2013. « A Novel Lipopeptide from Skin Commensal Activates TLR2/CD36-P38 MAPK Signaling to Increase Antibacterial Defense against Bacterial Infection ». Édité par Bernhard Ryffel. *PLoS ONE* 8 (3): e58288. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058288.

Li, Houkai, Jiaojiao He, et Wei Jia. 2016. « The Influence of Gut Microbiota on Drug Metabolism and Toxicity ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 12 (1): 31-40. https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1121234.

Lima, Ana Carolina Delgado, Clara Cecatti, Melaine Priscila Fidélix, Maria Angela Tallarico Adorno, Isabel Kimiko Sakamoto, Thais Borges Cesar, et Katia Sivieri. 2019. « Effect of Daily Consumption of Orange Juice on the Levels of Blood Glucose, Lipids, and Gut Microbiota Metabolites: Controlled Clinical Trials ». *Journal of Medicinal Food* 22 (2): 202-10. https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0080.

Liu, Lin, Yinhu Li, Siliang Li, Ni Hu, Yimin He, Ray Pong, Danni Lin, Lihua Lu, et Maggie Law. 2012. « Comparison of Next-Generation Sequencing Systems ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012. https://doi.org/10.1155/2012/251364.

Lone, Abdul G., Erhan Atci, Ryan Renslow, Haluk Beyenal, Susan Noh, Boel Fransson, Nehal Abu-Lail, Jeong-Jin Park, David R. Gang, et Douglas R. Call. 2015. « Colonization of Epidermal Tissue by Staphylococcus aureus Produces Localized Hypoxia and Stimulates Secretion of Antioxidant and Caspase-14 Proteins ». *Infection and Immunity* 83 (8): 3026-34. https://doi.org/10.1128/IAI.00175-15.

Lozupone, Catherine A., Jesse I. Stombaugh, Jeffrey I. Gordon, Janet K. Jansson, et Rob Knight. 2012. « Diversity, Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota ». *Nature* 489 (7415): 220-30. https://doi.org/10.1038/nature11550.

Lu, Kun, Ridwan Mahbub, et James G. Fox. 2015. « Xenobiotics: Interaction with the Intestinal Microflora ». *ILAR Journal* 56 (2): 218-27. https://doi.org/10.1093/ilar/ilv018.

Lundberg, Randi. 2019. « Humanizing the Gut Microbiota of Mice: Opportunities and Challenges ». *Laboratory Animals* 53 (3): 244-51. https://doi.org/10.1177/0023677218787554.

M., Bader, Amin Thawabteh, et Rafik Karaman. 2014. « TARGETED PRODRUGS ». In , 139-76. https://doi.org/10.13140/2.1.3771.4249.

Ma, Bing, Larry J. Forney, et Jacques Ravel. 2012. « The vaginal microbiome: rethinking health and diseases ». *Annual review of microbiology* 66: 371-89. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150157.

Macpherson, Andrew J., et Nicola L. Harris. 2004. « Interactions between Commensal Intestinal Bacteria and the Immune System ». *Nature Reviews Immunology* 4 (6): 478-85. https://doi.org/10.1038/nri1373.

Maier, Lisa, Mihaela Pruteanu, Michael Kuhn, Georg Zeller, Anja Telzerow, Exene Erin Anderson, Ana Rita Brochado, Keith Conrad Fernandez, Hitomi Dose, Hirotada Mori, et al. 2018. « Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria ». *Nature* 555 (7698): 623-28. https://doi.org/10.1038/nature25979.

Mäkivuokko, Harri, Jussi Nurmi, Päivi Nurminen, Julian Stowell, et Nina Rautonen. 2005. « In Vitro Effects on Polydextrose by Colonic Bacteria and Caco-2 Cell Cyclooxygenase Gene

Expression ». *Nutrition and Cancer* 52 (1): 94-104. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5201_12.

Mangiola, Francesca, Gianluca Ianiro, Francesco Franceschi, Stefano Fagiuoli, Giovanni Gasbarrini, et Antonio Gasbarrini. 2016. « Gut microbiota in autism and mood disorders ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (1): 361-68. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.361.

Mariat, D, O Firmesse, F Levenez, VD Guimarães, H Sokol, J Doré, G Corthier, et J-P Furet. 2009. « The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age ». *BMC Microbiology* 9 (juin): 123. https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-123.

Martels, Julius ZH von, Mehdi Sadaghian Sadabad, Arno R Bourgonje, Tjasso Blokzijl, Gerard Dijkstra, Klaas Nico Faber, et Hermie JM Harmsen. 2017. « The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut ». *Anaerobe* 44: 3-12.

Martels, Julius Zweder Hubertus von. 2019. « Towards novel biomarkers and rational nutritional interventions in Inflammatory Bowel Disease ».

Martínez, Inés, James C. Stegen, Maria X. Maldonado-Gómez, A. Murat Eren, Peter M. Siba, Andrew R. Greenhill, et Jens Walter. 2015. « The Gut Microbiota of Rural Papua New Guineans: Composition, Diversity Patterns, and Ecological Processes ». *Cell Reports* 11 (4): 527-38. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049.

Marzorati, Massimo, Barbara Vanhoecke, Tine De Ryck, Mehdi Sadaghian Sadabad, Iris Pinheiro, Sam Possemiers, Pieter Van den Abbeele, et al. 2014a. « The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro ». *BMC Microbiology* 14 (mai): 133. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-133.

Mas-Lloret, Joan, Mireia Obón-Santacana, Gemma Ibáñez-Sanz, Elisabet Guinó, Miguel L. Pato, Francisco Rodriguez-Moranta, Alfredo Mata, Ana García-Rodríguez, Victor Moreno, et Ville Nikolai Pimenoff. 2020. « Gut Microbiome Diversity Detected by High-Coverage 16S and Shotgun Sequencing of Paired Stool and Colon Sample ». *Scientific Data* 7 (1): 92. https://doi.org/10.1038/s41597-020-0427-5.

Mata, L. J., C. Carrillo, et E. Villatoro. 1969. « Fecal Microflora in Health Persons in a Preindustrial Region ». *Applied Microbiology* 17 (4): 596-602.

Mathieu, Alban, Timothy M. Vogel, et Pascal Simonet. 2014. « The Future of Skin Metagenomics ». *Research in Microbiology* 165 (2): 69-76. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.12.002.

Matsunaga, Nozomu, Haruka Shimizu, Kanako Fujimoto, Kanako Watanabe, Tsutomu Yamasaki, Naoya Hatano, Eiji Tamai, Seiichi Katayama, et Yasuo Hitsumoto. 2018. « Expression of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase on the Surface of Clostridium Perfringens Cells ». *Anaerobe* 51 (juin): 124-30. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.05.001.

Matwiejczuk, Natalia, Anna Galicka, et Małgorzata M. Brzóska. 2020. « Review of the Safety of Application of Cosmetic Products Containing Parabens ». *Journal of Applied Toxicology* 40 (1): 176-210. https://doi.org/10.1002/jat.3917.

McFarland, L.V. 1998. « Epidemiology, Risk Factors and Treatments for Antibiotic-Associated Diarrhea ». *Digestive Diseases* 16 (5): 292-307. https://doi.org/10.1159/000016879.

McKernan, K. J., H. E. Peckham, G. L. Costa, S. F. McLaughlin, Y. Fu, E. F. Tsung, C. R. Clouser, et al. 2009. « Sequence and Structural Variation in a Human Genome Uncovered by Short-Read, Massively Parallel Ligation Sequencing Using Two-Base Encoding ». *Genome Research* 19 (9): 1527-41. https://doi.org/10.1101/gr.091868.109.

MetaHIT Consortium, Junjie Qin, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, et al. 2010. « A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59-65. https://doi.org/10.1038/nature08821.

Miller, Aaron W., Teri Orr, Denise Dearing, et Manoj Monga. 2019. « Loss of Function Dysbiosis Associated with Antibiotics and High Fat, High Sugar Diet ». *The ISME Journal* 13 (6): 1379-90. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0357-4.

Minekus, M., M. Smeets-Peeters, A. Bernalier, S. Marol-Bonnin, R. Havenaar, P. Marteau, M. Alric, G. Fonty, et J. H. J. Huis in't Veld. 1999. « A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (1): 108-14. https://doi.org/10.1007/s002530051622.

Minekus, Mans, Phillipe Marteau, Robert Havenaar, et Jos H.J. Huis in't Veld. 1995. « A Multicompartmental Dynamic Computer-Controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine ». *Alternatives to Laboratory Animals* 23 (2): 197-209. https://doi.org/10.1177/026119299502300205.

Modi, Sheetal R., James J. Collins, et David A. Relman. 2014. « Antibiotics and the Gut Microbiota ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (10): 4212-18. https://doi.org/10.1172/JCI72333.

Mokni, Mourad, et Sonia Abdelhak. 2014. « 1 - Flore cutanée, microbiote et microbiome ». In *Dermatologie infectieuse*, édité par Mourad Mokni, Nicolas Dupin, et Pascal del Giuduce, 1-4. Paris: Elsevier Masson. https://doi.org/10.1016/B978-2-294-73284-3.00001-6.

Molly, K., M. Vande Woestyne, et W. Verstraete. 1993. « Development of a 5-Step Multi-Chamber Reactor as a Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (2): 254-58. https://doi.org/10.1007/BF00228615.

Monneret, Claude. 2017. « What Is an Endocrine Disruptor? » *Comptes Rendus Biologies* 340 (9-10): 403-5. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.004.

Montandon, Sophie A, et François R Jornayvaz. 2017. « Effects of antidiabetic drugs on gut microbiota composition ». *Genes* 8 (10): 250.

Moura, Ines B., Anthony M. Buckley, Duncan Ewin, Sharie Shearman, Emma Clark, Mark H. Wilcox, et Caroline H. Chilton. 2019. « Omadacycline Gut Microbiome Exposure Does Not Induce Clostridium Difficile Proliferation or Toxin Production in a Model That Simulates the Proximal, Medial, and Distal Human Colon ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (2). https://doi.org/10.1128/AAC.01581-18.

Mueller, Susanne, Katiana Saunier, Christiana Hanisch, Elisabeth Norin, Livia Alm, Tore Midtvedt, Alberto Cresci, et al. 2006. « Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations in Relation to Age, Gender, and Country: a Cross-Sectional Study ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1027-33. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006.

Mullaney, Jane A., Juliette E. Stephens, Mary-Ellen Costello, Cai Fong, Brooke E. Geeling, Patrick G. Gavin, Casey M. Wright, Timothy D. Spector, Matthew A. Brown, et Emma E. Hamilton-Williams. 2018. « Type 1 diabetes susceptibility alleles are associated with distinct alterations in the gut microbiota ». *Microbiome* 6 (1): 35. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0417-4.

Mullish, Benjamin H., et Horace Rt Williams. 2018. « Clostridium Difficile Infection and Antibiotic-Associated Diarrhoea ». *Clinical Medicine (London, England)* 18 (3): 237-41. https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-237.

Myles, Ian A., Kelli W. Williams, Jensen D. Reckhow, Momodou L. Jammeh, Nathan B. Pincus, Inka Sastalla, Danial Saleem, Kelly D. Stone, et Sandip K. Datta. 2016. « Transplantation of Human Skin Microbiota in Models of Atopic Dermatitis ». *JCI Insight* 1 (10). https://doi.org/10.1172/jci.insight.86955.

Nagy, E., L. Boyanova, et U.S. Justesen. 2018. « How to Isolate, Identify and Determine Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria in Routine Laboratories ». *Clinical Microbiology and Infection* 24 (11): 1139-48. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.008.

Nagy, E., W. R. Heizmann, et H. Werner. 1991. « Effect of Daptomycin, Metronidazole and Mezlocillin Combinations on Mixed Bacterial Cultures Involving Facultative and Anaerobic Bacteria ». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 23 (2): 239-45. https://doi.org/10.3109/00365549109023407.

Nagy, Elisabeth, J Sóki, Edit Urbán, Ildikó Szőke, Eleonóra Fodor, et R Edwards. 2001. « Occurrence of metronidazole and imipenem resistance among Bacteroides fragilis group clinical isolates in Hungary ». *Acta Biologica Hungarica* 52 (2-3): 271-80.

Nagy, István, Andor Pivarcsi, Kornélia Kis, Andrea Koreck, László Bodai, Andrew McDowell, Holger Seltmann, Sheila Patrick, Christos C. Zouboulis, et Lajos Kemény. 2006. « Propionibacterium Acnes and Lipopolysaccharide Induce the Expression of Antimicrobial Peptides and Proinflammatory Cytokines/Chemokines in Human Sebocytes ». *Microbes and Infection* 8 (8): 2195-2205. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.001.

Naik, Shruti, Nicolas Bouladoux, Jonathan L. Linehan, Seong-Ji Han, Oliver J. Harrison, Christoph Wilhelm, Sean Conlan, et al. 2015. « Commensal–Dendritic-Cell Interaction Specifies a Unique Protective Skin Immune Signature ». *Nature* 520 (7545): 104-8. https://doi.org/10.1038/nature14052.

Narimani, T., M. Douraghi, P. Owlia, A. Rastegar, M. Esghaei, B. Nasr, et M. Talebi. 2016a. « Heterogeneity in Resistant Fecal Bacteroides Fragilis Group Collected from Healthy People ». *Microbial Pathogenesis* 95 (juin): 1-6. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.017.

Nectoux, Alexia M., Chizumi Abe, Shu-Wei Huang, Naoto Ohno, Junji Tabata, Yuji Miyata, Kazunari Tanaka, Takashi Tanaka, Haruo Yamamura, et Toshiro Matsui. 2019. « Absorption and Metabolic Behavior of Hesperidin (Rutinosylated Hesperetin) after Single Oral Administration to Sprague-Dawley Rats ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (35): 9812-19. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03594.

Nguyen, Romario, Sarah Da Won Bae, Gang Zhou, Scott A Read, Golo Ahlenstiel, Jacob George, et Liang Qiao. 2020. « Application of organoids in translational research of human diseases with a particular focus on gastrointestinal cancers ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1873 (2): 188350.

Nguyen, T. L. A., S. Vieira-Silva, A. Liston, et J. Raes. 2015. « How Informative Is the Mouse for Human Gut Microbiota Research? » *Disease Models & Mechanisms* 8 (1): 1-16. https://doi.org/10.1242/dmm.017400.

Nguyen, Thanh Tra, Thu Thuy Pham, Michael Packianather, et Chi Hieu Le. 2019. « Molecular screening and genetic diversity analysis of anticancer Azurin-encoding and Azurin-like genes in human gut microbiome deduced through cultivation-dependent and cultivation-independent studies ». *International Microbiology* 22 (4): 437-49.

Nicolopoulou-Stamati, Polyxeni, Luc Hens, et Annie J. Sasco. 2015. « Cosmetics as Endocrine Disruptors: Are They a Health Risk? » *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 16 (4): 373-83. https://doi.org/10.1007/s11154-016-9329-4.

Niehues, Hanna, Joke A. Bouwstra, Abdoelwaheb El Ghalbzouri, Johanna M. Brandner, Patrick L. J. M. Zeeuwen, et Ellen H. van den Bogaard. 2018. « 3D Skin Models for 3R Research: The Potential of 3D Reconstructed Skin Models to Study Skin Barrier Function ». *Experimental Dermatology* 27 (5): 501-11. https://doi.org/10.1111/exd.13531.

Niestępski, Sebastian, Monika Harnisz, Ewa Korzeniewska, Ma Guadalupe Aguilera-Arreola, Araceli Contreras-Rodríguez, Zofia Filipkowska, et Adriana Osińska. 2019. « The emergence of antimicrobial resistance in environmental strains of the Bacteroides fragilis group ». *Environment international* 124: 408-19.

Nishida, Atsushi, Ryo Inoue, Osamu Inatomi, Shigeki Bamba, Yuji Naito, et Akira Andoh. 2018. « Gut Microbiota in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease ». *Clinical Journal of Gastroenterology* 11 (1): 1-10. https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5.

Noel, Alan R., Karen E. Bowker, et Alasdair P. MacGowan. 2005a. « Pharmacodynamics of Moxifloxacin against Anaerobes Studied in an In Vitro Pharmacokinetic Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (10): 4234-39. https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4234-4239.2005.

Noto, Daisuke, et Sachiko Miyake. 2020. « Gut Dysbiosis and Multiple Sclerosis ». *Clinical Immunology*, mars, 108380. https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108380.

« Obésité ». s. d. Inserm - La science pour la santé. Consulté le 1 avril 2020. https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/obesite.

Oda, Shingo, Ryoichi Fujiwara, Yuki Kutsuno, Tatsuki Fukami, Tomoo Itoh, Tsuyoshi Yokoi, et Miki Nakajima. 2015. « Targeted Screen for Human UDP-Glucuronosyltransferases Inhibitors and

the Evaluation of Potential Drug-Drug Interactions with Zafirlukast ». *Drug Metabolism and Disposition* 43 (6): 812-18. https://doi.org/10.1124/dmd.114.062141.

Ouwerkerk, J.P., S. Aalvink, C. Belzer, et W.M. De Vos. 2017. « Preparation and Preservation of Viable *Akkermansia Muciniphila* Cells for Therapeutic Interventions ». *Beneficial Microbes* 8 (2): 163-69. https://doi.org/10.3920/BM2016.0096.

Ovesen, Agnes Louise, Miia Riihimäki, Viveca Båverud, et Märit Pringle. 2016. « Antimicrobial Susceptibility of Bacteroides Spp. From Clinical Samples From Horses ». *Journal of Equine Veterinary Science* 45 (octobre): 46-52. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.073.

Panda, Suchita, Ismail El khader, Francesc Casellas, Josefa López Vivancos, Montserrat García Cors, Alba Santiago, Silvia Cuenca, Francisco Guarner, et Chaysavanh Manichanh. 2014a. « Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota ». Édité par Paul D. Cotter. *PLoS ONE* 9 (4): e95476. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095476.

Panebianco, Concetta, Angelo Andriulli, et Valerio Pazienza. 2018. « Pharmacomicrobiomics: exploiting the drug-microbiota interactions in anticancer therapies ». *Microbiome* 6 (mai). https://doi.org/10.1186/s40168-018-0483-7.

Panek, Marina, Hana Čipčić Paljetak, Anja Barešić, Mihaela Perić, Mario Matijašić, Ivana Lojkić, Darija Vranešić Bender, Željko Krznarić, et Donatella Verbanac. 2018. « Methodology Challenges in Studying Human Gut Microbiota – Effects of Collection, Storage, DNA Extraction and next Generation Sequencing Technologies ». *Scientific Reports* 8 (1): 5143. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23296-4.

Patrick De Boever, Willy Verstraete, Roel Wouters, Vanessa Vermeirssen, Nico Boon. 2001. « Development of a Six-Stage Culture System for Simulating the Gastrointestinal Microbiota of Weaned Infants ». *Microbial Ecology in Health and Disease* 13 (2): 111-23. https://doi.org/10.1080/08910600118539.

Patzer, S. I., M. R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno, et K. Hantke. 2003. « The Colicin G, H and X Determinants Encode Microcins M and H47, Which Might Utilize the Catecholate Siderophore Receptors FepA, Cir, Fiu and IroN ». *Microbiology (Reading, England)* 149 (Pt 9): 2557-70. https://doi.org/10.1099/mic.0.26396-0.

Pérez-Cobas, Ana Elena, Alejandro Artacho, Henrik Knecht, María Loreto Ferrús, Anette Friedrichs, Stephan J. Ott, Andrés Moya, Amparo Latorre, et María José Gosalbes. 2013. « Differential Effects of Antibiotic Therapy on the Structure and Function of Human Gut Microbiota ». Édité par Ramy K. Aziz. *PLoS ONE* 8 (11): e80201. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080201.

Perl, T. M., et J. E. Golub. 1998. « New Approaches to Reduce Staphylococcus Aureus Nosocomial Infection Rates: Treating S. Aureus Nasal Carriage ». *The Annals of Pharmacotherapy* 32 (1): S7-16. https://doi.org/10.1177/106002809803200104.

Perleberg, Carolin, Alexander Kind, et Angelika Schnieke. 2018. « Genetically engineered pigs as models for human disease ». *Disease Models & Mechanisms* 11 (1). https://doi.org/10.1242/dmm.030783.

Peterson, Jane, Susan Garges, Maria Giovanni, Pamela McInnes, Lu Wang, Jeffery A. Schloss, Vivien Bonazzi, et al. 2009. « The NIH Human Microbiome Project ». *Genome Research* 19 (12): 2317-23. https://doi.org/10.1101/gr.096651.109.

Pierson, M. D., L. A. Smoot, et K. R. Vantassell. 1980. « Inhibition of Salmonella Typhimurium and Staphylococcus Aureus by Butylated Hydroxyanisole and the Propyl Ester of P-Hydroxybenzoic Acid ». *Journal of Food Protection* 43 (3): 191-94. https://doi.org/10.4315/0362-028X-43.3.191.

Pilla, Rachel, Frederic P. Gaschen, James W. Barr, Erin Olson, Julia Honneffer, Blake C. Guard, Amanda B. Blake, et al. 2020. « Effects of Metronidazole on the Fecal Microbiome and Metabolome in Healthy Dogs ». *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34 (5): 1853-66. https://doi.org/10.1111/jvim.15871.

Pittayanon, Rapat, Jennifer T. Lau, Grigorios I. Leontiadis, Frances Tse, Yuhong Yuan, Michael Surette, et Paul Moayyedi. 2020. « Differences in Gut Microbiota in Patients With vs Without

Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review ». *Gastroenterology* 158 (4): 930-946.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.294.

Poceviciute, Roberta, et Rustem F. Ismagilov. 2019. « Human-Gut-Microbiome on a Chip ». *Nature Biomedical Engineering* 3 (7): 500-501. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0425-0.

Pop, Mihai, Alan W Walker, Joseph Paulson, Brianna Lindsay, Martin Antonio, M Anowar Hossain, Joseph Oundo, et al. 2014. « Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition ». *Genome Biology* 15 (6): R76. https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-6-r76.

Privitera, G., A. Dublanchet, et Madeleine Sebald. 1979. « Transfer of Multiple Antibiotic Resistance between Subspecies of Bacteroides fragilis ». *The Journal of Infectious Diseases* 139 (1): 97-101. https://doi.org/10.1093/infdis/139.1.97.

Pushpanathan, Premalatha, Gifty Sara Mathew, Sribal Selvarajan, Krishna G. Seshadri, et Padma Srikanth. 2019. « Gut Microbiota and Its Mysteries ». *Indian Journal of Medical Microbiology* 37 (2): 268. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_373.

Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. « A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing ». *Nature* 464 (7285): 59-65. https://doi.org/10.1038/nature08821.

Rademacher, Franziska, Maren Simanski, Regine Gläser, et Jürgen Harder. 2018. « Skin Microbiota and Human 3D Skin Models ». *Experimental Dermatology* 27 (5): 489-94. https://doi.org/10.1111/exd.13517.

Raemsch, K. D., et J. Sommer. 1983. « Pharmacokinetics and Metabolism of Nifedipine ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 5 (4 Pt 2): II18-24. https://doi.org/10.1161/01.hyp.5.4_pt_2.ii18.

Rafii, F., et C. E. Cerniglia. 1993. « Comparison of the Azoreductase and Nitroreductase from Clostridium Perfringens ». *Applied and Environmental Microbiology* 59 (6): 1731-34. https://doi.org/10.1128/AEM.59.6.1731-1734.1993.

Ramasamy, S., E. Barnard, T.L. Dawson, et H. Li. 2019a. « The Role of the Skin Microbiota in Acne Pathophysiology ». *British Journal of Dermatology* 181 (4): 691-99. https://doi.org/10.1111/bjd.18230.

« RÈGLEMENT (UE) No 358/2014 DE LA COMMISSION - du 9 avril 2014 - modifiant les annexes II et V du règlement (CE) no 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques - ». s. d., 5.

« Reglementation des produits cosmetiques ». 2014, 23.

Rehman, Ateequr, Femke-Anouska Heinsen, Marjorie E Koenen, Koen Venema, Henrik Knecht, Stephan Hellmig, Stefan Schreiber, et Stephan J Ott. 2012. « Effects of Probiotics and Antibiotics on the Intestinal Homeostasis in a Computer Controlled Model of the Large Intestine ». *BMC Microbiology* 12 (1): 47. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-47.

Reid, Gregor, Jeffrey Howard, et Bing Siang Gan. 2001. « Can Bacterial Interference Prevent Infection? » *Trends in Microbiology* 9 (9): 424-28. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02132-1.

Relman, David A. 2012. « The human microbiome: ecosystem resilience and health ». *Nutrition reviews* 70 (suppl_1): S2-9.

Rettedal, Elizabeth A, Heidi Gumpert, et Morten OA Sommer. 2014. « Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria ». *Nature communications* 5 (1): 1-9.

Rheinwatd, James G., et Howard Green. 1975. « Seria Cultivation of Strains of Human Epidemal Keratinocytes: The Formation Keratinizin Colonies from Single Cell Is ». *Cell* 6 (3): 331-43. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(75)80001-8.

Ribière, Céline, Pierre Peyret, Nicolas Parisot, Claude Darcha, Pierre J. Déchelotte, Nicolas Barnich, Eric Peyretaillade, et Delphine Boucher. 2016. « Oral Exposure to Environmental Pollutant Benzo[a]Pyrene Impacts the Intestinal Epithelium and Induces Gut Microbial Shifts in Murine Model ». *Scientific Reports* 6 (1): 31027. https://doi.org/10.1038/srep31027.

Ridlon, Jason M., Dae-Joong Kang, et Phillip B. Hylemon. 2006. « Bile Salt Biotransformations by Human Intestinal Bacteria ». *Journal of Lipid Research* 47 (2): 241-59. https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200.

Rijk, M. C., R. A. van Hogezand, A. van Schaik, et J. H. van Tongeren. 1989. « Disposition of 5-Aminosalicylic Acid from 5-Aminosalicylic Acid-Delivering Drugs during Accelerated Intestinal Transit in Healthy Volunteers ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 24 (10): 1179-85. https://doi.org/10.3109/00365528909090784.

Rimoldi, Simona, Genciana Terova, Chiara Ascione, Riccardo Giannico, et Fabio Brambilla. s. d. « Next Generation Sequencing for Gut Microbiome Characterization in Rainbow Trout (Oncorhynchus Mykiss) Fed Animal by-Product Meals as an Alternative to Fishmeal Protein Sources », 29.

Ring, Hans Christian, et Lennart Emtestam. 2016. « The Microbiology of Hidradenitis Suppurativa ». *Dermatologic Clinics* 34 (1): 29-35. https://doi.org/10.1016/j.det.2015.08.010.

Rinninella, Emanuele, Marco Cintoni, Pauline Raoul, Loris Riccardo Lopetuso, Franco Scaldaferri, Gabriele Pulcini, Giacinto Abele Donato Miggiano, Antonio Gasbarrini, et Maria Cristina Mele. 2019. « Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition ». *Nutrients* 11 (10). https://doi.org/10.3390/nu11102393.

Rinninella, Emanuele, Pauline Raoul, Marco Cintoni, Francesco Franceschi, Giacinto Abele Donato Miggiano, Antonio Gasbarrini, et Maria Cristina Mele. 2019. « What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases ». *Microorganisms* 7 (1). https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014.

Ronaghi, Mostafa, Samer Karamohamed, Bertil Pettersson, Mathias Uhlén, et Pål Nyrén. 1996. « Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release ». *Analytical Biochemistry* 242 (1): 84-89. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432.

Rosenfield, Robert L., Alex Kentsis, Dianne Deplewski, et Nancy Ciletti. 1999. « Rat Preputial Sebocyte Differentiation Involves Peroxisome Proliferator-Activated Receptors11Preliminary Reports Were Presented at IV International Dermatology Symposium, April 11 1997, Berlin; Biomedicine '97, April 25 1997, Washington, DC; and The Midwest Society for Pediatric Research, Chicago, September 25 1997. » *Journal of Investigative Dermatology* 112 (2): 226-32. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00487.x.

Rosshart, Stephan P., Jasmin Herz, Brian G. Vassallo, Ashli Hunter, Morgan K. Wall, Jonathan H. Badger, John A. McCulloch, et al. 2019. « Laboratory Mice Born to Wild Mice Have Natural Microbiota and Model Human Immune Responses ». *Science* 365 (6452). https://doi.org/10.1126/science.aaw4361.

Rothberg, Jonathan M., Wolfgang Hinz, Todd M. Rearick, Jonathan Schultz, William Mileski, Mel Davey, John H. Leamon, et al. 2011. « An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-Optical Genome Sequencing ». *Nature* 475 (7356): 348-52. https://doi.org/10.1038/nature10242.

Routledge, E. J., J. Parker, J. Odum, J. Ashby, et J. P. Sumpter. 1998. « Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 153 (1): 12-19. https://doi.org/10.1006/taap.1998.8544.

Rufener, W. H., W. O. Nelson, et M. J. Wolin. 1963. « Maintenance of the Rumen Microbial Population in Continuous Culture ». *Applied Microbiology* 11 (mai): 196-201.

Ruocco, Eleonora, Giovanna Donnarumma, Adone Baroni, et Maria Antonietta Tufano. 2007. « Bacterial and Viral Skin Diseases ». *Dermatologic Clinics* 25 (4): 663-76. https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.008.

Saitta, Kyle S., Carmen Zhang, Kang Kwang Lee, Kazunori Fujimoto, Matthew R. Redinbo, et Urs A. Boelsterli. 2014. « Bacterial β-Glucuronidase Inhibition Protects Mice against Enteropathy Induced by Indomethacin, Ketoprofen or Diclofenac: Mode of Action and Pharmacokinetics ». *Xenobiotica* 44 (1): 28-35. https://doi.org/10.3109/00498254.2013.811314.

Sala-Cunill, A, M Lazaro, L Herráez, Md Quiñones, M Moro-Moro, et I Sanchez. 2018. « Basic Skin Care and Topical Therapies for Atopic Dermatitis: Essential Approaches and Beyond ». *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 28 (6): 379-91. https://doi.org/10.18176/jiaci.0293.

Salim, Saad Y., Gilaad G. Kaplan, et Karen L. Madsen. 2014. « Air Pollution Effects on the Gut Microbiota: A Link between Exposure and Inflammatory Disease ». *Gut Microbes* 5 (2): 215-19. https://doi.org/10.4161/gmic.27251.

Samarkos, Michael, Elpida Mastrogianni, et Olga Kampouropoulou. 2018. « The Role of Gut Microbiota in Clostridium Difficile Infection ». *European Journal of Internal Medicine* 50: 28-32. https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.02.006.

Sanford, James A., et Richard L. Gallo. 2013a. « Functions of the Skin Microbiota in Health and Disease ». *Seminars in Immunology* 25 (5): 370-77. https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.005.

SanMiguel, Adam J., Jacquelyn S. Meisel, Joseph Horwinski, Qi Zheng, et Elizabeth A. Grice. 2017. « Topical Antimicrobial Treatments Can Elicit Shifts to Resident Skin Bacterial Communities and Reduce Colonization by Staphylococcus Aureus Competitors ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (9). https://doi.org/10.1128/AAC.00774-17.

Savin, Ziv, Shaye Kivity, Hagith Yonath, et Shoenfeld Yehuda. 2018. « Smoking and the Intestinal Microbiome ». *Archives of Microbiology* 200 (5): 677-84. https://doi.org/10.1007/s00203-018-1506-2.

Scharschmidt, Tiffany C., Kimberly S. Vasquez, Hong-An Truong, Sofia V. Gearty, Mariela L. Pauli, Audrey Nosbaum, Iris K. Gratz, et al. 2015. « A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes ». *Immunity* 43 (5): 1011-21. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.016.

Schirmer, Melanie, Ashley Garner, Hera Vlamakis, et Ramnik J. Xavier. 2019. « Microbial Genes and Pathways in Inflammatory Bowel Disease ». *Nature Reviews Microbiology* 17 (8): 497-511. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6.

Schloissnig, Siegfried, Manimozhiyan Arumugam, Shinichi Sunagawa, Makedonka Mitreva, Julien Tap, Ana Zhu, Alison Waller, et al. 2013a. « Genomic variation landscape of the human gut microbiome ». *Nature* 493 (7430): 45-50. https://doi.org/10.1038/nature11711.

Schommer, Nina N., et Richard L. Gallo. 2013a. « Structure and function of the human skin microbiome ». *Trends in microbiology* 21 (12): 660-68. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.10.001.

Schumacher, Ulrike K., et Bernd Single. 1998. « Susceptibility of the Anaerobic Gram-Negative Non-Sporulating Rod, Bilophila Wadsworthia to Beta-Lactams, Beta-Lactamase Inhibitors, Meropenem, Metronidaz ». *Zentralblatt Für Bakteriologie* 287 (4): 421-25. https://doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80179-5.

Selber-Hnatiw, Susannah, Tarin Sultana, W Tse, Niki Abdollahi, Sheyar Abdullah, Jalal Al Rahbani, Diala Alazar, Nekoula Jean Alrumhein, Saro Aprikian, et Rimsha Arshad. 2020. « Metabolic networks of the human gut microbiota ». *Microbiology* 166 (2): 96-119.

Senghor, Bruno, Cheikh Sokhna, Raymond Ruimy, et Jean-Christophe Lagier. 2018. « Gut Microbiota Diversity According to Dietary Habits and Geographical Provenance ». *Human Microbiome Journal* 7-8 (avril): 1-9. https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.01.001.

Shah, Pranjul, Joelle Fritz, Matt Estes, Frederic Zenhausern, et Paul Wilmes. 2014. « HuMiX: A microfluidics-based in vitro co-culture device for investigating host-microbe molecular interactions ». In , 300-302. Chemical and Biological Microsystems Society.

Shao, Yan, Samuel C. Forster, Evdokia Tsaliki, Kevin Vervier, Angela Strang, Nandi Simpson, Nitin Kumar, et al. 2019. « Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonisation in caesarean section birth ». *Nature* 574 (7776): 117-21. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1560-1.

Shu, Y. Z., D. G. Kingston, R. L. Van Tassell, et T. D. Wilkins. 1991. « Metabolism of Levamisole, an Anti-Colon Cancer Drug, by Human Intestinal Bacteria ». *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 21 (6): 737-50. https://doi.org/10.3109/00498259109039513.

Sikalidis, Angelos K., et Adeline Maykish. 2020. « The Gut Microbiome and Type 2 Diabetes Mellitus: Discussing A Complex Relationship ». *Biomedicines* 8 (1): 8. https://doi.org/10.3390/biomedicines8010008.

Silverman, Justin D, Heather K Durand, Rachael J Bloom, Sayan Mukherjee, et Lawrence A David. 2018. « Dynamic linear models guide design and analysis of microbiota studies within artificial human guts ». *Microbiome* 6 (1): 1-20.

Slyter, L. L., W. O. Nelson, et M. J. Wolin. 1964. « Modifications of a Device for Maintenance of the Rumen Microbial Population in Continuous Culture ». *Applied Microbiology* 12 (4): 374-77.

Smits, Jos P. H., Thomas H. A. Ederveen, Gijs Rikken, Noa J. M. van den Brink, Ivonne M. J. J. van Vlijmen-Willems, Jos Boekhorst, Marijke Kamsteeg, et al. 2020. « Targeting the Cutaneous Microbiota in Atopic Dermatitis by Coal Tar via AHR-Dependent Induction of Antimicrobial Peptides ». *The Journal of Investigative Dermatology* 140 (2): 415-424.e10. https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.142.

Sommer, Morten OA. 2015. « Advancing gut microbiome research using cultivation ». *Current opinion in microbiology* 27: 127-32.

Song, Mingyang, Andrew T. Chan, et Jun Sun. 2020. « Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer ». *Gastroenterology* 158 (2): 322-40. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.048.

Song, Se Jin, Christian Lauber, Elizabeth K Costello, Catherine A Lozupone, Gregory Humphrey, Donna Berg-Lyons, J Gregory Caporaso, et al. 2013. « Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs ». Édité par Detlef Weigel. *eLife* 2 (avril): e00458. https://doi.org/10.7554/eLife.00458.

Song, Yuli, Chengxu Liu, Julia Lee, Mauricio Bolaňos, Marja-Liisa Vaisanen, et Sydney M Finegold. 2005. « "Bacteroides goldsteinii sp. nov." isolated from clinical specimens of human intestinal origin ». *Journal of clinical microbiology* 43 (9): 4522-27.

Sousa, Tiago, Ronnie Paterson, Vanessa Moore, Anders Carlsson, Bertil Abrahamsson, et Abdul W. Basit. 2008a. « The Gastrointestinal Microbiota as a Site for the Biotransformation of Drugs ». *International Journal of Pharmaceutics* 363 (1-2): 1-25. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.009.

Sparber, Florian, et Salomé LeibundGut-Landmann. 2019. « Infecting Mice with Malassezia Spp. to Study the Fungus-Host Interaction ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 153 (novembre): 60175. https://doi.org/10.3791/60175.

Spurlock, Michael E., et Nicholas K. Gabler. 2008. « The Development of Porcine Models of Obesity and the Metabolic Syndrome ». *The Journal of Nutrition* 138 (2): 397-402. https://doi.org/10.1093/jn/138.2.397.

Staudinger, T., A. Pipal, et B. Redl. 2011. « Molecular Analysis of the Prevalent Microbiota of Human Male and Female Forehead Skin Compared to Forearm Skin and the Influence of Make-Up ». *Journal of Applied Microbiology* 110 (6): 1381-89. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04991.x.

Steczko, Janusz, Stephen R. Ash, Lloyd Brewer, et Al Guillem. 2010. « In Vitro and in Vivo Evaluation of Efficacy of Citrate/Methylene Blue/Parabens/IPA Solution as a Skin Disinfectant ». *The Journal of Infection* 60 (1): 36-43. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.09.013.

Stehlikova, Zuzana, Klara Kostovcikova, Miloslav Kverka, Pavel Rossmann, Jiri Dvorak, Iva Novosadova, Martin Kostovcik, et al. 2019. « Crucial Role of Microbiota in Experimental Psoriasis Revealed by a Gnotobiotic Mouse Model ». *Frontiers in Microbiology* 10 (février): 236. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00236.

Steinway, Steven N., Jad Saleh, Bon-Kyoung Koo, Delphine Delacour, et Deok-Ho Kim. 2020. « Human Microphysiological Models of Intestinal Tissue and Gut Microbiome ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00725.

Stringer, Andrea M, Rachel J Gibson, Richard M Logan, Joanne M Bowen, SJ Yeoh, et Dorothy MK Keefe. 2009. « Faecal Microflora and β-Glucuronidase Expression Are Altered in an Irinotecan-Induced Diarrhea Model » 7 (12): 8.

Suez, Jotham, Niv Zmora, Gili Zilberman-Schapira, Uria Mor, Mally Dori-Bachash, Stavros Bashiardes, Maya Zur, et al. 2018. « Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired

by Probiotics and Improved by Autologous FMT ». *Cell* 174 (6): 1406-1423.e16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047.

Sun, Chaonan, Ling Chen, et Zhu Shen. 2019. « Mechanisms of Gastrointestinal Microflora on Drug Metabolism in Clinical Practice ». *Saudi Pharmaceutical Journal* 27 (8): 1146-56. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.09.011.

Sung, Jaeyun, Seunghyeon Kim, Josephine Jill T Cabatbat, Sungho Jang, Yong-Su Jin, Gyoo Yeol Jung, Nicholas Chia, et Pan-Jun Kim. 2017. « Global metabolic interaction network of the human gut microbiota for context-specific community-scale analysis ». *Nature communications* 8 (1): 1-12.

Tang, W. H. Wilson, Takeshi Kitai, et Stanley L. Hazen. 2017. « Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease ». *Circulation Research* 120 (7): 1183-96. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.

Tap, Julien, Stanislas Mondot, Florence Levenez, Eric Pelletier, Christophe Caron, Jean-Pierre Furet, Edgardo Ugarte, et al. 2009. « Towards the Human Intestinal Microbiota Phylogenetic Core ». *Environmental Microbiology* 11 (10): 2574-84. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.

Tavares, Renata S., Fátima C. Martins, Paulo J. Oliveira, João Ramalho-Santos, et Francisco P. Peixoto. 2009. « Parabens in Male Infertility-Is There a Mitochondrial Connection? » *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 27 (1): 1-7. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.10.002.

« Technology and Application of Gut-on-Chip ». s. d. Wiley Analytical Science. Consulté le 3 novembre 2020. https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitlab.19000.

Teng, Lee-Jene, Po-Ren Hsueh, Jui-Chang Tsai, Shwu-Jen Liaw, Shen-Wu Ho, et Kwen-Tay Luh. 2002. « High incidence of cefoxitin and clindamycin resistance among anaerobes in Taiwan ». *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46 (9): 2908-13.

The Human Microbiome Project Consortium. 2012. « Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome ». *Nature* 486 (7402): 207-14. https://doi.org/10.1038/nature11234.

Thiemann, Sophie, Nathiana Smit, et Till Strowig. 2016a. « Antibiotics and the Intestinal Microbiome : Individual Responses, Resilience of the Ecosystem, and the Susceptibility to Infections ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 398: 123-46. https://doi.org/10.1007/82_2016_504.

Thomas, Andrew Maltez, Paolo Manghi, Francesco Asnicar, Edoardo Pasolli, Federica Armanini, Moreno Zolfo, Francesco Beghini, et al. 2019. « Metagenomic Analysis of Colorectal Cancer Datasets Identifies Cross-Cohort Microbial Diagnostic Signatures and a Link with Choline Degradation ». *Nature Medicine* 25 (4): 667-78. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0405-7.

Tinkov, Alexey A., Olga P. Ajsuvakova, Margarita G. Skalnaya, Elizaveta V. Popova, Anton I. Sinitskii, Olga N. Nemereshina, Evgenia R. Gatiatulina, Alexandr A. Nikonorov, et Anatoly V. Skalny. 2015. « Mercury and Metabolic Syndrome: A Review of Experimental and Clinical Observations ». *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 28 (2): 231-54. https://doi.org/10.1007/s10534-015-9823-2.

Tlaskalová-Hogenová, Helena, Renata Štěpánková, Hana Kozáková, Tomáš Hudcovic, Luca Vannucci, Ludmila Tučková, Pavel Rossmann, et al. 2011. « The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases ». *Cellular and Molecular Immunology* 8 (2): 110-20. https://doi.org/10.1038/cmi.2010.67.

Tojo, Rafael. 2014. « Intestinal Microbiota in Health and Disease: Role of Bifidobacteria in Gut Homeostasis ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (41): 15163. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163.

Tsitko, Irina, Fanny Wiik-Miettinen, Outi Mattila, Natalia Rosa-Sibakov, Tuulikki Seppänen-Laakso, Johanna Maukonen, Emilia Nordlund, et Maria Saarela. 2019. « A small in vitro fermentation model for screening the gut microbiota effects of different fiber preparations ». *International journal of molecular sciences* 20 (8): 1925.

Turnbaugh, Peter J., Micah Hamady, Tanya Yatsunenko, Brandi L. Cantarel, Alexis Duncan, Ruth E. Ley, Mitchell L. Sogin, et al. 2009. « A core gut microbiome in obese and lean twins ». *Nature* 457 (7228): 480-84. https://doi.org/10.1038/nature07540.

Turner, Patricia V. 2018. « The role of the gut microbiota on animal model reproducibility ». *Animal Models and Experimental Medicine* 1 (2): 109-15. https://doi.org/10.1002/ame2.12022.

Uebanso, Takashi, Saki Kano, Ayumi Yoshimoto, Chisato Naito, Takaaki Shimohata, Kazuaki Mawatari, et Akira Takahashi. 2017. « Effects of Consuming Xylitol on Gut Microbiota and Lipid Metabolism in Mice ». *Nutrients* 9 (7). https://doi.org/10.3390/nu9070756.

Uzbay, Tayfun. 2019. « Germ-Free Animal Experiments in the Gut Microbiota Studies ». *Current Opinion in Pharmacology* 49 (décembre): 6-10. https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.016.

Van de Wiele, Tom, Pieter Van den Abbeele, Wendy Ossieur, Sam Possemiers, et Massimo Marzorati. 2015. « The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) ». In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, édité par Kitty Verhoeckx, Paul Cotter, Iván López-Expósito, Charlotte Kleiveland, Tor Lea, Alan Mackie, Teresa Requena, Dominika Swiatecka, et Harry Wichers, 305-17. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_27.

Van den Abbeele, P., C. Grootaert, M. Marzorati, S. Possemiers, W. Verstraete, P. Gerard, S. Rabot, et al. 2010. « Microbial Community Development in a Dynamic Gut Model Is Reproducible, Colon Region Specific, and Selective for Bacteroidetes and Clostridium Cluster IX ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15): 5237-46. https://doi.org/10.1128/AEM.00759-10.

Veloo, A. C. M., et A. J. van Winkelhoff. 2015. « Antibiotic Susceptibility Profiles of Anaerobic Pathogens in The Netherlands ». *Anaerobe*, Special Issue: Antibiotic resistance of anaerobic bacteria, 31 (février): 19-24. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.011.

Venema, Koen, et Pieter van den Abbeele. 2013. « Experimental Models of the Gut Microbiome ». *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 27 (1): 115-26. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.002.

Vignaroli, Carla, Francesca Biavasco, et Pietro E. Varaldo. 2006. « Interactions between Glycopeptides and β-Lactams against Isogenic Pairs of Teicoplanin-Susceptible and -Resistant Strains of Staphylococcus haemolyticus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (7): 2577-82. https://doi.org/10.1128/AAC.00260-06.

Vila, Arnau Vich, Valerie Collij, Serena Sanna, Trishla Sinha, Floris Imhann, Arno R Bourgonje, Zlatan Mujagic, Daisy MAE Jonkers, Ad AM Masclee, et Jingyuan Fu. 2020. « Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota ». *Nature communications* 11 (1): 1-11.

Villa, Max M, Rachael J Bloom, Justin D Silverman, Heather K Durand, Sharon Jiang, Anchi Wu, Shuqiang Huang, Lingchong You, et Lawrence A David. 2019. « High-throughput isolation and culture of human gut bacteria with droplet microfluidics ». *bioRxiv*, 630822.

Visser, Maria J. E., Douglas B. Kell, et Etheresia Pretorius. 2019. « Bacterial Dysbiosis and Translocation in Psoriasis Vulgaris ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (février). https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00007.

Vrancken, Gino, Ann C Gregory, Geert RB Huys, Karoline Faust, et Jeroen Raes. 2019. « Synthetic ecology of the human gut microbiota ». *Nature Reviews Microbiology* 17 (12): 754-63.

Wallen-Russell, Christopher, et Sam Wallen-Russell. 2017a. « Meta Analysis of Skin Microbiome: New Link between Skin Microbiota Diversity and Skin Health with Proposal to Use This as a Future Mechanism to Determine Whether Cosmetic Products Damage the Skin ». *Cosmetics* 4 (2): 14. https://doi.org/10.3390/cosmetics4020014.

Walsh, Jacinta, Brendan T Griffin, Gerard Clarke, et Niall P Hyland. 2018. « Drug–gut microbiota interactions: implications for neuropharmacology ». *British journal of pharmacology* 175 (24): 4415-29.

Wan, Pengjie, et Ji Chen. 2020. « A Calm, Dispassionate Look at Skin Microbiota in Atopic Dermatitis: An Integrative Literature Review ». *Dermatology and Therapy* 10 (1): 53-61. https://doi.org/10.1007/s13555-020-00352-4.

Wang, Qian, Shumei Cui, Li Zhou, Keke He, Liya Song, Haiyan Liang, et Congfen He. 2019. « Effect of Cosmetic Chemical Preservatives on Resident Flora Isolated from Healthy Facial Skin ». *Journal of Cosmetic Dermatology* 18 (2): 652-58. https://doi.org/10.1111/jocd.12822.

Wang, Wei-Lin, Shao-Yan Xu, Zhi-Gang Ren, Liang Tao, Jian-Wen Jiang, et Shu-Sen Zheng. 2015. « Application of Metagenomics in the Human Gut Microbiome ». *World Journal of Gastroenterology* 21 (3): 803. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.803.

Wang, X., et G. R. Gibson. 1993. « Effects of the in Vitro Fermentation of Oligofructose and Inulin by Bacteria Growing in the Human Large Intestine ». *The Journal of Applied Bacteriology* 75 (4): 373-80. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02790.x.

Wanga, Xibao, Yao Chena, Yongquan Shanga, Xiaoyang Wua, Qinguo Weia, Jun Chenb, Jiakuo Yana, et Honghai Zhanga. 2019. « Comparison of the gut microbiome in red deer (Cervus elaphus) and fallow deer (Dama dama) by high-throughput sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene ». *SCIENCEASIA* 45 (6): 515-24.

Wanke, Ines, Heiko Steffen, Christina Christ, Bernhard Krismer, Friedrich Götz, Andreas Peschel, Martin Schaller, et Birgit Schittek. 2011. « Skin Commensals Amplify the Innate Immune Response to Pathogens by Activation of Distinct Signaling Pathways ». *Journal of Investigative Dermatology* 131 (2): 382-90. https://doi.org/10.1038/jid.2010.328.

Watanabe, K., S. Yamashita, K. Furuno, H. Kawasaki, et Y. Gomita. 1995. « Metabolism of Omeprazole by Gut Flora in Rats ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (4): 516-17. https://doi.org/10.1002/jps.2600840425.

Wei, Yan-Xia, Zhuo-Yang Zhang, Chang Liu, Pradeep K Malakar, et Xiao-Kui Guo. 2012. « Safety assessment of *Bifidobacterium longum* JDM301 based on complete genome sequences ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 18 (5): 479-88. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i5.479.

Whiteside, Samantha A., Hassan Razvi, Sumit Dave, Gregor Reid, et Jeremy P. Burton. 2015. « The Microbiome of the Urinary Tract—a Role beyond Infection ». *Nature Reviews Urology* 12 (2): 81-90. https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.361.

Whittle, G., N. B. Shoemaker, et A. A. Salyers. 2002. « The Role of Bacteroides Conjugative Transposons in the Dissemination of Antibiotic Resistance Genes ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59 (12): 2044-54. https://doi.org/10.1007/s000180200004.

Wiegand, Christian, Nicola J. Hewitt, Hans F. Merk, et Kerstin Reisinger. 2014. « Dermal Xenobiotic Metabolism: A Comparison between Native Human Skin, Four in Vitro Skin Test Systems and a Liver System ». *Skin Pharmacology and Physiology* 27 (5): 263-75. https://doi.org/10.1159/000358272.

Williams, C.F., G.E. Walton, L. Jiang, S. Plummer, I. Garaiova, et G.R. Gibson. 2015. « Comparative Analysis of Intestinal Tract Models ». *Annual Review of Food Science and Technology* 6 (1): 329-50. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015429.

Wilson, Ian D., et Jeremy K. Nicholson. 2017. « Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism, Efficacy, and Toxicity ». *Translational Research* 179 (janvier): 204-22. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002.

Xia, L. Q., C. Zouboulis, M. Detmar, A. Mayer-da-Silva, R. Stadler, et C. E. Orfanos. 1989. « Isolation of Human Sebaceous Glands and Cultivation of Sebaceous Gland-Derived Cells as an in Vitro Model ». *The Journal of Investigative Dermatology* 93 (3): 315-21.

Xiong, Qian, You-Sheng Liu, Li-Xin Hu, Zhou-Qi Shi, Wen-Wen Cai, Liang-Ying He, et Guang-Guo Ying. 2020. « Co-Metabolism of Sulfamethoxazole by a Freshwater Microalga Chlorella Pyrenoidosa ». *Water Research* 175 (mai): 115656. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115656.

Xu, Zhenbo, Yanrui Liang, Shiqi Lin, Dingqiang Chen, Bing Li, Lin Li, et Yang Deng. 2016. « Crystal Violet and XTT Assays on Staphylococcus Aureus Biofilm Quantification ». *Current Microbiology* 73 (4): 474-82. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1.

Yaffe, Eitan, et David A. Relman. 2020. « Tracking microbial evolution in the human gut using Hi-C reveals extensive horizontal gene transfer, persistence and adaptation ». *Nature Microbiology* 5 (2): 343-53.

Yamamoto, Masaki, Hiroko Jokura, Koujiro Hashizume, Hideo Ominami, Yusuke Shibuya, Atsushi Suzuki, Tadashi Hase, et Akira Shimotoyodome. 2013. « Hesperidin Metabolite Hesperetin-7-O-Glucuronide, but Not Hesperetin-3'-O-Glucuronide, Exerts Hypotensive, Vasodilatory, and Anti-Inflammatory Activities ». *Food & Function* 4 (9): 1346. https://doi.org/10.1039/c3fo60030k.

Yoo, Dae-Hyoung, In Sook Kim, Thi Kim Van Le, Il-Hoon Jung, Hye Hyun Yoo, et Dong-Hyun Kim. 2014. « Gut Microbiota-Mediated Drug Interactions between Lovastatin and Antibiotics ». *Drug Metabolism and Disposition* 42 (9): 1508-13. https://doi.org/10.1124/dmd.114.058354.

You, Xiaomeng, Jonah E. Einson, Cynthia Lyliam Lopez-Pena, Mingyue Song, Hang Xiao, David Julian McClements, et David A. Sela. 2017. « Food-Grade Cationic Antimicrobial ε-Polylysine Transiently Alters the Gut Microbial Community and Predicted Metagenome Function in CD-1 Mice ». *Npj Science of Food* 1 (1): 8. https://doi.org/10.1038/s41538-017-0006-0.

Young, Vincent B., et Thomas M. Schmidt. 2004. « Antibiotic-Associated Diarrhea Accompanied by Large-Scale Alterations in the Composition of the Fecal Microbiota ». *Journal of Clinical Microbiology* 42 (3): 1203-6. https://doi.org/10.1128/jcm.42.3.1203-1206.2004.

Zhang, Jianbo, Michael T. Empl, Clarissa Schwab, Mostafa I. Fekry, Christina Engels, Mirjam Schneider, Christophe Lacroix, Pablo Steinberg, et Shana J. Sturla. 2017. « Gut Microbial Transformation of the Dietary Imidazoquinoxaline Mutagen MelQx Reduces Its Cytotoxic and Mutagenic Potency ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 159 (1): 266-76. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx132.

Zhang, Qian-Qian, Guang-Guo Ying, Chang-Gui Pan, You-Sheng Liu, et Jian-Liang Zhao. 2015. « Comprehensive Evaluation of Antibiotics Emission and Fate in the River Basins of China: Source Analysis, Multimedia Modeling, and Linkage to Bacterial Resistance ». *Environmental Science & Technology* 49 (11): 6772-82. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00729.

Zhao, X., et M. Pack. 2017. « Modeling Intestinal Disorders Using Zebrafish ». In *Methods in Cell Biology*, 138:241-70. Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.11.006.

Zheng, Hao, Margaret I. Steele, Sean P. Leonard, Erick V. S. Motta, et Nancy A. Moran. 2018. « Honey Bees as Models for Gut Microbiota Research ». *Lab Animal* 47 (11): 317-25. https://doi.org/10.1038/s41684-018-0173-x.

Zhu, Sibo, Yanfeng Jiang, Kelin Xu, Mei Cui, Weimin Ye, Genming Zhao, Li Jin, et Xingdong Chen. 2020. « The Progress of Gut Microbiome Research Related to Brain Disorders ». *Journal of Neuroinflammation* 17 (1): 25. https://doi.org/10.1186/s12974-020-1705-z.

Zimmermann, Michael, Maria Zimmermann-Kogadeeva, Rebekka Wegmann, et Andrew L Goodman. 2019a. « Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes ». *Nature* 570 (7762): 462-67.

Zimmermann, Petra, et Nigel Curtis. 2019a. « The Effect of Antibiotics on the Composition of the Intestinal Microbiota - a Systematic Review ». *Journal of Infection* 79 (6): 471-89. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.10.008.

Zou, Ling, Peter Spanogiannopoulos, Lindsey M. Pieper, Huan-Chieh Chien, Wenlong Cai, Natalia Khuri, Joshua Pottel, et al. 2020. « Bacterial Metabolism Rescues the Inhibition of Intestinal Drug Absorption by Food and Drug Additives ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (27): 16009-18. https://doi.org/10.1073/pnas.1920483117.

Zuo, Tao, Sunny H Wong, Chun Pan Cheung, Kelvin Lam, Rashid Lui, Kitty Cheung, Fen Zhang, Whitney Tang, Jessica YL Ching, et Justin CY Wu. 2018. « Gut fungal dysbiosis correlates with reduced efficacy of fecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection ». *Nature communications* 9 (1): 1-11.

ANNEXES

VII. Annexes

A. Figures et Tableaux

1. Matériels et méthodes

Tableau 5 : Gradients chromatographiques utilisés pour chaque composé quantifié en Q-TRAP

Xénobiotiques	% Solvant A / Temps du gradient			
	0 – 0.3 min	**0.3 – 1.2 min**	**1.21 – 1.51 min**	**1.52 – 1.6 min**
Bisoprolol	79%	79% - 69%	69% - 0%	0% - 79%
Nisolpidine	49%	49% - 39%	39% - 0%	0% - 49%
Diclofénac	53%	53% - 43%	43% - 0%	0% - 53%
Topotécan	89%	89% - 79%	79% - 0%	0% - 89%
Nifedipine	61%	61% - 51%	51% - 0%	0% - 61%
Fexofénadine	67%	67% - 57%	57% - 0%	0% - 67%
Acéclofénac	52%	52% - 42%	42% - 0%	0% - 52%
Clomipramine	64%	64% - 54%	54% - 0%	0% - 64%
Boscalide	54%	54% - 44%	44% - 0%	0% - 54%
Difénoconazol	47%	47% - 37%	37% - 0%	0% - 47%
Fludioxonil	56%	56% - 46%	46% - 0%	0% - 56%
Pyriméthanil	75%	75% - 65%	65% - 0%	0% - 75%
Méthylparabène	80%	80% - 70%	70% - 0%	0% - 80%
Propylparabène	66%	66% - 56%	56% - 0%	0% - 66%
Butylparabène	60%	60% - 50%	50% - 0%	0% - 60%
Cefpodoxime	91%	91% - 81%	81% - 0%	0% - 91%
Erythromycine	74%	74% - 64%	64% - 0%	0% - 74%
Moxifloxacine	82%	82% - 72%	72% - 0%	0% - 82%
Métronidazole	97%	97% - 87%	87% - 0%	0% - 97%
Olsalazin	54%	54% - 44%	44% - 0%	0% - 54%
Triméthoprime	90%	90% - 80%	80% - 0%	0% - 90%
Sulfaméthoxazole	83%	83% - 73%	73% - 0%	0% - 83%
Warfarine	62%	62% - 52%	52% - 0%	0% - 62%
Oméprazol	80%	80% - 70%	70% - 0%	0% - 80%
Hespéridine	81%	81% - 71%	71% - 0%	0% - 81%

Tableau 6 : Gradient chromatographique utilisé pour les composés quantifiés en Q-TRAP avec une méthode spécifique

Xénobiotiques	% Solvant A / Temps du gradient				
Acétaminophène	**0 - 2.9 min**	**2.9 – 2.91 min**	**2.91 – 3.51 min**	**3.51 – 3.8 min**	**3.80 – 5 min**
	100% - 89%	89% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%
Amoxicilline	**0 - 2.4 min**	**2.4 – 2.41 min**	**2.41 – 3 min**	**3 – 4.01 min**	**4.01 – 5.5 min**
	100% - 92.8%	92.8% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%
Di-isobutyl phthalate, Di-n-butyl phthalate solution and Dioctyl phthalate	**0 – 0.5 min**	**0.5 – 1.5 min**	**1.5 – 2 min**	**2 – 2.01 min**	**2.01 – 2.5 min**
	30% - 30%	30% - 0%	0% - 0%	0% - 30%	30% -30%
Glyphosate	**0 - 2 min**	**2 – 2.01 min**	**2.01 – 2.6 min**	**2.6 – 2.91 min**	**2.91 – 4.1 min**
	100% - 97.5%	97.5% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%
Mercaptopurine	**0 - 2 min**	**2 – 2.01 min**	**2.01 – 2.6 min**	**2.6 – 2.91 min**	**2.91 – 4.1 min**
	100% - 95%	95% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%

Tableau 7 : Méthode de surveillance des réactions multiples pour chaque composé en Q-TRAP

Xénobiotiques	Q1 Masse (Da)	Q3 Masse (Da)	Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Bisoprolol	326.200	116.100	150	150	10	23	16
Nisolpidine	389.200	357.100	150	90	10	12	31
Diclofénac	294.000	250.000	150	-70	-10	-15	-22
Topotécan	422.100	377.100	150	120	10	27	31
Nifédipine	347.100	315.000	150	80	10	10	10
Fexofénadine	502.300	466.200	150	150	10	37	16
Acéclofénac	354.000	215.000	150	105	10	29	22
Clomipramine	315.045	227.000	150	186	10	57	14
Boscalide	343.000	307.000	150	120	10	26	25
Difénoconazol	406.100	251.000	150	140	10	33	16
Fludioxonil	247.000	180.000	150	-150	-10	-38	-19
Pyriméthanil	200.100	107.100	150	190	10	32	13
Méthylparabène	151.000	92.000	150	-60	-10	-26	-10
Propylparabène	179.000	92.000	150	-60	-10	-29	-10
Butylparabène	193.000	92.000	150	-60	-10	-30	-10
Cefpodoxime	428.100	125.000	150	80	10	59	19
Erythromycine	734.600	82.900	150	40	10	89	13
Moxifloxacine	402.200	384.200	150	115	10	31	16
Métronidazole	172.100	128.100	150	80	10	19	16
Olsalazin	301.000	283.000	150	-65	-10	-23	-13
Triméthoprime	291.100	230.100	150	95	10	32	10
Sulfaméthoxazol	254.000	92.100	150	80	10	38	10
Warfarine	309.100	163.000	150	70	10	21	7
Oméprazole	346.100	198.00	150	80	10	15	7
Hespéridine	611.103	303.100	150	216	10	31	12

DP : Potentiel de declustering, EP : Potentiel d'entrée, CE : Energie de collision et CXP : Potentiel de sortie de collision.

2. *In vitro* sensitivity of 30 anaerobic bacterial strains of the human intestinal core microbiota to antibiotics: culture and LC-MS/MS approaches

Table S1: Chromatographic gradient for each antibiotic compound

	% Solvant A / time of the gradient			
Compound ID	**0 – 0.3 min**	**0.3 – 1.2 min**	**1.21 – 1.51 min**	**1.52 – 1.60 min**
Cefpodoxime	91%	91% - 81%	81% - 0%	0% - 91%
Erythromycin	74%	74% - 64%	64% - 0%	0% - 74%
Moxifloxacin	82%	82% - 72%	72% - 0%	0% - 82%
Metronidazole	97%	97% - 87%	87% - 0%	0% - 97%
Trimethoprime	90%	90% - 80%	80% - 0%	0% - 90%
Sulfamethoxazol	83%	83% - 73%	73% - 0%	0% - 83%

Table S2: Multiple reaction monitoring method for each antibiotic compound

Compound ID	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Cefpodoxime	428.100	125.000	150	80	10	59	19
Erythromycin	734.600	82.900	150	40	10	89	13
Moxifloxacin	402.200	384.200	150	115	10	31	16
Metronidazole	172.100	128.100	150	80	10	19	16
Trimethoprime	291.100	230.100	150	95	10	32	10
Sulfamethoxazol	254.000	92.100	150	80	10	38	10

DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy and CXP: Collision Cell Exit Potentia

Table S3: Two-way ANOVA non-parametric test followed by Sidak multiple comparisons test on the percentage of growth and the percentage of chemical modification for the 30 strains compared to the control (without antibiotics for growth and without bacteria for chemical modification

	Cefpodoxime		Erythromycin		Metronidazole		Moxifloxacin	
	Growth	Chemical modification	Growth	Chemical modification	Growth	Chemical modification	Growth	Chemical modification
B. ovatus ATCC 8483	****	ns	****	ns	ns	****	****	ns
B. thetaiotaomicron clinical strain	ns	****	ns	***	****	****	****	ns
B. uniformis DSM 6597	ns	****	ns	*	ns	****	****	ns
B. vulgatus ATCC 8482	****	****	****	ns	****	****	****	ns
B. caccae DSM 19024	*	****	****	***	****	ns	***	****
B. fragilis DSM 2151	ns	****	****	ns	****	****	****	****
O. splanchnicus DSM 20712	****	****	****	ns	****	****	****	****
P. copri clinical strain	*	ns	****	ns	ns	****	****	****
P. distasonis DSM 20701	****	****	****	ns	****	ns	****	****
P. merdae DSM 19495	***	****	****	ns	****	****	****	****
B. adolescentis DSM 20083	ns	****	****	ns	ns	****	ns	****
B. longum DSM 20219	ns	ns	****	ns	ns	****	****	ns
C. aerofaciens DSM 3979	ns	ns	****	ns	***	****	****	ns
E. lenta DSM 2243	ns	****	****	ns	ns	****	**	****
F. nucleatum DSM 15643	****	****	****	****	****	ns	****	****
B. obeum DSM 25238	****	ns	****	ns	****	****	ns	ns
C. boltae DSM 15670	ns	ns	****	ns	ns	****	**	ns
C. difficile DSM 27543	ns	****	ns	ns	ns	****	****	ns
C. perfringens DSM 11782	ns	****	****	***	ns	****	ns	****
C. ramosum DSM 1402	ns	ns	****	ns	ns	****	*	**
C. saccharolyticum DSM 2544	ns	ns	****	ns	ns	****	****	ns
D. formicigenerans DSM 3992	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns	****
E. eligens DSM 3376	ns	****	****	ns	ns	****	ns	****
E. faecalis ATCC 19433	ns	****	****	****	ns	****	****	****
R. gnavus ATCC 29149	ns	****	****	ns	*	****	ns	ns
R. intestinalis DSM 14610	***	****	ns	ns	****	ns	ns	ns
R. torques ATCC 27756	****	****	****	ns	ns	****	****	ns

S. parasanguinis DSM 6778	****	****	****	ns	ns	****	ns	****
V. parvula DSM 2008	ns	****	****	ns	ns	****	**	****
E. coli ATCC 8739	ns	****	****	ns	ns	****	****	****

p-value : 0.05 ; ns = non significant ; * at **** = significant with * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.005 and **** P < 0.001

	Sulfamethoxazole		Trimethoprime		Couple (Sulfamethoxazole)		Couple (Trimethoprime)		Amoxicilline
	Growth	Chemical modification	Growth	Chemical modification	Growth	Chemical modification	Growth	Chemical modification	Growth
B. ovatus ATCC 8483	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
B. thetaiotaomicron clinical strain	ns	**	ns	ns	****	****	****	****	****
B. uniformis DSM 6597	ns	****	ns	ns	****	****	****	****	****
B. vulgatus ATCC 8482	ns	****	ns	**	ns	****	ns	****	****
B. caccae DSM 19024	ns	****	*	ns	ns	****	ns	****	ns
B. fragilis DSM 2151	**	****	ns	ns	*	****	*	****	ns
O. splanchnicus DSM 20712	ns	****	ns	***	ns	****	ns	****	****
P. copri clinical strain	ns	****	**	****	****	****	****	****	ns
P. distasonis DSM 20701	*	****	ns	****	ns	****	ns	****	****
P. merdae DSM 19495	ns	****	ns	**	****	****	****	ns	ns
B. adolescentis DSM 20083	ns	****	ns	ns	****	ns	****	****	****
B. longum DSM 20219	ns	ns	**	ns	***	****	***	ns	****
C. aerofaciens DSM 3979	ns	****	ns	ns	ns	****	ns	ns	****
E. lenta DSM 2243	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
F. nucleatum DSM 15643	ns	****	ns	****	ns	****	ns	****	****
B. obeum DSM 25238	ns	****	ns	ns	*	****	*	ns	****
C. boltae DSM 15670	ns	**	ns	*	****	ns	****	ns	ns
C. difficile DSM 27543	ns	****	ns	ns	ns	****	ns	ns	**
C. perfringens DSM 11782	ns	****	ns	ns	ns	****	ns	ns	****
C. ramosum DSM 1402	ns	**	ns	ns	****	****	****	ns	****

C. saccharolyticum DSM 2544	ns	****	ns	*	ns	****	ns	ns	****
D. formicigenerans DSM 3992	ns	****	****	ns	ns	****	ns	*	****
E. eligens DSM 3376	ns	****	ns	ns	ns	****	ns	****	****
E. faecalis ATCC 19433	ns	****	***	ns	ns	****	ns	****	****
R. gnavus ATCC 29149	ns	****	ns	***	***	****	***	****	****
R. intestinalis DSM 14610	ns	****	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns
R. torques ATCC 27756	****	****	ns	ns	*	ns	*	****	****
S. parasanguinis DSM 6778	ns	****	ns	****	ns	****	ns	****	***
V. parvula DSM 2008	ns	****	ns	*	ns	****	ns	ns	****
E. coli ATCC 8739	ns	****	ns	****	****	****	****	****	****

p-value : 0.05 ; ns = non significant ; * at **** = significant with * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.005 and **** P < 0.0005

3. Combination of molecular and culture-dependent approaches for studying the molecular stress of *in vitro* human gut microbiota model

Table 3: Multiple reaction monitoring method for each compound quantified using Q-TRAp

Compound ID	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
Bisoprolol	326.200	116.100	150	150	10	23	16
Nisoldpidine	389.200	357.100	150	90	10	12	31
Diclofenac	294.000	250.000	150	-70	-10	-15	-22
Topotecan	422.100	377.100	150	120	10	27	31
Nifedipine	347.100	315.000	150	80	10	10	10
Fexofenadine	502.300	466.200	150	150	10	37	16
Aceclofenac	354.000	215.000	150	105	10	29	22
Clomipramine	315.045	227.000	150	186	10	57	14
Boscalide	343.000	307.000	150	120	10	26	25
Difenoconazol	406.100	251.000	150	140	10	33	16
Fludioxonil	247.000	180.000	150	-150	-10	-38	-19
Pyrimethanil	200.100	107.100	150	190	10	32	13
Methylparaben	151.000	92.000	150	-60	-10	-26	-10
Propylparaben	179.000	92.000	150	-60	-10	-29	-10
Butylparaben	193.000	92.000	150	-60	-10	-30	-10
Cefpodoxime	428.100	125.000	150	80	10	59	19
Erythromycin	734.600	82.900	150	40	10	89	13
Moxifloxacin	402.200	384.200	150	115	10	31	16
Metronidazol	172.100	128.100	150	80	10	19	16
Olsalazin	301.000	283.000	150	-65	-10	-23	-13
Trimethoprime	291.100	230.100	150	95	10	32	10
Sulfamethoxazol	254.000	92.100	150	80	10	38	10
Warfarin	309.100	163.000	150	70	10	21	7

Omeprazol	346.100	198.00	150	80	10	15	7
Hesperidin	611.103	303.100	150	216	10	31	12

DP: declustering potential, EP: entrance potential, CE: collision energy and CXP: Collision Cell Exit Potential.

Table 4: Chromatographic gradient for each compound quantified using Q-TRAP

Compound ID	% Solvant A / time of the gradient			
	0 – 0.3 min	0.3 – 1.2 min	1.21 – 1.51 min	1.52 – 1.6 min
Bisoprolol	79%	79% - 69%	69% - 0%	0% - 79%
Nisoldpidine	49%	49% - 39%	39% - 0%	0% - 49%
Diclofenac	53%	53% - 43%	43% - 0%	0% - 53%
Topotecan	89%	89% - 79%	79% - 0%	0% - 89%
Nifedipine	61%	61% - 51%	51% - 0%	0% - 61%
Fexofenadine	67%	67% - 57%	57% - 0%	0% - 67%
Aceclofenac	52%	52% - 42%	42% - 0%	0% - 52%
Clomipramine	64%	64% - 54%	54% - 0%	0% - 64%
Boscalide	54%	54% - 44%	44% - 0%	0% - 54%
Difenoconazol	47%	47% - 37%	37% - 0%	0% - 47%
Fludioxonil	56%	56% - 46%	46% - 0%	0% - 56%
Pyrimethanil	75%	75% - 65%	65% - 0%	0% - 75%
Methylparaben	80%	80% - 70%	70% - 0%	0% - 80%
Propylparaben	66%	66% - 56%	56% - 0%	0% - 66%
Butylparaben	60%	60% - 50%	50% - 0%	0% - 60%
Cefpodoxime	91%	91% - 81%	81% - 0%	0% - 91%
Erythromycin	74%	74% - 64%	64% - 0%	0% - 74%
Moxifloxacin	82%	82% - 72%	72% - 0%	0% - 82%
Metronidazol	97%	97% - 87%	87% - 0%	0% - 97%
Olsalazin	54%	54% - 44%	44% - 0%	0% - 54%
Trimethoprime	90%	90% - 80%	80% - 0%	0% - 90%
Sulfamethoxazol	83%	83% - 73%	73% - 0%	0% - 83%
Warfarin	62%	62% - 52%	52% - 0%	0% - 62%
Omeprazol	80%	80% - 70%	70% - 0%	0% - 80%
Hesperidin	81%	81% - 71%	71% - 0%	0% - 81%

Table 5: Chromatographic gradient for each compound quantified using Q-TRAP

Compound ID	**% Solvant A / time of the gradient**				
	0 - 2.9 min	**2.9 – 2.91 min**	**2.91 – 3.51 min**	**3.51 – 3.8 min**	**3.80 – 5 min**
Acetaminophen	100% - 89%	89% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%
	0 - 2.4 min	**2.4 – 2.41 min**	**2.41 – 3 min**	**3 – 4.01 min**	**4.01 – 5.5 min**
Amoxicillin	100% - 92.8%	92.8% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%
	0 – 0.5 min	**0.5 – 1.5 min**	**1.5 – 2 min**	**2 – 2.01 min**	**2.01 – 2.5 min**
Di-isobutyl phthalate, Di-n-butyl phthalate solution and Dioctyl phthalate	30% - 30%	30% - 0%	0% - 0%	0% - 30%	30% -30%
	0 - 2 min	**2 – 2.01 min**	**2.01 – 2.6 min**	**2.6 – 2.91 min**	**2.91 – 4.1 min**
Glyphosate	100% - 97.5%	97.5% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%
	0 - 2 min	**2 – 2.01 min**	**2.01 – 2.6 min**	**2.6 – 2.91 min**	**2.91 – 4.1 min**
Mercaptopurine	100% - 95%	95% - 0%	0% - 0%	0% - 100%	100% - 100%

Table 6: Number of sequences, OTUs and diversity indexes calculated for all the samples. The results for one sample are the mean of two replicates.

Drugs ID	Sequences	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson	Inv.Simpson
Fexofenadine	35331 ± 1367	253 ± 2	29	2.2	0.9	6.7
Acetaminophen	28595 ± 5546	244 ± 16	27	2.2	0.9	6.8
Cefpodoxime	33586 ± 2666	196 ± 16	25.5	2.1	0.8	5.1
Erythromycin	15743 ± 1110	116 ± 12	19.5	2.2	0.9	6.7
Moxifloxacin	33421 ± 1457	198 ± 8	26.5	2.2	0.9	7.1
Metronidazole	42278 ± 10194	151 ± 4	21.5	1.7	0.7	3.9
Amoxicillin	25569 ± 2334	210 ± 1	28	2.2	0.8	5.9
Trimethoprim	29573 ± 1434	215 ± 4	27	2.2	0.8	6.6
Sulfamethoxazole	21660 ± 4351	212 ± 11	26.5	2.2	0.8	6.1
STX	35591 ± 1054	215 ± 10	27	2.2	0.8	6.6
Clomipramine	33020 ± 4425	252 ± 6	27.5	2.2	0.8	6.6
Bisoprolol	33211 ± 0	257 ± 0	28	2.2	0.8	6.6
Nisoldipine	36013 ± 4546	251 ± 4	28.5	2.2	0.8	6.6
Nifedipine	37128 ± 1850	269 ± 4	28.5	2.2	0.9	6.8
Hesperidin	38030 ± 3448	280 ± 5	29	2.2	0.9	7.0
Olsalazin	28572 ± 1040	258 ± 0	26.5	2.2	0.8	6.5
Omeprazol	46202 ± 7969	291 ± 3	28.5	2.2	0.9	6.8
Ascorbic acid	36539 ± 1025	252 ± 0	28.5	2.2	0.8	6.5
Diclofenac sodium	58250 ± 11180	279 ± 14	29	2.2	0.9	6.8

Aceclofenac	51043 ± 20200	269 ± 28	27.5	2.2	0.9	6.9
Mercaptopurine	29655 ± 1881	250 ± 9	28	2.2	0.9	6.7
Topotecan	29943 ± 683	243 ± 12	29	2.2	0.8	6.7
Warfarin	46705 ± 9494	296 ± 16	28.5	2.2	0.9	6.9
Irinotecan	54219 ± 17447	302 ± 13	29	2.3	0.9	7.1
Glyphosate	27425 ± 525	224 ± 10	28	2.2	0.8	6.7
Boscalid	30780 ± 3278	258 ± 5	27	2.2	0.9	6.7
Difenoconazole	35343 ± 2293	278 ± 14	28.5	2.2	0.9	6.7
Fludioxonil	47686 ± 15722	287 ± 17	29	2.2	0.9	6.8
Pyrimethanil	33130 ± 2339	268 ± 6	28.5	2.2	0.9	6.7
Bisphenol A	37012 ± 3059	286 ± 1	28	2.2	0.9	6.8
Di-isobutyl phthalate	44633 ± 11190	270 ± 0	28.5	2.2	0.9	6.7
Di-n-butyl phthalate	43944 ± 6813	282 ± 8	28.5	2.2	0.8	6.5
Dioctyl phthalate	37906 ± 1560	281 ± 5	28.5	2.2	0.9	6.8
Methylparaben	30362 ± 2776	259 ± 7	27.5	2.2	0.9	6.8
Propylparaben	56643 ± 24107	295 ± 13	30	2.3	0.9	7.1
Butylparaben	30352 ± 5267	264 ± 0	28	2.2	0.8	6.6
Consortium 1	39491 ± 3007	242 ± 0	29	2.2	0.8	6.4
Consortium 2	53094 ± 4899	259 ± 8	28	2.1	0.8	5.6
Consortium 3	46699 ± 4403	265 ± 8	29	2.3	0.9	7.7
mGAM+	54253 ± 13671	280 ± 1	29	2.2	0.8	6.5

B. Autres publications

1. Mycobiote et parabènes

Reciprocal interactions between yeasts from human cutaneous mycobiota and parabens used in cosmetics

M. Benlaassri[1], F. Ecale[2], A. Crepin[2], M.H. Rodier[1,2], N. Venisse[1,.3] and E. Cateau[1,2]

[1]CHU Poitiers, service de Mycologie-Parasitologie, Département des agents infectieux, Poitiers, France

[2]UMR CNRS 7267, Poitiers, France

[3]CIC Inserm 1402, HEDEX Group, 2 rue de la milétrie, 86021 Poitiers, France, and School of Medicine and Pharmacy, University of Poitiers, Poitiers, France; University Hospital of Poitiers, Pharmacokinetics Department, 2 rue de la milétrie, 86021 Poitiers, France.

Abstract

Parabens are substances with antifungal and antibacterial properties, suspected to be endocrine disruptors and widely used as preservatives in cosmetics. In this case, exposure to these compounds is mainly dermal and interactions may occur with skin components including cutaneous mycobiota.

This work explored the *in vitro* interactions between three parabens (methylparaben, ethylparaben and propylparaben) and yeasts from the human cutaneous mycobiota (*Candida parapsilosis*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Rhodotorula mucilaginosa*) by studying the effect of these parabens on fungal growth and the fungal capacity to metabolize the tested compounds.

Our results showed that the growth of three strains of *C. parapsilosis* was not influenced by the presence of parabens; this could be explained by the low concentrations tested. On the other hand, growth of *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* was completely inhibited by ethylparaben from the first day of contact, whereas these same fungi were not sensitive to the two other parabens, even after seven days of incubation. The presence of a lamellar wall in these basidiomycete fungi as well as the physico-chemical properties of ethylparaben could explain this selective inhibition.

Additionally, *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* degraded 90 to 100% of propylparaben after seven days of incubation, but had no effect on the other tested parabens. Thus, their enzymes seem to only degrade the long chain parabens. In the same conditions, *C. uniguttulatus* did not degrade any paraben. This inability may be due to the absence of fungal enzymes able to degrade parabens or to the possible inaccessibility of an intracellular enzyme due to the polysaccharide capsule.

Our work has shown that parabens can act differently from one fungus to another within the cutaneous mycobiota, which could lead to a state of dysbiosis in people using cosmetic products containing parabens. This cutaneous mycobiota can also be involved in the degradation of parabens and thus reduce, according to the produced metabolites and their activities, the risk of endocrine disruption they can induce.

Keywords: parabens, endocrine disruptors, fungi, cutaneous mycobiota, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus uniguttulatus, Rhodotorula mucilaginosa*.

Introduction

Parabens (PBs) are a group of substances widely employed as preservatives, mainly in pharmaceuticals or food and industrials products (1–5) and are considered as the most common ingredient of cosmetics (5,6). According to Dulio and Andres, PBs are present in more than 80% of hygiene products and toiletries such as shampoos, moisturizing creams, shaving creams and cleansing gels (7).

In European Union (EU), the maximum authorized concentration of PBs in cosmetic products is 0.4% for single ester and 0.8% for mixtures of esters (8, 9).

In terms of chemical structure, PBs are esters of *p*-hydroxybenzoic acid, with alkyl substituents ranging from methyl to butyl or benzyl groups (10,11). We can mention in particular methylparaben (MePB), ethylparaben (EtPB), propylparaben (PrPB), butylparaben (BuPB), and benzylparaben (BePB) (11). Among them, MePB and PrPB are the most commonly used and are often present in the products together (11,12).

On the other hand, the length of the alkyl chain is of considerable importance for the physicochemical properties of these products. In general, with the increase in the alkyl chain length, the solubility in water decreases (1,11,13). MePB and EtPB (short chain parabens) are more water soluble than PrPB and BuPB (long chain parabens). However, the antimicrobial properties of PBs are directly proportional to the length of alkyl chain (11,14). For example, BuPB has 4-fold greater ability to inhibit microbial growth than EtPB, but on the other hand solubility of BuPB is 12 times lower than EtPB (11). For this reason, in many products, mixtures of MePB and PrPB or BuPB are used to ensure optimal antimicrobial activities and acceptable solubility (14).

PBs are also known for endocrine disrupting effects at low exposure levels. Experimental studies in animals have evidenced adverse effects on sperm production and testosterone levels following exposure to parabens with longer side chains, this same kind of PBs being also more estrogenic *in vitro* and *in vivo* (15). Moreover, it has been shown that MePB accelerates skin aging and causes damage to DNA during sun exposure (16).

The human skin is densely colonized with a microbiota influenced by many host and environmental factors. Changes in this microbiota clearly play a role in the pathobiology of many types of skin disease and cosmetic disorders (17). This cutaneous microbiota refers to all the microbial communities that predominate and / or are permanently adapted to the skin. Even if one million bacteria inhabit every square centimeter of skin, the microbiota also contains other less well-explored kingdoms such as that of fungi called "mycobiota" (18–20). A study of Findley et al. has improved the

knowledge of cutaneous mycobiota by sequencing and analysis of fungal communities at different cutaneous sites in healthy adults (21). The results of their study showed a great fungal diversity of this mycobiota including *Candida*, *Malassezia*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* and *Rhodotorula* species, variable depending on the anatomical site.

Several host-related factors, such as regular application of cosmetics on skin could affect the composition and variations of mycobiota. In general, skin permeation decreases with increased chain length (15). It is known that dermally applied PBs are taken up by skin leading to systemic exposure to both parent compounds and metabolites formed by either hydrolysis and/or conjugation, finally excreted in urine and bile (15). On the other hand, the cutaneous mycobiota could also participate in the metabolism of PBs via its enzymatic arsenal. It is therefore interesting to study the role that this mycobiota could play in the degradation of PBs and consequently in the potential reduction of the risk of their systemic toxicity.

The aim of this work was to explore the interactions between the most used PBs in cosmetic products and species from human cutaneous mycobiota by studying *in vitro* the fungal ability to metabolize the tested compounds and the effect of these PBs on the fungal growth.

Materials and methods

Fungal growth and parabens

The three strains of *Candida parapsilosis,* the two strains of *Cryptococcus uniguttulatus* and the two strains of *Rhodotorula mucilaginosa* used in this study have been isolated from skin samples of healthy subjects. They have been identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Vitek MS, BioMerieux). Before experimentation, *Candida* strains were grown for 48h on Sabouraud agar medium at 30°C. *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* were grown for 96h at 27°C on the same medium. The yeasts were then harvested in LB Broth (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, USA) and incubated at 30°C or 27°C during 24h before experimentation. The yeasts were resuspended at a concentration of 10^3/mL in LB medium diluted ½ in sterile distilled water containing PBs (Sigma-Aldrich) first dissolved in DMSO, in order to obtain in the experimentation medium a final concentration of 1mM for MePB and EtPB and of 100µM for PrPB. Growth controls were first carried out by incubating yeasts in DMSO at concentration used for PBs dilution. The assays were then carried out at pH 5.2 in glass tubes. At day 0, 1, 3 and 7, monitoring of the fungal growth was carried out by seeding a part of fungal suspensions on Sabouraud agar medium. The agar plates were then incubated during 48h at 30°C for *C. parapsilosis* and during 72h at 27°C for *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* before numeration of

the colony forming unit (CFU). Controls of fungal growth were also carried out in the same medium without PBs.

Each experimentation has been carried out twice, each time in triplicate.

Determination of parabens

At day 0, 1, 3 and 7, 300 µL of fungal suspension were in parallel centrifuged at 3000g for 15 min to pellet the cells, and 100µL of the supernatant were collected for the determination of PBs. Medium supplemented with each paraben, but without microorganisms, was used as negative control of parabens degradation.

PBs were assayed in LB broth using a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. PBs analytical standards (MePB, EtPB and PrPB) were obtained from Sigma-Aldrich Inc. Calibration standards were prepared by spiking known amounts of each PB in LB broth to construct a 5-point calibration curve. Calibration standard final concentrations ranged from 10 ng/mL (limit of quantification) to 200 ng/mL. Similarly, quality control samples were also prepared in LB broth to obtain final concentrations in the low (10 ng/mL), medium (25 ng/mL) and high (100 ng/mL) ranges.

As a first step, study samples were diluted 1/1500 and 1/15000 using a mixture of water and methanol for PrPB and MePB/EtPB, respectively. Deuterated internal standards (MePB-d4, EtPB-d5 and PrPB-d7) obtained from LGC Standards (Molsheim, France) were added to each sample (standards, QCs and study samples). Then, these samples were diluted 1/50 with a mixture of water and methanol (50/50, v/v) and injected directly into the LC-MS/MS system.

A UHPLC system from Shimadzu (Nexera X2 (Kyoto, Japan)) coupled to a 6500+ QTrap mass spectrometer from Sciex (Concord, Canada) was used for analysis. Target analytes were separated using a 3.5 µm CSH column (Waters® Acquity CSH C18, 2.1 x 100 mm, Milford, USA) heated at 40° C and a mobile phase composed of pure water (phase A) and acetonitrile (phase B) delivered at 0.35 mL/min in the gradient mode. Gradient elution started at 0% of B (0-1 minute); then linearly increased to 20% of B (1-4 min); then to 98.6% of B (4-7 min); maintained at 98.6% of B for 1 minute (7-8 min); then decreased to 0% of B (8-8.1 min) and finally maintained at 0% of B for 2.4 minutes (8.1-10.5 min) for re-equilibration of the column.

Target analytes were then transferred to the mass spectrometer using an electrospray ionization interface, operating in negative ionization mode. For each compound, multiple reaction monitoring mode (MRM) with two specific daughter fragment transitions for one parent precursor ion was used. The first was used for quantification while the second was used for confirmation. Specific transitions used for each compound are reported in table 1.

Data were acquired with Analyst® software and quantification was obtained with MultiQuant® software. Ratios of peak areas of target analyte over its corresponding deuterated internal standard were used for calculations. Results were expressed as percentage of residual PBs, calculated using tubes containing PBs without microorganisms as reference.

Results and discussion

Effect of parabens on fungal growth

To explore the effect of PBs on *C. parapsilosis*, *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa,* the yeasts have been incubated during 7 days in LB culture media without and with 1 mM of MePb and EtPb and 100 µM of PrPb, then the fungal CFU have been numbered at Day 0, 1, 3 and 7. The results showed that the growth of the three *C. parapsilosis* strains has not been influenced by the presence of PBs (Figure 1). The count of CFUs of the three strains in the presence of each PB is similar to that of the same strains without PB after 7 days of incubation. The absence of a fungicidal effect of these compounds on *C.parapsilosis* could be explained by the concentrations used in our study: 1 mM for MePb and EtPb and 100 µM for PrPb corresponding to 0.152 g/L, 0.166 g/L and 0.018 g/L respectively. Indeed, PrPb is usually used in cosmetics at lower concentration compared to MePb and EtPb. These concentrations are low compared to those usually used in cosmetics that are close to the maximum concentrations authorized by European regulations (9). In addition, residual amounts of PBs on skin is quite variable because i) of the surface of skin on which the products are applied and ii) on the eventual rinsing of the skin after application. Moreover, Miceli et al. have reported that 0.08% (0.8 g/L) MePB or 0.01% (0.1 g/L) PrPB was required to inhibit growth of *C. albicans* by 50% (22). In our study, the growth of *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* has been completely inhibited by 1 mM of EtPb from the first day of contact, whereas these same fungi were not sensitive to the two other PBs even after 7 days of incubation (Figure 1).

The inhibition of *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* growth by EtPb could be explained by the mechanism of action of PBs which depends on their physicochemical properties and their cellular target.As emphasized by many authors, despite the fact that these compounds have been used for more than 50 years, the exact mechanism of antimicrobial activity demonstrated by PBs has not yet been elucidated (23–26). Most studies have focused on bacteria and it was postulated that these compounds are capable of inhibition of protein synthesis (including key enzymes, such as ATPases and phosphotransferases) (26–28) or of the synthesis of DNA and RNA (27–29). Other studies pointed out that PBs may interfere with the microorganisms respiration (25,26,30,31) by the inhibition of mitochondria oxygen consumption in fungi, especially in mitochondrial complex II (24,27); however, it

was also postulated that the mode of action of aliphatic PBs was based on their ability to disrupt a cell membrane by the modification of its integrity and permeability (32,33), the induction of a potassium efflux (34), or the alteration of the transmembranal potential (23,25,26). These substances may have multiple biological effects, but their inhibitory effects on membrane transport and mitochondrial processes are considered essential for their antifungal activity (1,24,30,35).

The importance of antimicrobial activity of PBs is related to their chemical structure. A linear relationship exists between this antimicrobial activity and the length of the alkyl chain from methyl to octyl paraben (11,36), PrPB being considered more active against most bacteria than MePB (28). In addition, it has been shown that the same intracellular concentration of MePB, EtPB or PrPB was required to cause a 50% decrease in the rate of *Escherichia coli* growth, suggesting that their different antimicrobial activities could be explained by differences in their extent of uptake by the cell (37). Indeed, simultaneously with the increase of the length of the alkyl chain, the value of octanol–water partition coefficient rises, which results in decrease of water solubility and increase lipophilicity (1,11,13). Studies have shown a correlation between the increase in anti-microbial activity of PBs and the increase in their lipophilicity, supporting the hypothesis of a mechanism associated with solubilization in the cell membrane (37). Consequently, the lowest minimal inhibitory concentration for *Aspergillus*, *Fusarium* or *Penicillium* is obtained for BuPB and PrPB compared to MePB and EtPB (30).

Surprisingly, concerning our results, we observed an inhibition of the growth of *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* only in the presence of EtPB whereas PrPB is more liposoluble than EtPB. The yeasts from *Cryptococcus* and *Rhodotorula* genus belong to the phylum basidiomycota. Transmission Electron Microscopy studies have demonstrated that the inner walls of the basidiomycetous yeasts are typically lamellar, in contrast to the uniform inner layer of ascomycetes of which *C. parapsilosis* is a part (38). Considering the stability of the concentration of EtPB from day 0 to day 7 of incubation and the total inhibition of the growth of *C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* by EtPB, two hypotheses could explain our result: i) EtPB could act specifically on a target located at the wall of the basidiomycetous yeasts, thus inhibiting the yeast growth, or ii) the basidiomycetous yeasts wall could behave differently with EtPB only, allowing this compound to cross it to act on the cell membrane or on an intra cytoplasmic target. During this action, EtPb would not be degraded, as shown by the absence of decrease in its concentration between day 0 and day 7 of incubation. The specific passage of the wall by EtPB could be explained in this case by the chemical structure of this PB with a water solubility/liposolubility ratio allowing it to cross the wall while MePB is more water-soluble and PrPb more liposoluble.

Therefore, according to these results, the effect of EtPB differs from one fungus to another within the human cutaneous mycobiota. Thus, using cosmetics containing parabens could lead to a significant imbalance between skin micro-organisms generating a dysbiosis.

Effect of tested fungal strains on parabens

The determination of PBs has been carried out after Day 0, 1, 3 and 7 of incubation, in the supernatant of culture of *C. parapsilosis, C. uniguttulatus* and *R. mucilaginosa* incubated with each PB. Our results showed no decrease of MePB and EtPB concentrations in presence of *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* strains. On the contrary, these five same strains have been able to degrade PrPB up to 100% after 7 days of incubation: 6 to 8% at D1, 16 to 36% at D3 and 90 to 100% at the end of the incubation time for *C. parapsilosis* strains and 32 to 50% at D1, 56 to 74% at J3 and 92 to 94% at the end of the incubation time for *R. mucilaginosa* strains (Figure 2). Moreover, no decrease of the PBs has been observed in the experimental medium without yeasts. *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* appear to possess enzyme(s) capable of acting selectively on PrPB and sparing MePB and EtPB. It can therefore be suggested that this(ese) probable enzyme(s) act(s) only on long-chain alkyl PBs.

Our results are consistent with the few studies published in the literature. Koseki et al. isolated and characterized an *Aspergillus oryzae* protein capable of hydrolyzing the ester bond of EtPB, PrPB and BuPB (39). This esterase named AoPrbA decreased the antimicrobial activity of these PBs. The highest hydrolytic activity of this esterase was against BuPB (0.42 U/mg protein) and decreased with respect to shorter alkyl chain PBs (0.28 U/mg protein for PrPB and 0.094 U/mg protein for EtPB). A recent study by Zhu and Wei showed that the fungus *Fusarium solani pisi* has a cutinase enzyme (FsC) also capable of hydrolyzing the ester bond of PBs (40). Authors expressed this enzyme on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* and showed that it degraded only 3% of MePB and 20% of EtPB. On the other hand, it degraded PrPB and BuPB with an efficiency of 89% and 97%, respectively, after 24 hours of incubation.

Another class of fungal enzymes capable of degrading PBs is laccases (41–48). This family of oxidases has attracted increasing interest in wastewater treatment processes in recent years due to its ability to degrade PBs into non-toxic or easily removable products (48). Macellaro et al. studied the ability of four fungal laccases to degrade PBs including MePB and BuPB (41). They showed that these enzymes were able to degrade these two PBs in the presence of a natural mediator, and that BuPB was more susceptible to degradation than MePb. Mizuno et al. demonstrated that both iso-BuPB and n-BuPB were almost completely removed (95%) after 2 h of treatment and disappeared after 4 h of

treatment with 0.5 U/mL of laccase activity in the presence of 1-hydroxybenzotriazole (HBT) as mediator (41,42).

Our results as well as those of the literature showed that PBs with a relatively long alkyl side chain would be preferentially degraded by fungal enzymes, compared to those with a short alkyl side chain. In order to explain this finding, Zhu et al. calculated the binding energy between the active site of the FsC cutinase enzyme and various PBs (40). They found that this energy increased, and thus that the binding of PBs with the FsC became stronger, with increased length of their alkyl side chain (40). It can therefore be concluded that the preferential degradation of long-chain alkyl PBs is not related to their liposolubility but rather to the enzyme-paraben binding energy.

Our results obtained with *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa* as well as those of the fungal enzymes published in the literature are at the opposite of the results found in bacteria. Valkova et al. showed that the specific activity of PrbA esterase produced by the bacterium *Enterobacter cloacae* was high with EtPB (100%) and MePB (91%). The activity declines with longer chain-length parabens, with 70% activity with PrPB and 35% activity with BuPB (49). *Enterobacter gergoviae* also showed a significant degradation capacity, removing 97.9% of the MePB (50). Amin et *al*. compared the degradation of MePB and PrPB by *Pseudomonas beteli*. The latter degraded 100% MePB and 5% PrPB in 10 days (51). Bacterial esterases degrade more efficiently PBs with short alkyl side chains.

The main product of parabens hydrolysis is *p*-hydroxybenzoic acid (*p*-HBA) (1,15,52). Some microorganisms such as *Pseudomonas sp* can use the *p*-HBA as a carbon source via the β-ketoadipate pathway (51). This pathway is one of the routes by which a microorganism can attack the six-carbon nucleus of an aromatic compound and convert it into an aliphatic acid. This acid is further broken down to acetyl-CoA and succinate, which then enter the tricarboxylic acid cycle (Krebs cycle) (51).

Concerning produced metabolites, in a study comparing the cellular toxicity of PrPB in the presence of an inhibitor of esterase and the toxicity of its metabolites, the metabolites -*p*-HBA or the alcohol derived from PrPB- did not exhibit any significant toxicity (1). The increased toxic action of PrPB in the presence of esterase inhibitor suggests that PrPB itself, rather than its hydrolysis product, was responsible for the toxicity observed (1).

Unlike *C. parapsilosis* and *R. mucilaginosa*, *C. uniguttulatus* is unable to degrade PrPb, MePb and EtPb after 7 days of incubation (Figure 2). The yeasts from *Cryptococcus* genus present the particularity of having a capsule of polysaccharide nature. So, PBs have to interact with the fungal capsule before reaching the cell membrane and the intracellular medium. This inability of *C. uniguttulatus* to degrade PBs may be due either to the absence of fungal enzymes capable of degrading

them or to the inaccessibility of a possible intracellular enzyme to PBs because of the polysaccharide capsule.

Conclusions and perspectives

We demonstrated in this *in vitro* study that the relationships between fungi and PBs could represent one of the factors contributing to the dysbiosis of cutaneous mycobiota. Our work also showed that yeasts from the cutaneous mycobiota could be involved in the degradation of PBs used in cosmetic preparations and consequently in the potential decrease of endocrine disruption risk. Further studies would be necessary to investigate i) other yeasts from the cutaneous mycobiota ii) if their enzymatic arsenal has a role in this degradation.

References

1. Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). Food Chem Toxicol. 2005;43(7):985-1015.
2. Guo Y, Kannan K. A Survey of Phthalates and Parabens in Personal Care Products from the United States and Its Implications for Human Exposure. Environ Sci Technol. 2013;47(24):14442-9.
3. Liao C, Liu F, Kannan K. Occurrence of and Dietary Exposure to Parabens in Foodstuffs from the United States. Environ Sci Technol. 2013;47(8):3918-25.
4. Brignon J-M, Boucard P. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Parabènes, DRC-15-136881-10349A, p. 40 [En ligne]. INERIS; 2015 [cité le 7 sept 2019]. Disponible: http://www.ineris.fr/substances/fr/.
5. Cashman AL, Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. Dermatitis. 2005;16(2):57-66.
6. Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic Uptake of Diethyl Phthalate, Dibutyl Phthalate, and Butyl Paraben Following Whole-Body Topical Application and Reproductive and Thyroid Hormone Levels in Humans. Environ Sci Technol. 2007;41(15):5564-70.
7. Dulio V, Andres S. Recommandations du CEP auprès du MEDDE pour la sélection des Substances Pertinentes à Surveiller dans les milieux aquatiques pour le second cycle de la DCE (2016-2021) – Rapport AQUAREF 2013 –102 p.2014.

8. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (Text with EEA relevance) [En ligne]. OJ L, 32009R1223 22 déc 2009. Disponible: http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/eng.

9. Commission Regulation (EU) No 1004/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products Text with EEA relevance [En ligne]. OJ L, 32014R1004 26 sept 2014. Disponible: http://data.europa.eu/eli/reg/2014/1004/oj/eng.

10. Jonkers N, Sousa A, Galante-Oliveira S, Barroso CM, Kohler H-PE, Giger W. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. Environ Sci Pollut Res Int. 2010;17(4):834-43.

11. Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health. Environ Int. 2014;67:27-42.

12. Núñez L, Tadeo JL, García-Valcárcel AI, Turiel E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. J Chromatogr A. 2008;1214(1-2):178-82.

13. Jewell C, Prusakiewicz JJ, Ackermann C, Payne NA, Fate G, Voorman R, et al. Hydrolysis of a series of parabens by skin microsomes and cytosol from human and minipigs and in whole skin in short-term culture. Toxicol Appl Pharmacol. 2007;225(2):221-8.

14. Flasiński M, Gawryś M, Broniatowski M, Wydro P. Studies on the interactions between parabens and lipid membrane components in monolayers at the air/aqueous solution interface. Biochim Biophys Acta (BBA), Biomembr. 2016;1858(4):836-44.

15. Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. Reprod Toxicol. 2010;30(2):301-12.

16. Handa O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. Toxicology. 2006;227(1):62-72.

17. Egert M, Simmering R, Riedel CU. The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease. Clini Pharmacol Ther. 2017;102(1):62-9.

18. Souissi A, Mokni M. Microbiome cutané. EMC Dermatologie. 2018;14(1):1-10.

19. Botterel F, Angebault C, Bougnoux M-E. Le mycobiome humain : actualités et perspectives. Revue Francophone des Laboratoires. 2015;2015(469):67-73.

20. Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. Trends Microbiol. 2013;21(7):334-41.

21. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et *al*. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. Nature. 2013;498(7454):367-70.

22. Miceli MH, Bernardo SM, Ku TSN, Walraven C, Lee SA. *In Vitro* Analyses of the Effects of Heparin and Parabens on *Candida albicans* Biofilms and Planktonic Cells. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(1):148-53.
23. Nguyen T, Clare B, Guo W, Martinac B. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. Eur Biophys J. 2005;34(5):389-95.
24. Ito S, Yazawa S, Nakagawa Y, Sasaki Y, Yajima S. Effects of alkyl parabens on plant pathogenic fungi. Bioorg Med Chem Lett. 2015;25(8):1774-7.
25. Kosová M, Hrádková I, Mátlová V, Kadlec D, Šmidrkal J, Filip V. Antimicrobial effect of 4-hydroxybenzoic acid ester with glycerol. J Clin Pharm Ther. 2015;40(4):436-40.
26. Flasiński M, Kowal S, Broniatowski M, Wydro P. Influence of Parabens on Bacteria and Fungi Cellular Membranes: Studies in Model Two-Dimensional Lipid Systems. J Phys Chem B. 2018;122(8):2332-40.
27. Halla N, Fernandes I, Heleno S, Costa P, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et *al*. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. Molecules. 2018;23(7):1571.
28. Valkova N, Lepine F, Valeanu L, Dupont M, Labrie L, Bisaillon J-G, et al. Hydrolysis of 4-Hydroxybenzoic Acid Esters (Parabens) and Their Aerobic Transformation into Phenol by the Resistant *Enterobacter cloacae* Strain EM. Appl Environ Microbiol. 2001;67(6):2404-9.
29. Nes IF, Eklund T. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J Appl Bacteriol. 1983;54(2):237-42.
30. Soni MG, Burdock GA, Taylor SL, Greenberg NA. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. Food Chem Toxicol. 2001;39(6):513-32.
31. Nakagawa Y, Moldéus P. Mechanism of p-Hydroxybenzoate Ester-induced Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. Biochem Pharmacol. 1998;55(11):1907-14.
32. Eklund T. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. J Appl Bacteriol. 1980;48(3):423-32.
33. Barberis C, Astoreca A, Fernandez-Juri G, Chulze S, Dalcero A, Magnoli C. Use of propyl paraben to control growth and ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* species on peanut meal extract agar. Int J Food Microbiol. 2009;136(1):133-6.
34. Bredin J, Davin-Régli A, Pagès J-M. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2005;55(6):1013-5.
35. Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. Food Chem Toxicol. 2002;40(10):1335-73.

36. Russell AD, Furr JR, Pugh WJ. Susceptibility of porin- and lipopolysaccharide-deficient mutants of *Escherichia coli* to a homologous series of esters of p-hydroxybenzoic acid. Inter J Pharm. 1985;27(2):163-73.

37. Valkova N. Caractérisation de l'estérase PrbA conférant une résistance accrue aux parabènes chez Enterobacter cloacae. [phd, en ligne]. Québec : Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique; 2003 [cité le 14 sept 2019]. Disponible: http://espace.inrs.ca/2269/.

38. Kreger-Van Rij NJW, Veenhuis M. A Comparative Study of the Cell Wall Structure of Basidiomycetous and Related Yeasts. J Gen Microbiol. 1971;68(1):87-95.

39. Koseki T, Mihara K, Murayama T, Shiono Y. A novel *Aspergillus oryzae* esterase that hydrolyzes 4-hydroxybenzoic acid esters. FEBS Lett. 2010;584(18):4032-6.

40. Zhu B, Wei N. Biocatalytic Degradation of Parabens Mediated by Cell Surface Displayed Cutinase. Environ Sci Technol. 2019;53(1):354-64.

41. Macellaro G, Pezzella C, Cicatiello P, Sannia G, Piscitelli A. Fungal Laccases Degradation of Endocrine Disrupting Compounds. Biomed Res Int. 2014;2014:1-8.

42. Mizuno H, Hirai H, Kawai S, Nishida T. Removal of estrogenic activity of iso-butylparaben and n-butylparaben by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. Biodegradation. 2009;20(4):533-9.

43. Rodríguez-Delgado M, Orona-Navar C, García-Morales R, Hernandez-Luna C, Parra R, Mahlknecht J, et al. Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. Int Biodeterior Biodegradation. 2016;108:34-41.

44. Beck S, Berry E, Duke S, Milliken A, Patterson H, Prewett DL, et al. Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. Int Biodeterior Biodegradation. 2018;127:146-59.

45. Daâssi D, Prieto A, Zouari-Mechichi H, Martínez MJ, Nasri M, Mechichi T. Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. Int Biodeterior Biodegradation. 2016;110:181-8.

46. Barrios-Estrada C, de Jesús Rostro-Alanis M, Muñoz-Gutiérrez BD, Iqbal HMN, Kannan S, Parra-Saldívar R. Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. Sci Total Environ. 2018;612:1516-31.

47. Bilal M, Rasheed T, Nabeel F, Iqbal HMN, Zhao Y. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review. J Environ Manag. 2019;234:253-64.

48. Yang J, Li W, Ng TB, Deng X, Lin J, Ye X. Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. Front Microbiol. 2017;8:832

49. Valkova N, Lépine F, Labrie L, Dupont M, Beaudet R. Purification and Characterization of PrbA, a New Esterase from *Enterobacter cloacae* Hydrolyzing the Esters of 4-Hydroxybenzoic Acid (Parabens). J Biol Chem. 2003;278(15):12779-85.

50. Valkova N, Lepine F, Bollet C, Dupont M, Villemur R. prbA, a Gene Coding for an Esterase Hydrolyzing Parabens in *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter gergoviae* Strains. J Bacteriol. 2002;184(18):5011-7.

51. Amin A, Chauhan S, Dare M, Bansal AK. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia latens*. Eur J Pharm Biopharm. 2010;75(2):206-12.

52. Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, Calafat AM. Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. Environ Health Perspect. 2006;114(12):1843-6.

Table and figures

Table 1. Retention times and MRM transitions for target analytes.

Analyte	Retention time (min)	MRM transition (m/z)
MePB	5,73	151,0 -91,9
		151,0-136,0
MePB-d4	5,70	155,0-96,0
		155,0-140,0
EtPB	6,53	165,0-91,9
		165,0-136,8
EtPB-d5	6,51	170,0-91,9
		170,0-135,6
PrPB	6,98	179,1-91,9
		179,1-136,8
PrPB-d7	6,96	186,1-91,9
		186,1-136,0

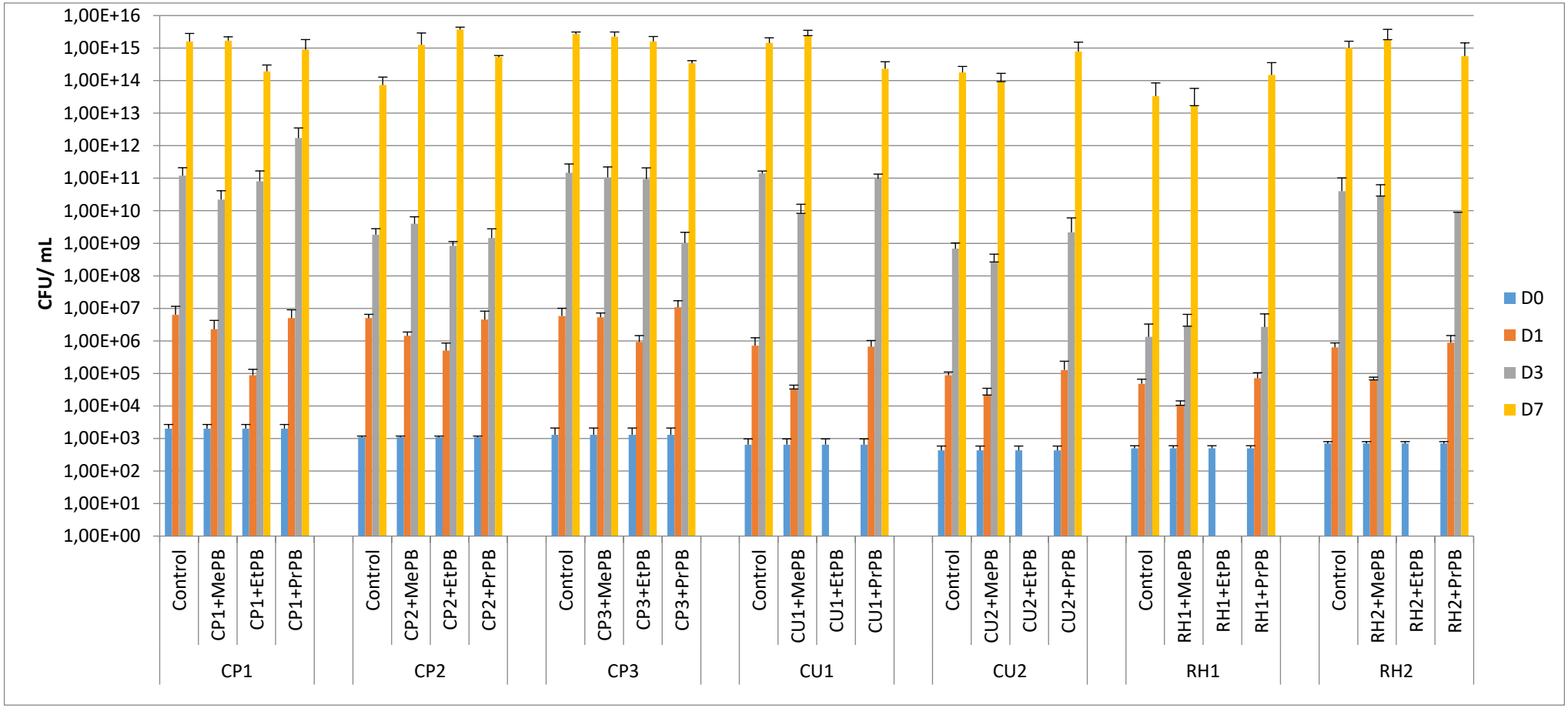
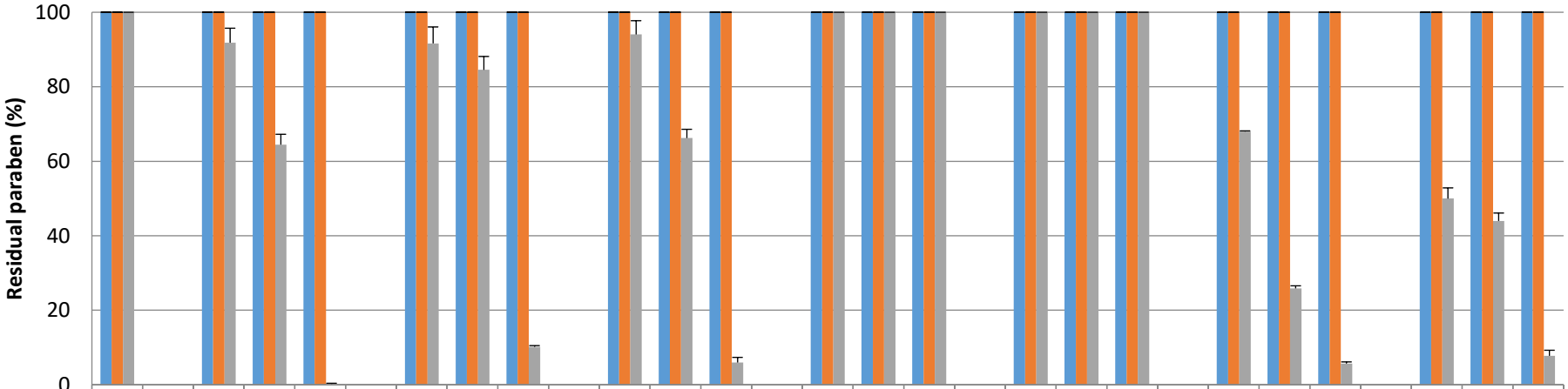

CFU/ mL
1,00E+16
1,00E+15
1,00E+14
1,00E+13
1,00E+12
1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
1,00E+02
1,00E+01
1,00E+00
D0
D1
D3
D7
Control
CP1+MePB
CP1+EtPB
CP1+PrPB
Control
CP2+MePB
CP2+EtPB
CP2+PrPB
Control
CP3+MePB
CP3+EtPB
CP3+PrPB
Control
CU1+MePB
CU1+EtPB
CU1+PrPB
Control
CU2+MePB
CU2+EtPB
CU2+PrPB
Control
RH1+MePB
RH1+EtPB
RH1+PrPB
Control
RH2+MePB
RH2+EtPB
RH2+PrPB
CP1
CP2
CP3
CU1
CU2
RH1
RH2

Figure 1. Colony Forming Units (CFU) numeration of the C. parapsilosis (CP1, CP2, CP3), the C. uniguttulatus (CU1, CU2) and the R.mucilaginosa (RH1, RH2) strains, in culture medium without (Control) or with parabens (Methylparaben-MePB, Etylparaben-EtPB, Propylparaben-PrPB) at Day 0,1,3 and 7.



	D7 CTR	D1 CP1	D3 CP1	D7 CP1	D1 CP2	D3 CP2	D7 CP2	D1 CP3	D3 CP3	D7 CP3	D1 CU1	D3 CU1	D7 CU1	D1 CU2	D3 CU2	D7 CU2	D1 Rh1	D3 Rh1	D7 Rh1	D1 Rh2	D3 Rh2	D7 Rh2
MePb	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EtPb	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PrPb	100	91,8	64,4	0	91,6	84,5	10,1	94,0	66,2	5,98	100	100	100	100	100	100	68	25,9	5,69	50	44	7,77

Figure 2. Residual parabens (%) (Methylparaben-MePB, Etylparaben-EtPB, Propylparaben-PrPB) during incubation times with *C. parapsilosis* (CP1, CP2, CP3), *C. uniguttulatus* (CU1, CU2) and *R. mucilaginosa* (RH1, RH2) strains. A determination of parabens (CTR) has been carried out after 7 days of incubation in the experimental medium without yeasts.

2. *In* vitro and intracellular activities of frog skin temporins against *Legionella pneumophila* and its eukaryotic host

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

nature research

open

In vitro and intracellular activities of frog skin temporins against *Legionella pneumophila* and its eukaryotic hosts

Alexandre crépin[1], Jean-françois Jégou[2], Sonia André[3], Florine ecale[1], Anastasia croitoru[4], Anne cantereau[5], Jean-Marc Berjeaud[1], Ali Ladram[3] & Julien Verdon [1*]

temporin-SHa (SHa) is a small cationic host defence peptide (HDp) produced in skin secretions of the Sahara frog *Pelophylax saharicus*. This peptide has a broad-spectrum activity, efficiently targeting bacteria, parasites and viruses. noticeably, SHa has demonstrated an ability to kill *Leishmania infantum* parasites (amastigotes) within macrophages. Recently, an analog of SHa with an increased net positive charge, named [K³]SHa, has been designed to improve those activities. SHa and [K³]SHa were both shown to exhibit leishmanicidal activity mainly by permeabilization of cell membranes but could also induce apoptotis-like death. temporins are usually poorly active against Gram-negative bacteria whereas many of these species are of public health interest. Among them, *Legionella pneumophila*, the etiological agent of Legionnaire's disease, is of major concern. indeed, this bacterium adopts an intracellular lifestyle and replicate inside alveolar macrophages likewise inside its numerous protozoan hosts. Despite several authors have studied the antimicrobial activity of many compounds on *L. pneumophila* released from host cells, nothing is known about activity on intracellular *L. pneumophila* within their hosts, and subsequently mechanisms of action that could be involved. Here, we showed for the first time that SHa and [K³]SHa were active towards several species of *Legionella*. Both peptides displayed bactericidal activity and caused a loss of the bacterial envelope integrity leading to a rapid drop in cell viability. Regarding amoebae and THP-1-derived macrophages, SHa was less toxic than [K³]SHa and exhibited low half maximal lethal concentrations (Lc_{50}). When used at non-toxic concentration (6.25 µM), SHa killed more than 90% *L. pneumophila* within amoebae and around 50% within macrophages. Using SHa labeled with the fluorescent dye Cy5, we showed an evenly diffusion within cells except in vacuoles. Moreover, SHa was able to enter the nucleus of amoebae and accumulate in the nucleolus. this subcellular localization seemed specific as macrophages nucleoli remained unlabeled. Finally, no modifications in the expression of cytokines and HDPs were recorded when macrophages were treated with 6.25 µM SHa. By combining all data, we showed that temporin-SHa decreases the intracellular *L. pneumophila* load within amoebae and macrophages without being toxic for eukaryotic cells. this peptide was also able to reach the nucleolus of amoebae but was not capable to penetrate inside vacuoles. these data are in favor of an indirect action of SHa towards intracellular *Legionella* and make this peptide a promising template for further developments.

Natural antimicrobial peptides (AMPs) and derivatives thereof are promising alternatives to conventional antibiotics. They exhibit broad-spectrum activity and often induce rapid permeabilization/depolarization of cell membranes, making them less susceptible to resistance. Anurans (frogs and toads) skin secretions are a rich natural source of AMPs[1]. These peptides, also

[1] Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073, POITIERS, Cedex 9, France. [2]Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines, UPRES EA4331, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073, POITIERS, Cedex 9, France. [3]Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine, IBPS, BIOSIPE, F-75252, Paris, France. [4]Laboratoire d'Optique et Biosciences, INSERM U1182 - CNRS UMR7645, Ecole polytechnique, 91128, PALAISEAU, Cedex, France. [5]Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073, POITIERS, Cedex 9, France. *email: julien.verdon@univ-poitiers.fr

known as host defence peptide (HDPs)[2,3], have been extensively presented as promising candidates to struggle the antibiotic resistance crisis rising worldwide but also as good templates for developing new anticancer, antidiabetic and immunomodulatory agents[1,4,5]. Because short peptides are ideal candidates for therapeutic application in terms of manufacturing cost[6], frog skin peptides such as temporins are particularly interesting[7].

Temporins are short natural HDPs (8–17 amino acid residues)[1,8–11] and represent an abundant family (more than 120 members listed in the Antimicrobial Peptide Database[12]) of low cationic hydrophobic and C-terminally amidated peptides produced by ranid frogs. Temporins are described to be mainly active against Gram-positive bacteria, including some antibiotic-resistant clinical isolates (e.g. methicillin-resistant staphylococci and antibiotic-resistant enterococci)[13]. However, the therapeutic potential of some temporins also extends to Gram-negative bacteria. This is notably the case of Temporin-Tl, isolated from the frog species *Rana temporaria*[14] and, the tetradecapeptide temporin-DRa from *Rana draytonii*[15]. Two other temporins, temporin-SHa and temporin-SHd, found in the skin secretions of the North African ranid frog *Pelophylax saharicus*[10,16], also target efficiently Gram-negative bacteria. However, with only 13 amino acid residues, temporin-SHa has a much broader spectrum, compared to temporin-SHd (17 amino acid residues), being potent against *E. coli* and *A. baumannii* (like temporin-SHd) but also against *S. enterica* serovar Enteritidis and *K. pneumoniae*[17]. Many temporin analogs containing both natural and unnatural amino acids were designed for structure-activity relationship studies. Some of them, including [P^4, D-L^{11}]temporin-Tl (containing a leucine^{11} D-enantiomer)[18], [Aib^{14}] temporin-DRa (an alpha-aminoisobutyric acid in position 13)[19] and [*p*-^{t}BuF^5, R^7]SHf (4-tert-butyl-phe^5)[20], are of particular interest because highly potent against Gram-negative species and non-toxic towards mammalian cells.

Only a few temporins are active against human parasites[10,16,17,21,22] and viruses[23,24]. Temporins SHa and SHd were reported to have potent activity against the human protozoan parasite *Leishmania*[10,16,17], the etiological agent of leishmaniasis, a vector-borne tropical disease leading to morbidity and mortality[25]. Their antiparasitic activity was assessed against several *Leishmania* species responsible for visceral or cutaneous leishmaniases (*L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*), but also against other trypanosomatids that cause major diseases in humans: *Trypanosoma brucei gambiense* (sleeping sickness) and *T. cruzi* (Chagas disease)[10,17]. [K^3]temporin-SHa, which was obtained by increasing the net positive charge of SHa from +2 to +3, has been described as a potent antiparasitic peptide active against all these trypanosomatids, including antimony-resistant *L. infantum* parasites[17]. This analog showed broad antimicrobial spectrum, targeting also several Gram-negative bacteria and *Candida* species[17]. Regarding viruses, although an activity against two pathogens of ectodermic animals was previously reported for temporin-Ta[26], it is only recently that a virucidal activity against a human virus (i.e. herpes simplex virus type 1, HSV-1), was demonstrated for temporins Tb and SHa[23,24]. Significant reduction of the virus titer was obtained after preincubation of HSV-1 with these temporins.

Interestingly, temporins can target intracellular pathogens. However, only limited data about such activities are presently available and the mechanisms by which temporins exert their intracellular activity remain unknown. Temporins Tb and Ta were shown to kill both ATCC-derived and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) clinical strains within human immortalized keratinocytes (HaCaT cells)[27]. They diffuse into keratinocytes without entering in the nucleus. Temporin-Tb was also shown to be active against HSV-1 replication in both HEK-293 (human embryonic kidney cells) and HeLa S3 (human cervix epithelial cells)[23]. Similar results were reported for temporins SHa and [K^3]SHa in human primary keratinocytes, with no immunomodulatory effect on the cell antiviral response[24]. In addition to these antiviral properties on infected cells, temporins SHa and [K^3]SHa were shown to kill *Leishmania* parasites (*L. infantum* amastigotes) within macrophages[17], like temporin-SHd[10]. This leishmanicidal activity against intramacrophagic amastigotes was higher compared to the activity on extracellular forms (axenic amastigotes). This suggests either direct intracellular targeting of *Leishmania* amastigotes by temporins or other cell death mechanisms involving synergistic effects with intracellular messengers (like nitric oxide). In line with this, both peptides were demonstrated to trigger apoptotis-like death in *Leishmania infantum* in addition to their primary membranolytic mechanism[17].

In this study, to provide additional data on the intracellular effects of temporins and to get further insight on the underlying mechanisms, we focused our attention on temporin-SHa and its analog [K^3]SHa, using *Legionella pneumophila* as model of intracellular pathogen. *L. pneumophila* is an opportunistic Gram-negative human pathogen responsible for severe form of nosocomial and community-acquired pneumonia called Legionnaire's disease[28]. *L. pneumophila* is ubiquitous in aquatic environments where it can persist within multispecies biofilms and phagotrophic protists like free-living amoebae[29,30]. Pathogen transmission to humans occurs after inhalation of contaminated aerosol particles that reach alveolar mucosa where *L. pneumophila* replicates in macrophages[28]. Among natural compounds described to be active against *Legionella* (biosurfactants, essential oils, proteins), several AMPs were reported to exhibit such an activity[31,32]. However, to the best of our knowledge, no studies regarding the activity of temporins against *Legionella* have been reported to date.

In this work, we determined the anti-*Legionella* properties of temporin-SHa and [K^3]temporin-SHa towards different *Legionella* strains, including several *L. pneumophila* serogroups. The anti-*Legionella* mechanism was also evaluated. The cytotoxicity of temporins against the two main *L. pneumophila* eukaryotic hosts, human macrophages and free-living protozoa *Acanthamoeba castellanii*, was initially assessed, after which we analysed their effect on *L. pneumophila*-infected cells. Finally, we used Cy5-labeled temporin-SHa to discern by confocal fluorescence microscopy whether the peptide was located on the cell surface or into the infected cells, and to evaluate the peptide effect on intracellular *Legionella* multiplication. Immunomodulatory properties of temporin-SHa were also assessed by determining the mRNA expression levels of some pro-inflammatory cytokines and HDPs.

Legionella strains	MIC (µM)	
	SHa	[K³]SHa
L. feeleii ATCC 35072	≤1.56	3.12
L. longbeachae ATCC 33484	≤1.56	3.12
L. pneumophila Bloodmington-2 ATCC 33155 (Sg 3)	3.12	3.12
L. pneumophila HL 06041035 (Sg 1)*	3.12	6.25
L. pneumophila Lens CIP 108286 (Sg 1)	3.12	3.12
L. pneumophila Lorraine (Sg 1)*	3.12	3.12
L. pneumophila Los Angeles-1 ATCC 33156 (Sg 4)	3.12	6.25
L. pneumophila Paris (Sg 1)	≤1.56	3.12

Table 1. Anti-*Legionella* activity of temporins SHa and [K³]SHa. Results are the mean of three independent experiments. Microbial strains were obtained from various culture collections: ATCC (American Type Culture Collection), CIP (Collection de l'Institut Pasteur de Paris, France) and *Centre National de Référence des Légionelles, Lyon, France. Sg: Serogroup.

1 Results

SHa and [K³]SHa are potent anti-*Legionella* peptides. To assess the activity of SHa and [K₃]SHa against bacteria that belong to the *Legionella* genus, several species of human health concern were grown in the presence of different amount of peptides and minimal inhibitory concentrations (MICs) were thus determined after a growth period of 96 h at 37 °C (Table 1). The SHa peptide was active against all the *Legionella* strains and exhibited low MIC values (3–6 µM). *L. feeleii*, *L. longbeachae* and *L. pneumophila* Paris were the more sensitive strains as the lowest concentration of SHa used was still able to inhibit their development (Table 1). Similar results were obtained for the [K³]SHa analog with MIC values in the same range as the parent peptide (Table 1). Taken together, these results indicated that both peptides have potent anti-*Legionella* activity and that SHa is slightly more effective than the [K³]SHa analog.
To determine whether temporin-SHa and [K³]SHa are able to kill *Legionella* sp. or only inhibit their growth, time-killing experiments were conducted using *L. pneumophila* Lens as a target. Indeed, this strain exhibits the same sensitivity to both temporins and is often used as a model when studying the effect of AMPs towards *Legionella* sp.[31] At MIC concentration (3.12 µM), both peptides were shown to completely abolish the cultivability of *L. pneumophila* Lens (Fig. 1A). However, [K³]SHa analog was more effective than SHa because only 30 seconds were required to achieve complete loss of cultivability (2 minutes for SHa) (Fig. 1A). At this stage, even if we cannot conclude about the killing ability of temporins, our data indicated that temporins displayed a rapid bactericidal effect on *L. pneumophila*, most likely by permeabilizing bacterial cells. D-SHa (enantiomeric SHa) with all residues in the D-configuration was also synthesized and assayed towards *L. pneumophila* Lens. The MIC value determined after a growth period of 96 h at 37 °C was identical to that of the parent peptide (3.12 µM, data not shown) revealing intrinsic proteolytic stability of SHa in these incubation conditions and also that this peptide acts through a nonstereospecific (i.e. nonreceptor) mediated mechanism.

SHa and [K³]SHa induce a rapid permeabilization of *L. pneumophila* cells. The effect of temporins on bacterial cell integrity was further investigated by two complementary approaches. Firstly, we used propidium iodide to quantify the loss of bacterial membrane integrity in presence of 3.12 µM temporins. As indicated in Fig. 1B, both peptides were able to permeabilize the bacterial cell envelope. However, [K³]SHa analog displayed a more pronounced effect than the parent peptide. Indeed, 3.12 µM [K³]SHa were sufficient to permeabilize 95.4% (±2.1%) of *L. pneumophila* while at the same concentration, SHa induced only 59.7% (±7.3%) permeabilization. We then used a transmission electron microscopy (TEM)-based approach to gain insight into the effect of temporins on the morphology and the inner cell integrity of *L. pneumophila*. Microscopic observations of *L. pneumophila* control cells (untreated with temporins) showed well-formed bacilli of 1.5 to 2.0 µm long that contained numerous ribosomes in the cytoplasm (Fig. 2A,B). They exhibited a discernible envelope and some vacuoles were also visible. When bacteria were in contact with 3.12 µM SHa for 5 min, a loss of the intracellular organization was obtained as highlighted by a diminution of electron-dense regions (Fig. 2C). Many bacilli had lost their envelope integrity, and severe damages like membrane wrinkling and bubbling were also observed. These data indicated that SHa compromises the structural integrity of the cell wall, leading to cell lysis (Fig. 2C,D). Concerning [K³] SHa treatment, bacteria were also severely damaged by the peptide at a very low concentration (3.12 µM), as revealed by the presence of ghost-like structures containing large electron-lucent areas (Fig. 2E,F). Cells had lost a part of their cytoplasmic contents, although the overall cell shape was still recognizable. Altogether, our data are consistent with a high permeabilization potency of temporins towards *L. pneumophila* cells.

SHa reduces the number of intracellular *L. pneumophila* in both amoebae and macrophages. The intracellular state is crucial for the natural multiplication process of *L. pneumophila*. We therefore investigated the capacity of SHa and [K³]SHa to efficiently kill intracellular forms of *L. pneumophila*. Prior to these experiments, the toxicity of both peptides towards *Acanthamoeba castellanii* and THP-1-derived macrophages cells was first determined (Supplemental Fig. S1). In our conditions, even if quite similar half maximal lethal concentrations (LC_{50}) were observed for [K³]SHa (6.1 µM) and SHa (7.0

µM) against amoebae, SHa appeared to be less toxic against THP1-derived macrophages as the determined LC_{50} was 12.3 µM (5.6 µM for [K³]SHa). Therefore, the following experiments were conducted only with this peptide. So, we examined if SHa was stable within the THP-1 culture medium.

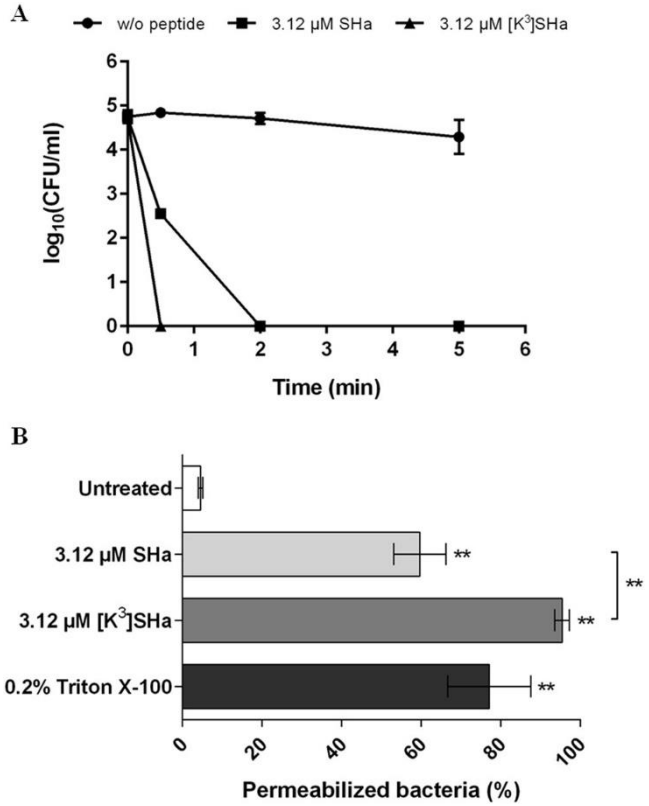


Figure 1. Bactericidal effect of SHa and [K³]SHa against *L. pneumophila* Lens (**A**) Time-kill curves of temporins. Exponential growth phase bacteria (10^5 CFU/ml) were diluted in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) and incubated 5 minutes with 3.12 µM SHa or [K³]SHa. Control corresponds to bacteria incubated in buffer without peptide. (**B**) Envelope permeabilization. Exponential growth phase bacteria (5.10^7 CFU/ml) were diluted in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) and incubated 5 minutes with peptides. Controls correspond to bacteria incubated in buffer without peptide (negative control) or with 0.2% Triton X-100 (positive control). Data were analyzed by nonparametric Mann-Whitney U test (two-tailed) using GraphPad Prism 6.0 software. **P < 0.01, compared to the untreated condition. Data represent the mean (±standard deviation, SD) of three independent experiments, each performed in duplicate. Error bars indicate SDs.

Using a LC-MS approach, we quantified the amount of SHa in RPMI medium just after dilution and also at the end of a 24 h incubation period at 37 °C. Hereafter, we assayed the activity of these samples against *L. pneumophila* Lens. LC/ESI-MS analysis of temporin-SHa in positive mode led to the observation of two intense pseudo-molecular ions at *m/z* 1380.6150 and 690.8583, which were assigned to the singly and doubly charged forms respectively (data not shown). We chose the pseudo-molecular ion at *m/z* 1380 to perform a calibration curve of SHa in serum-free RPMI medium before being able to quantify SHa after an incubation period at 37 °C. SHa was stable in this medium as a similar amount of peptide was present in our samples at t = 0 and t = 24 h (Supplemental Fig. S2A). Moreover, SHa was still active because an incubation of *L. pneumophila* Lens in these media samples for 1 h led to 80% decrease in cell viability (Supplemental Fig. S2B). Altogether, our results indicated that the slight loss of *L. pneumophila* load within THP-1-derived macrophages could be attributed directly or indirectly to SHa.

To address the question whether temporins could act on intracellular *L. pneumophila*, we followed the bacterial load inside cells upon SHa addition. *A. castellanii* and THP-1-derived macrophages were infected for 24 h with GFP-expressing *L. pneumophila* Lens (MOI = 20) and cells were simultaneously treated with SHa at different nontoxic concentrations, all being under LC_{50} values. SHa reduced the number of intracellular *L. pneumophila* within amoebae in a dose-dependent manner (Fig. 3A). At the highest concentration tested, more than 90% of *L. pneumophila* were killed. It is important to notice that the concentration of viable amoebae was only slightly affected by increased peptide concentrations (less than 5% mortality) and that the treatment did not compromise the viability of amoebae. In comparison, a lower bactericidal effect was obtained on intramacrophage *L. pneumophila* (52.3% of total population killed) at the highest SHa concentration tested (Fig. 3B). However, it should be stressed that *L. pneumophila* invasion induced a considerable reduction of the macrophage population (~90%)

as the initial seeding concentration was 1.10^6 cells per well, whereas the temporin treatment did not compromise the viability of remaining THP-1-derived macrophages (Fig. 3B).

SHa penetrates inside both amoebae and macrophages, spread into cytoplasm but not into vacuoles. To unravel whether temporin-SHa is able to enter into the cytoplasm of eukaryotic hosts used in this study and to be co-localized with *L. pneumophila*, a temporin-SHa labeled with the fluorescent dye Cy5 was

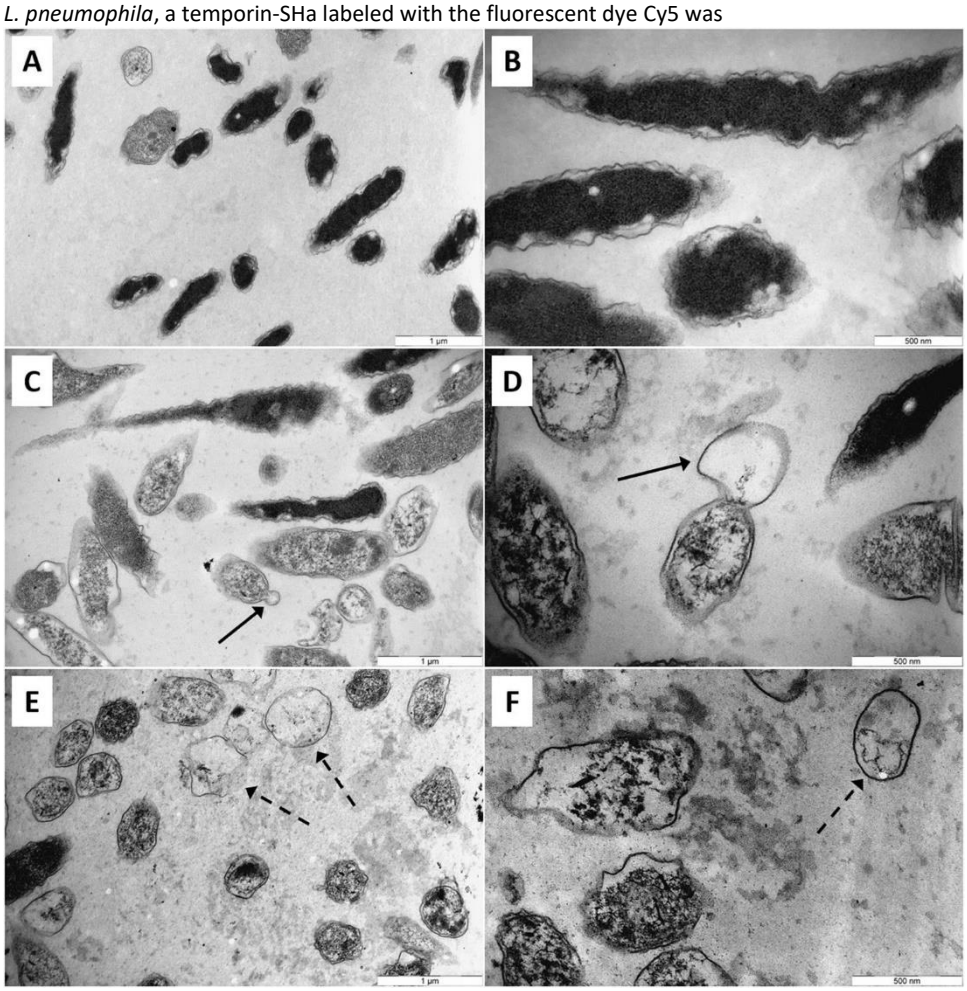


Figure 2. Transmission electron micrographs of *L. pneumophila* Lens exposed to temporins. Exponential growth phase bacteria (5.10^7 CFU/ml) were diluted in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) and incubated 5 minutes without peptide (**A,B**), with 3.12 µM SHa (**C,D**) or 3.12 µM [K^3]SHa (E,F). Solid arrows indicate blebs on cell surface and dashed arrows indicate ghost-like structures.

used to conduct an imaging study by confocal fluorescence microscopy. We primary determined the MIC value of Cy5-SHa analog against *L. pneumophila* Lens to ensure that the C-terminal modification of the labeled analog had no impact on the biological activity. The mean of MIC values was found to be identical (3.12 µM) to that of the parent peptide (data not shown). The second point we focused on was the capacity of Cy5-SHa to interact with *L. pneumophila* host cells. The peptide was able to enter into the cytoplasm of *A. castellanii* within 12 min upon addition (Supplemental Fig. S3A and Supplemental Movie S1). Interestingly, the red signal was not evenly distributed as all vacuoles remained non-fluorescent (Fig. 4). Moreover, changes of shape occurred in treated non-infected cells as some cells became round. When amoebae were infected with *L. pneumophila*, bacteria were seen in vacuoles but again, the peptide red signal was only localized into cytoplasm. Amoebae had also adopted a characteristic round shape. Similar data were obtained with THP-1-derived macrophages inside which the peptide penetrated within 10 minutes and it was only localized outside vacuoles into the cytoplasm (Supplemental Fig. S3B and Fig. 5). In order to verify whether the internalization of the peptide is not due to the dye by itself, we have performed live imaging assays with both amoebae and THP-1-derived macrophages (Supplemental Fig. S3A,B). With each cellular model, a quick entry of Cy5 maleimide alone was recorded while it took few minutes to detect the red fluorescence when the Cy5-SHa was used. This time lag between the curves reflects the time necessary for SHa accumulation. Therefore, SHa is able to penetrate into the cytoplasm but not within vacuoles independently of whether intracellular *L. pneumophila* are present or not. Intriguingly, we observed that the cell nucleolus of amoebae was also strongly labeled by the red fluorescence within 20

to 30 minutes (Fig. 6). This subcellular localization of SHa seems specific as nucleoli of macrophages remained unstained even after an observation period of 2 hours.

THP-1-derived macrophages do not produce antimicrobial peptides in response to SHa. To complete this analysis and further determine if the slight reduction of *L. pneumophila* load in macrophages could be due to additional factors, we have investigated the immune response of THP-1-derived macrophages by quantifying gene expression of proinflammatory markers (alarmin IL-1α, IL-8) and HDPs representative of different

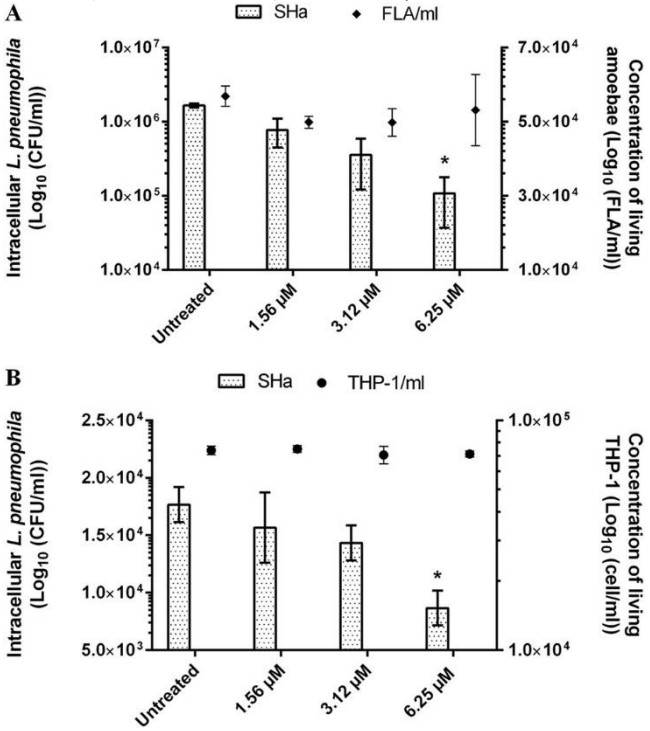


Figure 3. Survey of intracellular *L. pneumophila* Lens upon SHa addition. (**A**) *A. castellanii* were infected at MOI = 20 with GFP-expressing *L. pneumophila* Lens. FLA: free-living amoebae. (**B**) THP-1 cells were infected at MOI = 20 with GFP-expressing *L. pneumophila* Lens. Data were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison *post-hoc* test using GraphPad Prism 6.0 software. *P < 0.05 for the 6.25 µM condition when compared to the untreated condition. Data represent the mean (±standard deviation, SD) of three independent experiments, each performed in triplicate. Error bars indicate SDs.

families of cationic peptides expressed by human macrophages (S100A7, also known as psoriasin, cathelicidin LL-37, human-β-defensins hBD-1 and hBD-3) (Supplemental Fig. S4). As expected, upon addition of bacteria, a strong upregulation of the two proinflammatory markers known to be released by pathogen-activated macrophages, i.e. the IL-8 chemokine and the IL-1α, was observed at the mRNA level. However, the expression of these two markers remained unchanged when macrophages were exposed to SHa alone, as compared to the untreated control (Supplemental Fig. S4). When macrophages were infected with *L. pneumophila* and treated 24 h with SHa, no synergistic induction of mRNA of IL-8 and IL-1α was detected. Regarding the expression of HDPs, no significant difference between all our conditions was found, indicating that there is no induction of these peptides (Supplemental Fig. S4).

intracellular *L. pneumophila* are protected from the action of SHa within amoebae. In order to notice whether the integrity of intracellular *L. pneumophila* could be compromise, observations using TEM were performed on infected amoebae because the highest loss of bacterial population was obtained with this model. Representative micrographs are gathered in Fig. 7. Microscopic observations of uninfected and untreated *A. castellanii* revealed large trophozoïtes (active stage) with well discernible membranes (Fig. 7A,B). Cells contained numerous vacuoles of variable sizes and harbored a cytoplasm filled with mitochondria. When cells were treated with 6.25 µM SHa, most of them were still well formed. No relevant morphological changes were observed (Fig. 7C). However, some amoebae were lysed as illustrated in Fig. 7D. The membrane integrity was lost as well as the intracellular organization. Amoebae appeared more electron-lucent as compared to untreated cells and many intracellular tiny vesicles can be seen. The addition of *L. pneumophila* resulted in bacteria entry into *A. castellanii*. Thus, *L. pneumophila* started to multiply within a unique cell compartment, the *Legionella*-containing vacuole (LCV) as illustrated in Fig. 7E,F. This enlarged vacuole was surrounded by numerous mitochondria. High *L. pneumophila* loads can be achieved before host death and then, bacteria could escape from this LCV. Vacuoles are visible inside bacteria and formed white patches. Finally, when *A. castellanii* were infected with *L. pneumophila* and then treated with 6.25 µM SHa, similar

micrographs were obtained after observations of samples. Indeed, numerous dead or alive amoebae filled with bacteria were seen (Fig. 7G,H). Altogether, these data highlighted that *L. pneumophila* bacteria are protected from effects of SHa inside the LCV, indicating that the reduction of intracellular bacteria observed in this study is probably due to a host response rather than a direct effect of temporin.

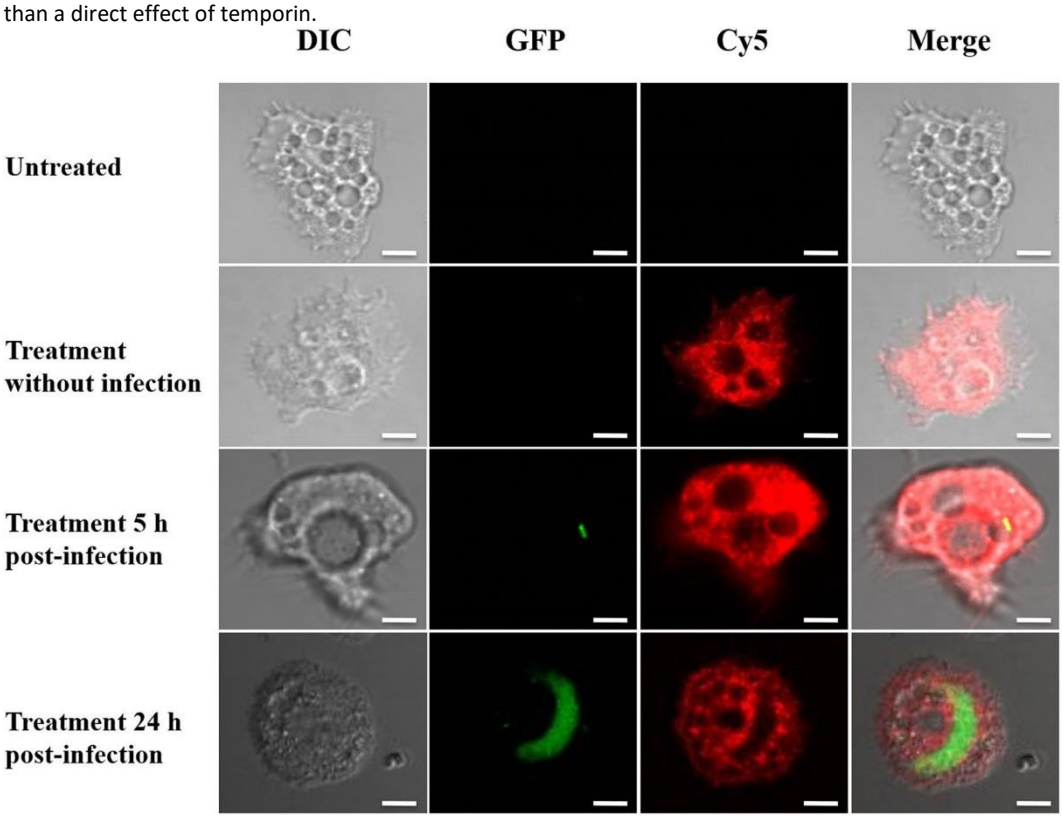


Figure 4. Confocal laser scanning microscopy images of infected *A. castellanii* cells (5 h or 24 h post-infection) with GFP-expressing *L. pneumophila* and treated with Cy5-SHa for 2 h. The first column shows differential interference contrast (DIC) images, the second one shows the GFP fluorescence signal from *L. pneumophila*, the third column shows the Cy5-SHa signal, and the last column shows the overlay of the two fluorescence signals. All bars represent 10 µm.

2 Discussion

HDPs from the temporin family are currently considered as good candidates for the generation of new class of peptide-based anti-infective therapeutics[1,8]. Biological activities of both parent peptides and analogs are widely described throughout the literature and include (i) direct broad-spectrum activity against bacterial, fungal or parasitic pathogens[9,10,16,17,21,22], (ii) anti-Herpes simplex virus type 1 activity[23,24], (iii) stimulation of human cells migration such as keratinocytes, monocytes and neutrophils[27,33], (iv) endotoxin neutralization[34,35], (v) chemoattraction of human phagocytes[33]; (vi) antibacterial/antiadhesive effect when grafted on surface[36,37], (vii) antibiofilm properties[38,39] and (viii) killing of intracellular microorganisms[10,17,27]. While temporins are mainly active against Gram-positive bacteria, only a few members exhibit a wider spectrum including Gram-negative bacteria, yeasts and parasites. Among those peptides, SHa[16] has emerged as an interesting compound, with potent broad-spectrum activity, to study in depth the potency of temporins to kill intracellular organisms. Indeed, SHa and a recently designed analog with an increased positive net charge (from +2 to +3), [K^3]SHa, were shown to efficiently kill intracellular forms of the human parasite *Leishmania*[17]. Moreover, they both inhibited intracellular steps of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) replication in human primary keratinocytes[24]. Regarding activity of temporins against intracellular bacterial microorganisms, the only example concerns temporin-Tb, and also to a lesser extent temporin-Ta, that were described to be able to kill *S. aureus* within keratinocytes[27]. However, to the better of our knowledge, intracellular killing of Gram-negative bacteria was never demonstrated although several Gram-negative species are of clinical interest, i.e. some ESKAPE pathogens or *L. pneumophila*[40–42]. *L. pneumophila* is able to survive and to multiply inside several hosts, mostly aquatic protozoan, but accidentally inside human alveolar macrophages[43]. This capacity is fundamental for the *Legionella* pathogenesis and can lead to the development of Legionnaires' disease, a severe and sometimes fatal pneumonia. *L. pneumophila* adopt a biphasic and reciprocal intracellular life cycle in which bacteria alternate between a replicative form and a distinct transmissive form[30]. The transmissive state is activated when nutrients become limiting within host cell and allowed bacteria to evade from this host, then survive in the extracellular environment until the invasion of a new appropriate host[30,44–46]. Moreover, *L. pneumophila* is armed with a Dot/Icm type IV secretion system with over 330 proteins secreted that represent over 10% of the bacterium proteome[47]. This astonishing number of secreted proteins is believed to enable *L. pneumophila* to better replicate inside numerous hosts. We therefore focused our interest on this intriguing Gram-negative bacterium in association

with two overused models, *Acanthmoeba castellanii* and THP-1-derived macrophages, and wondered if temporins could target both extracellular and intracellular *L. pneumophila*.

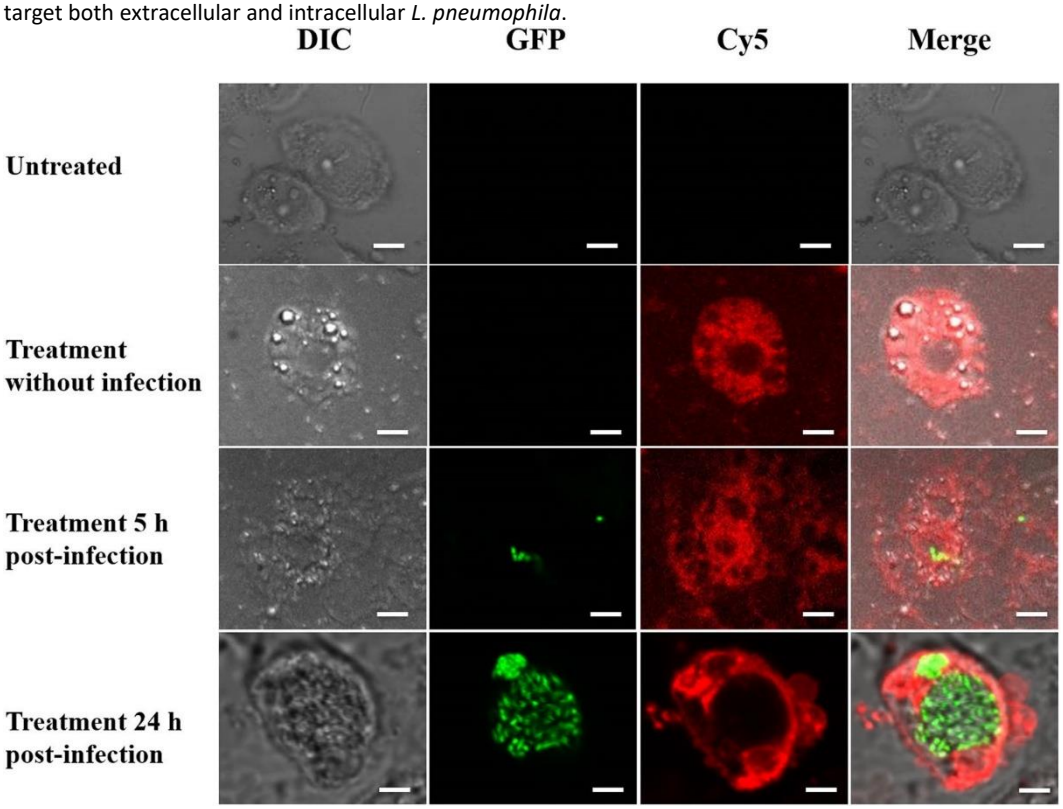


Figure 5. Confocal laser scanning microscopy images of infected THP-1-derived macrophages (5 h or 24 h postinfection) with GFP-expressing *L. pneumophila* and treated with Cy5-SHa for 2 h. The first column shows differential interference contrast (DIC) images, the second one shows the GFP fluorescence signal from *L. pneumophila*, the third column shows the Cy5-SHa signal, and the last column shows the overlay of the two fluorescence signals. All bars represent 10 µm.

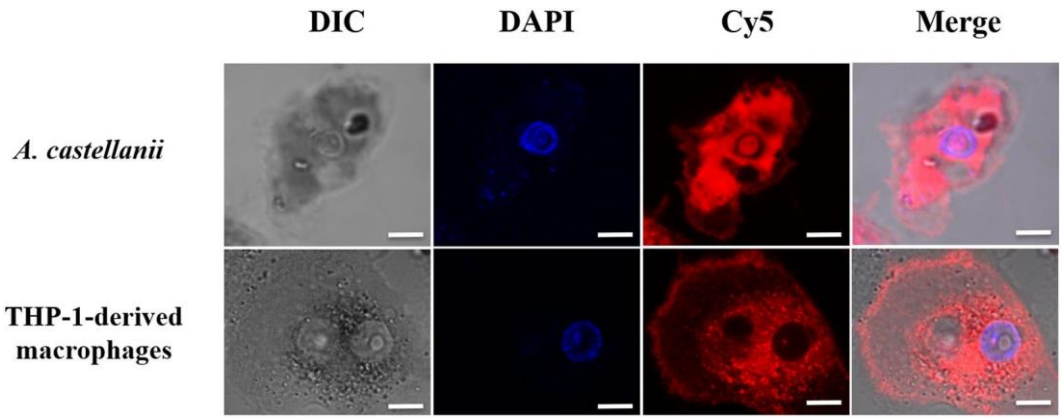


Figure 6. Confocal laser scanning microscopy images of *A. castellanii* and THP-1-derived macrophages treated with Cy5-SHa for 2 h. The first column shows differential interference contrast (DIC) images, the second column shows the DAPI fluorescence signal, the third column shows the Cy5-SHa signal, and the last column shows the overlay of the two fluorescence signals. All bars represent 10 µm.

First, the activity of both temporins was evaluated on extracellular *Legionella* sp. in order to determine inhibitory concentrations. SHa and [K^3]SHa were able to totally inhibit the growth of *Legionella* sp. at similar concentrations (MICs mainly between 3.12–6.25 µM). Moreover, all *Legionella* tested were sensitive including different species of clinical importance, like *L. feeleii*[48] and *L. longbeachae*[49], but also different serogroups of the major clinical species, *L. pneumophila*. Up to now, only the susceptibility of six Gram-negative strains (*A. baumannii*, 2 strains of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. enterica*) was tested and published data showed that [K^3] SHa was more efficient than the parent peptide[17]. Indeed,

MICs values for SHa ranged from 6 µM (*A. baumannii* ATCC 19606) to 50 µM (*P. aeruginosa* ATCC 27853) while they were equal to 3 µM or 6 µM for [K³]SHa.

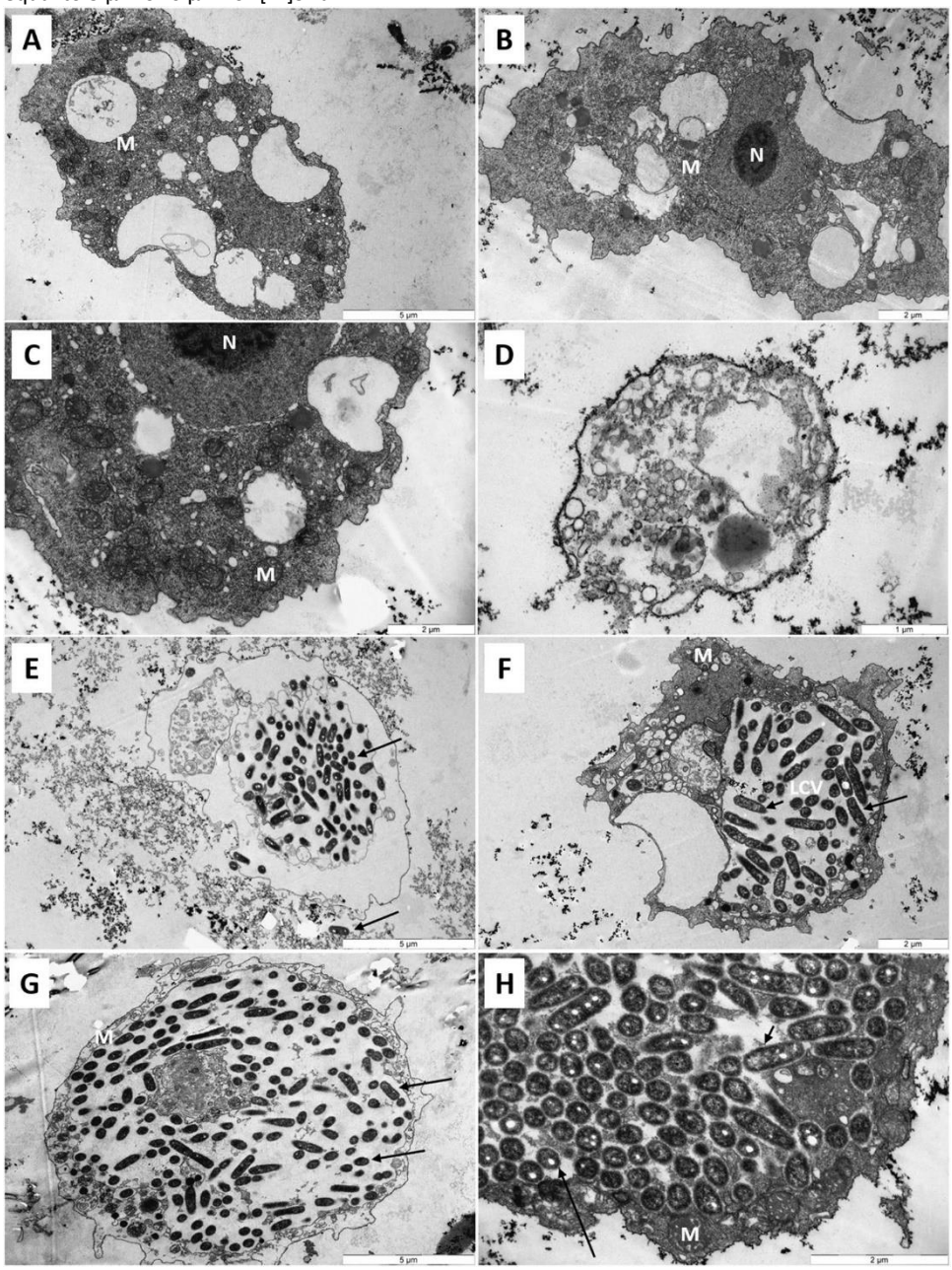


Figure 7. Transmission electron micrographs of *Acanthamoeba castellanii* infected or not with *L. pneumophila* Lens and treated or not with SHa. Untreated and uninfected cells (**A,B**), uninfected cells treated with 6.25 µM SHa (**C,D**), *L. pneumophila*-infected cells (**E,F**), *L. pneumophila*-infected cells treated with 6.25 µM SHa (**G,H**). LCV, *Legionella*-containing vacuole; M, mitochondria; N, nucleus. *L. pneumophila* are pointed with black arrows.

Legionella sp. can thus be added to the short list of Gram-negative bacteria sensitive to temporins. In addition, MIC values determined in this study are in the same micromolar range as MIC values obtained for the most efficient AMPs already described in the literature as anti-*Legionella* agents, i.e. warnericin RK, δ-hemolysin I and II, and Phenol-Soluble Modulins (PSMs) α and β[50,51]. SHa and [K³]SHa can therefore be considered as potent anti-*Legionella* AMPs. Time-kill study revealed that both peptides displayed a fast-bactericidal effect on *L. pneumophila* Lens. The loss of *L. pneumophila* viability occurred within 30 s for [K³]SHa while 2 min were needed for SHa to achieve similar results. These data are in line with a previous study showing that the bactericidal activity of the [K³]SHa analog was more efficient[17]. To go further in studying the mechanism of action, we noticed that this rapid loss of viability was accompanied by a cell permeabilization, which could attain up to 95% for [K³]SHa at a concentration equal to the MIC. Visualization of this activity was provided by transmission electron microscopy. Indeed, *L. pneumophila* cells were deeply damaged by both temporins, and lost the structural integrity of their

cell wall. Taken together, our data indicate that killing of *L. pneumophila* by SHa and its analog occurs through a membranolytic mechanism involving rapid permeabilization, as it was previously described[17].

Before starting to study the intracellular activity of temporins, we determined whether SHa and [K³]SHa were toxic for eukaryotic host cells. At concentrations above 10 µM (3-fold above the MIC), both peptides were toxic for *A. castellanii* and, to a lesser extent, for THP-1 cells. Surprisingly, Raja and coworkers obtained different LC_{50} values towards human THP-1-derived macrophages for SHa (60 µM) and [K³]SHa (55 µM)[17]. This could be explained by the fact that we used a XTT-based colorimetric assay while they determined the cell viability using Trypan blue staining. Overall, a lower toxicity was determined for SHa in our conditions and so we decided to perform intracellular assays with this peptide only. SHa, when used at concentrations below LC_{50} values, can reduce the amount of *L. pneumophila* inside eukaryotic host cells in a dose dependent-manner. At the highest non-toxic dose tested (6.25 µM), more than 90% *L. pneumophila* were killed within amoebae and about 50% within macrophages. Similar results were obtained for temporin-Tb with *S. aureus*-infected HaCaT keratinocytes[27]. Di Grazia and collaborators recorded a bacterial decrease of 80% within 2 h at 16 µM, a dose 4 times higher than the MIC. However, as far as we know, it is the first time that such an intracellular activity was demonstrated for temporins acting on Gram-negative bacteria. It is also important to stress that we observed an early loss of macrophages during the infection with *L. pneumophila* even if remaining cells were not injured by SHa. Those data are fully in agreement with previous studies showing that protozoan hosts are much more tolerant than macrophages to *Legionella* infection, obviously because this bacterium grows rapidly in macrophages and can induces early apoptosis[44,52,53]. To distinguish whether SHa could be internalized into host cells or remained trapped at the cell surface, we used Cy5-SHa and visualized that the peptide was able to rapidly enter amoebae and macrophages. Cy5-SHa was able to evenly diffuse within cytoplasm but not inside vacuoles. Also, the peptide was shown to accumulate at cell nucleolus. The nucleolus, which is the largest subnuclear structure in eukaryotic nuclei, is the place of rRNA synthesis, assembly of ribosomes and diverse ribonucleoprotein particles[54]. Our data clearly indicate that Cy5-SHa can accumulate into the nucleus of living amoebae but not into the nucleus of living macrophages. Di Grazia and collaborators have previously shown that rhodamine-labeled temporins Tb and Ta were able to enter uninfected HaCaT keratinocytes within 30 min and to diffuse into the cytoplasm, but without entering into the nucleus[27]. What remains unclear is how SHa enters into nuclei, and why there is such a difference between amoebae and macrophages. To date, several proteins/peptides have been described to localize and accumulate in the nucleolus of living cells[54]. These molecules are cationic, highly basic and contain arginines and/ or lysines. The presence of specific sequences enriched in those positively charged amino acids defines nucleolar localization signals (NoLSs)[55]. Remarkably, SHa does not have clusters of basic amino acids as it contains only one lysine and is C-terminally amidated. However, the accumulation of SHa inside nucleoli suggests that the peptide is able to locate its target inside the nucleus as no evidence of a barrier separating the nucleolus from the surrounding nucleoplasm were provided. It is proposed that this accumulation is due to high-affinity interactions with core nucleolar components[56]. Experiments are thus to be conducted to find the precise target of SHa inside nucleoli.

Although the mechanism of action responsible for the killing activity of intracellular *L. pneumophila* is not completely deciphered, we believe that it occurred through an indirect effect of SHa once internalized. As we cannot exclude side processes to be involved in this bacterial load decrease upon peptide treatment, we explored some cellular factors commonly involved in host/pathogen interaction using macrophages. A focus was therefore made on proinflammatory markers and additional HDPs that could be produced after *Legionella* addition and be present in the medium besides SHa. As expected, when macrophages were exposed to *L. pneumophila*, in the presence or the absence of SHa, they responded by an increased expression of IL-1α and IL-8. However, no induction of other HDP genes was detected, suggesting that SHa was the sole peptide present in the culture medium supporting the antibacterial activity in our *in vitro* infection conditions.

In summary, temporin SHa is a potent antibacterial peptide able to act on both extracellular and intracellular *L. pneumophila*. This frog HDP can kill internalized *L. pneumophila* within *A. castellanii* and THP-1-derived macrophages without being toxic for host cells. After addition to the medium, it rapidly penetrates cells and diffuses evenly in the cytoplasm but not inside vacuoles. Remarkably, it can also concentrate inside the nuclear compartment, more specifically in the nucleolus. Further studies will thus be necessary to better understand the mechanism of action subtending the killing of intracellular *Legionella* and the relationship between this killing and the absence of peptide in vacuoles where *L. pneumophila* replicates. Temporin-SHa and analogs thus represent interesting candidates to gain insight into eradication of pathogens inside living hosts.

3 Methods

Microorganisms, cell lines and culture conditions. Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *Legionella* strains were cultured at 37 °C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates for 96 h or in buffered yeast extract (BYE) liquid medium for 30 h under shaking (150 rpm). Growth of the strains was monitored by measuring the optical density of cultures at 600 nm. *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 was obtained from the American Type Culture Collection. Axenic *Acanthamoebae* were grown in peptone yeast glucose (PYG) medium and incubated at 30 °C. THP-1 monocyte cells (ATCC TIB202) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 u/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (all from Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) at 37 °C and 5% CO_2. Cells were differentiated into macrophages with 50 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 96 h. Treatment with temporins and infections with *L. pneumophila* were performed using cells cultivated in serum-free and antibiotics-free RPMI medium.

peptides synthesis and reagents. Temporin-SHa (SHa, $FLSGIVGMLGKLF_{NH2}$), its enantiomer D-temporin-SHa (D-SHa, corresponding to SHa in the all-D α-C configuration), and [K³]temporin-SHa (SHa with Ser³ residue replaced with Lys), were synthesized using solid-phase standard Fmoc chemistry protocols, as previously described[57] but with the following modifications. Synthesis was carried out on a CEM Liberty Blue automated microwave peptide synthesizer (CEM Corporation,

Peptide Synthesis Platform, IBPS, Sorbonne University, Paris, France) using Protide Rink Amide LL resin (CEM Corporation, USA, 0.19 mmol/g substitution). Post-deprotection washing with N, N-dimethylformamide (DMF) was followed by coupling using a diisopropyl carbodiimide (DIC)/Oxyma activation method. The peptidyl resin was cleaved and deprotected by incubation (3 h at room temperature) with an acidic mixture containing 94% trifluoroacetic acid (TFA), 1% triisopropylsilane (TIS), 2.5% H_2O and 2.5% 1,2-ethanedithiol (EDT). Resin was removed by filtration and the peptide was precipitated in cold ether. The crude material was then subjected to semi-preparative RP-HPLC on a Phenomenex Luna C18(2) LC column (100 Å, 250 × 10 mm). Elution was performed at a flow rate of 5 mL/min by a 20–70% linear gradient of ACN (0.07% TFA) in 0.1% TFA/water (1% ACN/min). Peptide purity was assessed by RP-HPLC using an analytical Aeris PEPTIDE column (XB-C18, 3.6 µm, 4.6 ×. 250 mm, Phenomenex). Elution was performed at 0.75 mL/min using the same linear gradient of acetonitrile mentioned above, followed by MALDI-TOF analysis (Mass Spectrometry and Proteomics Platform, IBPS, Sorbonne University, Paris, France). Fluorescent temporin-SHa (SHa-Cy5) was obtained from Genscript (Piscataway, USA) by synthesizing the analog [C^{13}]temporin-SHa (FLSGIVGMLGKLC$_{amide}$), and then by labeling thiol group of the Cys^{13} residue with maleimide-activated Cyanine5 dye. Control experiments were conducted with the Cyanine5 maleimide dye alone so it was purchased from abcam (Cambridge, United Kingdom).

Antimicrobial assays. Activity against *Legionella* strains was assessed with a liquid growth inhibition assay performed in 96-well microtitration plates, according to a previously described protocol[50]. Minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of temporins that fully inhibits the growth of a given *Legionella* strain after 96 h at 37 °C. MICs were determined as the mean value of three independent experiments, each performed in duplicate.

time-killing and envelope permeabilization assays. Time-killing and envelope permeabilization assays were conducted according to methods detailed elsewhere[58]. Temporins were used at a final concentration of 3.12 µM. Three experiments were carried out in duplicate for each assay.

intracellular killing of *L. pneumophila*. At confluence, *A. castellanii* were seeded in 24 wells plates at 5.10^4 trophozoites/well one hour in Page's Amoeba Saline solution (PAS). Once cells adhered, bacteria were added as follow. Cultures of GFP-expressing *L. pneumophila* Lens were picked from a plate, diluted in BYE medium (OD_{600} = 0.1) and grown overnight at 37 °C under constant shaking (180 rpm). Bacteria were washed and diluted in PAS buffer, and 100 µL of suspension was added to each well such that it contains 1×10^6 bacteria (MOI = 20). Plates were incubated at 30 °C for 24 h. THP-1 cells were seeded into 24-well plates at a cell density of 1.0×10^6 cells/well, and differentiated into macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/ml, Sigma) for 72 h. Then cells were infected with bacteria to reach 2.10^7 bacteria/well (MOI = 20) in RPMI medium without antibiotics at 37 °C for 24 h. Infections were synchronized by centrifugation at 500 × g, 30 °C for 10 min. The cells were washed 3 h post-infection to discard extracellular bacteria. Peptides, diluted in PAS buffer or RPMI, were added 5 h post-infection. 24 h post-infection cells were washed and resuspended in PBS by scraping for amoebae and by trypsin treatment during 10 min at 37 °C for macrophages. To break up, cells were vortexed with FastPrep-24™ 5 G, twice at 6 M/s during 30 s and 1 min in ice. Suspensions were then spread onto BCYE agar plates. After 72 h at 37 °C, the number of colony forming units (CFU) of *L. pneumophila* was counted. Each infection was carried out in triplicate. **transmission electron microscopy (teM).** TEM analyses were conducted as previously described[58].

confocal laser scanning microscopy. *A. castellanii* ATCC 30010 (5.0×10^4 cells) or THP-1-derived macrophages (1.0×10^6 cells) were infected with *L. pneumophila* Lens GFP at a MOI of 20 in a 8-well IbiTreat µ-slide microscopy chamber (Ibidi). When needed, a fresh DAPI staining solution was added at a final concentration of 9.3 nM. Images were acquired with CLSM from Olympus (FV1000). GFP and Cyanine 5 fluorescence were obtained sequentially with 488 nm and 543 nm laser line excitation and spectral detection between 500–530 nm and 555–655 nm respectively. Live imaging started directly after adding Cy5-SHa 5 or 24 h post-infection. Time lapse imaging was performed with planApo N x60 oil 1.4 NA objective and numerical zooming (800 × 800 pixels, 0.12 µm/pixel). One image was recorded every 15 seconds. Images and films were then analyzed using the ImageJ software.

cytotoxicity assay. PMA-induced THP-1 macrophages were previously treated with 10 µg/ml mitomycin C (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) in RPMI for 2 h before treatment with SHa or [K^3]SHa for 24 h. Cytotoxicity was measured using a XTT-based assay according to the manufacturer's instructions (Roche). Amoebae were incubated with peptide for 24 h at 30 °C. After incubation, cells were washed twice with 1 ml of PAS and adherent cells were harvested and counted for each condition using FastRead counting slides 102 (Biosigma). LC_{50} (concentration of peptide inducing 50% cell death) was calculated with GraphPad Prism 6.0 software and corresponds to the mean obtained from three independent experiments carried out in triplicate. **transcriptional analysis.** Transcriptional analyses by RT-qPCR were performed as described elsewhere[59].

Stability assay. Stability of temporin-SHa incubated in RPMI 1640 medium at 37 °C was assayed by LC/ ESI-MS titration with a XevoQ-TOF (Waters, Milford, MA, USA) mass spectrometer as previously described[58] but with minor modifications. A calibration curve was first built using serial dilutions of SHa in RPMI 1640 medium without fetal calf serum. A volume of 10 µl was injected for each sample. LC/ESI-MS mass spectra were performed in positive mode with a cone voltage ramping from 20 to 40 V. The spray voltage was set to 3.0 kV, the source temperature to 120 °C and the desolvation temperature to 450 °C. The LC separation was conducted on a ProSwift® RP-1S (Dionex) analytical reverse- phase HPLC column (4.6 mm × 50 mm). Separation was carried out using a water/acetonitrile/formic acid 0.2% (v/v) solvent system. After an initial 2 min wash with 15% acetonitrile, elution was achieved at a flow rate of 0.6 ml/min with a 7 min linear gradient from 15 to 90% acetonitrile,

followed by a 2 min wash with 90% acetonitrile. In a second step, 70 µg SHa were initially diluted in 1 ml RPMI and incubated 24 h at 37 °C. Samples were analyzed at t = 0 and t = 24 h. In parallel, exponentially growing *L. pneumophila* Lens were added to each sample (t = 0 and t = 24 h) at a final concentration of 5.10^7 CFU/ml. Then, 70 µg SHa (50 µM) were added to each bacterial suspension. Samples were incubated for 45 min at 37 °C and stained with propidium iodide (PI) for 15 min in the dark at room temperature. Measurements were performed on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Roissy, France). A total of 30,000 events were recorded in each sample. Three experiments were carried out and the patterns were reproducible.

Received: 3 November 2019; Accepted: 13 February 2020; Published: xx xx xxxx
Published online: 04 March 2020

References

1. Ladram, A. & Nicolas, P. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Front. Biosci. Landmark* **21**, 1341–1371 (2016).
2. Hancock, R. E. W., Haney, E. F. & Gill, E. E. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 321–334 (2016).
3. Haney, E. F., Straus, S. K. & Hancock, R. E. W. Reassessing the Host Defense Peptide Landscape. *Front. Chem.* **7**, 43 (2019).
4. Pantic, J. M. *et al*. The potential of frog skin-derived peptides for development into therapeutically-valuable immunomodulatory agents. *Molecules* **22**, 2071 (2017).
5. Conlon, J. M., Mechkarska, M., Lukic, M. L. & Flatt, P. R. Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides* **57**, 67–77 (2014).
6. Seo, M. D., Won, H. S., Kim, J. H., Mishig-Ochir, T. & Lee, B. J. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. *Molecules* **17**, 12276–12286 (2012).
7. Mangoni, M. L. & Shai, Y. Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: Similarities and differences in cell specificities and modes of action. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2267–2280 (2011).
8. Mangoni, M. L., Di Grazia, A., Cappiello, F., Casciaro, B. & Luca, V. Naturally Occurring Peptides from Rana temporaria: Antimicrobial Properties and More. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 54–64 (2016).
9. Abbassi, F. *et al*. Temporin-SHf, a new type of Phe-rich and hydrophobic ultrashort antimicrobial peptide. *J. Biol. Chem.* **285**, 16880–16892 (2010).
10. Abbassi, F. *et al*. Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. *Biochimie* **95**, 388–399 (2013).
11. Rinaldi, A. C. & Conlon, J. M. Temporins. *Handbook of Biologically Active Peptides (Elsevier Inc.)*., https://doi.org/10.1016/C2010-066490-X (2013).
12. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1087–D1093 (2016).
13. Wade, D. *et al*. Antibacterial activities of temporin A analogs. *FEBS Lett.* **479**, 6–9 (2000).
14. Mangoni, M. L. *et al*. Structure-activity relationship, conformational and biological studies of temporin L analogues. *J. Med. Chem.* **54**, 1298–1307 (2011).
15. Urbán, E., Nagy, E., Pál, T., Sonnevend, Á. & Conlon, J. M. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* **29**, 317–321 (2007).
16. Abbassi, F. *et al*. Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid Pelophylax saharica. *Peptides* **29**, 1526–1533 (2008).
17. Raja, Z. *et al*. Insight into the mechanism of action of temporin-SHa, a new broad-spectrum antiparasitic and antibacterial agent. *PLoS One* **12**, e0174024 (2017).
18. Grieco, P. *et al*. The effect of d-amino acid substitution on the selectivity of temporin L towards target cells: Identification of a potent anti-Candida peptide. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 652–660 (2013).
19. Conlon, J. M. *et al*. Effect of aminoisobutyric acid (Aib) substitutions on the antimicrobial and cytolytic activities of the frog skin peptide, temporin-1DRa. *Peptides* **28**, 2075–2080 (2007).
20. André, S. *et al*. Structure-Activity Relationship-based Optimization of Small Temporin-SHf Analogs with Potent Antibacterial Activity. *ACS Chem. Biol.* **10**, 2257–2266 (2015).
21. Mangoni, M. L. *et al*. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 984–990 (2005).
22. Eggimann, G. A. *et al*. The role of phosphoglycans in the susceptibility of Leishmania mexicana to the temporin family of antimicrobial peptides. *Molecules* **20**, 2775–2785 (2015).
23. Marcocci, M. E. *et al*. The amphibian antimicrobial peptide temporin b inhibits *in vitro* herpes simplex virus 1 infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e02367–17 (2018).
24. Roy, M. *et al*. Comparison of anti-viral activity of frog skin anti-microbial peptides temporin-sha and [K 3]SHa to LL-37 and temporin-Tb against herpes simplex virus type 1. *Viruses* **11**, 77 (2019).
25. Alvar, J. *et al*. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* **7**, e35671 (2012).
26. Chinchar, V. G. *et al*. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* **323**, 268–275 (2004).
27. Grazia, A. D., Luca, V., Segev-zarko, L. T., Shai, Y. & Mangoni, L. Temporins A and B Stimulate Migration of HaCaT Keratinocytes and Kill Intracellular Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2520–2527 (2014).
28. Newton, H. J., Ang, D. K. Y., Van Driel, I. R. & Hartland, E. L. Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 274–298 (2010).
29. Abu Khweek, A. & Amer, A. O. Factors mediating environmental biofilm formation by Legionella pneumophila. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 38 (2018).
30. Oliva, G., Sahr, T. & Buchrieser, C. The Life Cycle of L. pneumophila: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 3 (2018).
31. Berjeaud, J. M. *et al*. Legionella pneumophila: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. *Front. Microbiol.* **7**, 486 (2016).

32. Birteksoz-Tan, A. S., Zeybek, Z., Hacioglu, M., Savage, P. B. & Bozkurt-Guzel, C. *In vitro* activities of antimicrobial peptides and ceragenins against Legionella pneumophila. *J. Antibiot. (Tokyo).* **72**, 291–297 (2019).
33. Chen, Q. *et al*. Temporin A and Related Frog Antimicrobial Peptides Use Formyl Peptide Receptor-Like 1 as a Receptor to Chemoattract Phagocytes. *J. Immunol.* **173**, 2652–2659 (2004).
34. Mangoni, M. L. *et al*. Lipopolysaccharide, a key molecule involved in the synergism between temporins in inhibiting bacterial growth and in endotoxin neutralization. *J. Biol. Chem.* **283**, 22907–22917 (2008).
35. Srivastava, S., Kumar, A., Tripathi, A. K., Tandon, A. & Ghosh, J. K. Modulation of anti-endotoxin property of Temporin L by minor amino acid substitution in identified phenylalanine zipper sequence. *Biochem. J.* **473**, 4045–4062 (2016).
36. Oger, P. C., Piesse, C., Ladram, A. & Humblot, V. Engineering of antimicrobial surfaces by using temporin analogs to tune the biocidal/antiadhesive effect. *Molecules* **24**, 814 (2019).
37. Lombana, A. *et al*. Temporin-SHa peptides grafted on gold surfaces display antibacterial activity. *J. Pept. Sci.* **20**, 563–569 (2014).
38. Grassi, L., Maisetta, G., Maccari, G., Esin, S. & Batoni, G. Analogs of the frog-skin antimicrobial peptide temporin 1Tb exhibit a wider spectrum of activity and a stronger antibiofilm potential as compared to the parental peptide. *Front. Chem.* **5**, 24 (2017).
39. Maisetta, G. *et al*. Anti-biofilm properties of the antimicrobial peptide temporin 1Tb and its ability, in combination with EDTA, to eradicate Staphylococcus epidermidis biofilms on silicone catheters. *Biofouling* **32**, 787–800 (2016).
40. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. & Pardesi, K. R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front. Microbiol.* **10**, 539 (2019).
41. Chahin, A. & Opal, S. M. Severe Pneumonia Caused by Legionella pneumophila: Differential Diagnosis and Therapeutic Considerations. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **31**, 111–121 (2017).
42. Ducarmon, Q. R. *et al*. Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **83**, e00007–19 (2019).
43. Boamah, D. K., Zhou, G., Ensminger, A. W. & O'Connor, T. J. From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of Legionella. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 477 (2017).
44. Garduño, R. A., Garduño, E., Hiltz, M. & Hoffman, P. S. Intracellular growth of Legionella pneumophila gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect. Immun.* **70**, 6273–6283 (2002).
45. Robertson, P., Abdelhady, H. & Garduño, R. A. The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen-the developmental network of Legionella pneumophila. *Front. Microbiol.* **5**, 670 (2014).
46. Hughes, E. D., Byrne, B. G. & Swanson, M. S. A Two-Component System that Modulates Cyclic-di-GMP Metabolism Promotes Legionella pneumophila Differentiation and Viability in Low-Nutrient Conditions. *J. Bacteriol.*, https://doi.org/10.1128/JB.00253-19 (2019).
47. Gomez-Valero, L. & Buchrieser, C. Intracellular parasitism, the driving force of evolution of Legionella pneumophila and the genus Legionella. *Genes Immun.* **20**, 394–402 (2019).
48. Wang, C., Chuai, X. & Liang, M. Legionella feeleii: pneumonia or Pontiac fever? Bacterial virulence traits and host immune response. *Med. Microbiol. Immunol.* **208**, 25–32 (2019).
49. Isenman, H. L. *et al*. Legionnaires' disease caused by Legionella longbeachae: Clinical features and outcomes of 107 cases from an endemic area. *Respirology* **21**, 1292–1299 (2016).
50. Verdon, J., Berjeaud, J.-M., Lacombe, C. & Héchard, Y. Characterization of anti-Legionella activity of warnericin RK and delta-lysin I from Staphylococcus warneri. *Peptides* **29**, 978–984 (2008).
51. Marchand, A. *et al*. Anti-Legionella activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides* **32**, 845–851 (2011).
52. Müller, A., Hacker, J. & Brand, B. C. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by Legionella pneumophila infection. *Infect. Immun.* **64**, 4900–4906 (1996).
53. Hägele, S., Hacker, J. & Brand, B. C. Legionella pneumophila kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**, 51–58 (1998).
54. Martin, R. M. *et al*. Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus* **6**, 314–325 (2015).
55. Musinova, Y. R., Kananykhina, E. Y., Potashnikova, D. M., Lisitsyna, O. M. & Sheval, E. V. A charge-dependent mechanism is responsible for the dynamic accumulation of proteins inside nucleoli. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**, 101–110 (2015). 56. Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. & Campos, I. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **2**, E107–E112 (2000).
57. Raja, Z. *et al*. Structure, Antimicrobial Activities and Mode of Interaction with Membranes of Bovel Phylloseptins from the PaintedBelly Leaf Frog, Phyllomedusa sauvagii. *Plos One* **8**, e70782 (2013).
58. Verdon, J. *et al*. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean Armadillidium vulgare, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front. Microbiol.* **7**, 1484 (2016).
59. Pohin, M. *et al*. Development of a new model of reconstituted mouse epidermis and characterization of its response to proinflammatory cytokines. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e1098–e1107 (2018).

Acknowledgements

We thank E. Bere (ImageUP, University of Poitiers) for expert technical advice with electronic microscopy and C. Piesse (Peptide Synthesis Platform, IBPS, Sorbonne University) for assistance in the synthesis and purification of peptides. This work was supported by the French Center of Scientific Research (CNRS), the University of Poitiers and the EBI laboratory. A part of this work was also supported by funds from Sorbonne University.

Author contributions

A.C., J.F.J., J.M.B., A.L. and J.V. conceived and designed the study. A.C., J.F.J., S.A., F.E., A.C., A.C. and J.V. conducted the experiments. A.C., J.F.J., J.M.B., A.L. and J.V. analyzed the results and wrote the paper. All authors reviewed the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-020-60829-2.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.V.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

C. Affiches

1. Société Française de microbiologie, octobre 2019

Sensibilité *in vitro* de souches du microbiote intestinal aux antibiotiques

Florine Ecalle[1], Abdel-Aziz El Houari[1], Stéphanie Crapart[1], Manilduth Ramnath[2], Jean-Marc Berjeaud[1], Marie-Hélène Rodier[1,3], Alexandre Crépin[1]

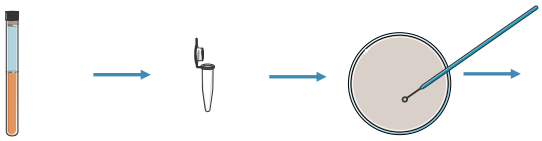
[1] Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 86073, Poitiers, France.
[2] Eurofins CEREP France, Le bois l'Evêque, 86600 Celle-Lévescault, France
[3] Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU de Poitiers, France

Contexte et but de l'étude

- La prise d'antibiotique peut provoquer une symptomatologie intestinale indésirable
- Pas de données sur l'effet des antibiotiques sur les bactéries commensales du microbiote intestinal

Déterminer la sensibilité de 17 souches bactériennes représentant une partie du socle commun du microbiote intestinal vis -à-vis de 7 antibiotiques les plus couramment prescrits représentant différentes classes

Méthodologie



Pré-culture *overnight* en milieu mGam à 37°C en chambre anaérobie

Suspension à 1.10^7 UFC/mL dans du mGam

Etalement de 100 µl sur une gélose mGam

Dépôt des disques antibiotiques sur géloses ensemencées

Incubation à 37°C dans l'enceinte anaérobie 48h



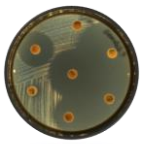
Enceinte anaérobie Bactron 300

- **Milieu unique pour souches bactériennes anaérobies :** mGam (Maier *et al*., 2018)
- **Disques antibiotiques** : Amoxicilline 20 µg (AMO 20) ; Amoxicilline/Acide Clavulanique 30 µg (AMC 30) ; Métronidazole 4 µg (MTR 4) ; Erythromycine 15 µg (ERY 15) ; Cefpodoxime 10 µg (CDP 10) ; Moxifloxacine 5 µg (MXF 5) ; Triméthoprime/Sulfaméthoxazole 25 µg (STX 25)
- **Souches** : *E. coli* ATCC 8739, *B. vulgatus* ATCC 8482, *P. copri*, *B. uniformis* DSM 6597, *B. fragilis* DSM 2151, *B. caccae* DSM 19024, *P. merdae* DSM 19495, *S. parasanguinis* DSM 6778, *P. disatsonis* DSM 20701, *O. splanchnicus* DSM 20712, *E. lenta* DSM 2243, *E. faecalis* ATCC 19433, *R. gnavus* ATCC 29149, *E. eligens* DSM 3376, *B. adolescentis* DSM 20083, *F. nucleatum* DSM 15643, *V. parvula* DSM 2008

Résultats : Antibiogrammes

	AMO 20	AMC 30	MTR 4	ERY 15	CPD 10	MXF 5	STX 25
Escherichia coli ATCC 8739	S	S	R	R	S	S	I
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	S	S	S	S	S	S	R
Prevotella copri (patient)	S	S	R	R	S	S	S
Bacteroides uniformis DSM 6597	S	ND	S	I	I	S	R
Bacteroides fragilis DSM 2151	S	S	S	I	S	S	S
Bacteroides caccae DSM 19024	S	S	S	S	I	S	I
Parabacteroides merdae DSM 19495	S	S	S	S	S	I	R
Streptococcus parasanguinis DSM 6778	S	S	R	S	S	S	I
Parabacteroides distasonis DSM 20701	S	S	R	S		S	R
Odoribacter splanchnicus DSM 20712	S	S	R	S	S	S	R
Eggerthella lenta DSM 2243	S	ND	S	R	R	S	R
Enterococcus faecalis ATCC 19433	S	S	R	S	S	S	S
Ruminococcus gnavus ATCC 29149	S	S	S	S	S	S	R
Eubacterium eligens DSM 3376	S	ND	I	R	S	S	R
Bifidobacterium adolescentis DSM 20083	S	S	R	S	S	S	S
Fusobacterium nucleatum DSM 15643	S	S	I	S	S	S	I
Veillonella parvula DSM 2008	ND	S	I	I	S	S	I

S : Sensible ; I : Intermédiaire R : Résistante ; ND : Non déterminé



P. distasonis DSM 20701



R. gnavus ATCC 29149

Diamètre d'inhibition
0 → Résistant
< 10 mm → Intermédiaire
> 10 mm → Sensible

→ **Pour le MTR prescrit contre les infections à bactéries anaérobies : 7 souches résistantes et 3 intermédiaires**
→ **Pour le STX, également antiparasitaire, 8 souches résistantes et 5 intermédiaires**
→ **Majorité des souches sensibles à l'Amoxicilline, à l'Amoxicilline/Acide Clavulanique, au Cefpodoxime et à la Moxifloxacine**

Perspectives

- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice
- Exploration des modes de résistance (étude de la métabolisation des antibiotiques et des gènes de résistance)

« *Take home message* » **Il est connu depuis longtemps que le microbiote intestinal est perturbé par la prise d'antibiotiques, ce travail précise pour la première fois les espèces impactées en fonction de la molécule**

2. Federation of European Microbiological Societies, octobre 2020

In vitro sensitivity of 30 anaerobic bacterial strains of the human intestinal core microbiota to antibiotics: culture and LC-MS/MS approaches

Florine Ecale[1], Abdelaziz El Houari[1], Stéphanie Crapart[1], Jérome Laparre[3], Manilduth Ramnath[3], Jean-Marc Berjeaud[1], Marie-Hélène Rodier[1-2], Alexandre Crépin[1]

[1] Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 86073, Poitiers, France.

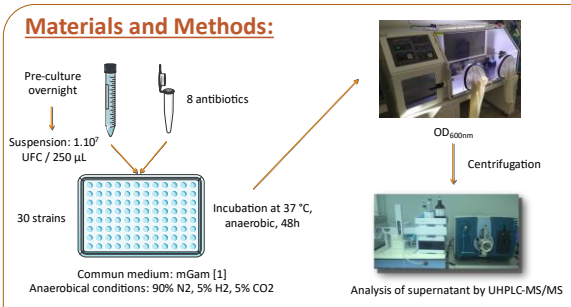
[2] Eurofins CEREP France, Le bois l'Evêque, 86600 Celle-Lévescault, France

[3] Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU de Poitiers, France

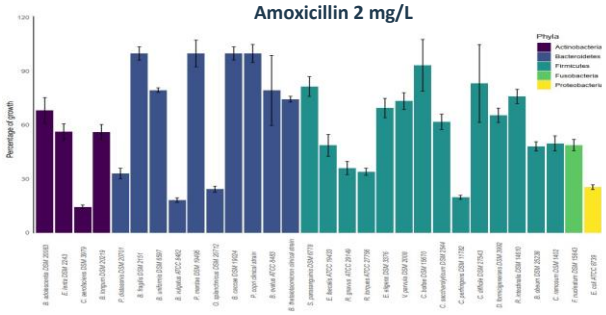
Introduction: The knowledge on human intestinal microbiota remains incomplete. The so-called "omics" techniques are interested in the consequences that drugs can have on the composition of the intestinal microbiota and inversely. To date, few publications have reported the effects of drugs on the growth of bacteria composing this microbiota using a "culturomic" approach. We are focused on the antibiotics currently prescribed for which only the sensitivity of pathogenic strains and not that of commensal strains are published.

Aim: The aim of our study was to determine the sensitivity of 30 strains considered to represent the intestinal core microbiota to 8 antibiotics and to study the possible degradation of these molecules by bacteria.

Materials and Methods:

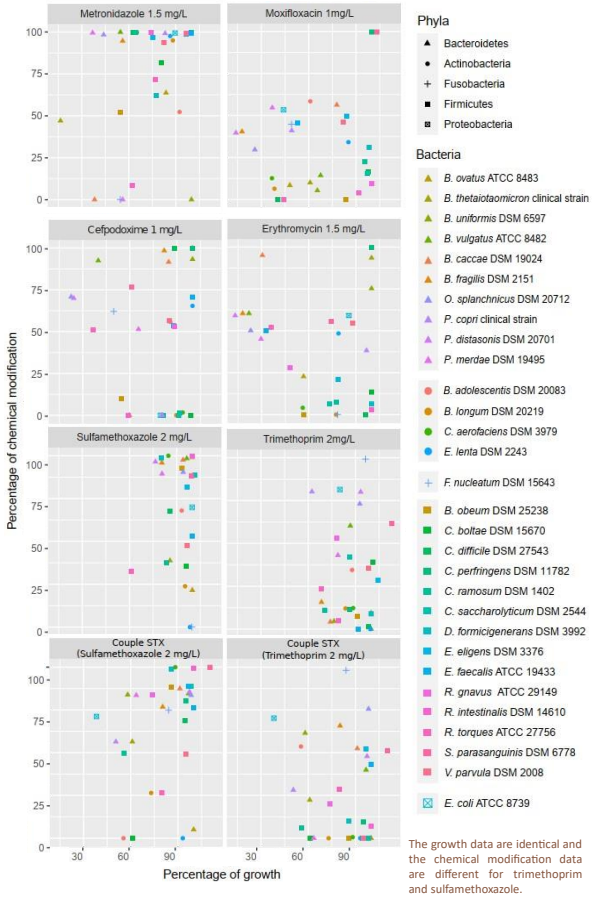


Statistical test: Two way ANOVA non parametric test follwed by Šidák multiple comparaison test



Percentage of growth of the bacteria making up the intestinal microbiota core in the presence of amoxicillin

LC-MS/MS data is not available.



The growth data are identical and the chemical modification data are different for trimethoprim and sulfamethoxazole.

Percentage of growth coupled with the percentage of chemical modification of the bacteria composing the intestinal microbiota core in the presence of antibiotics

Results: Cefpodoxime, metronidazole, erythromycin, sulfamethoxaxole, trimethoprim and the trimethoprim / sulfamethoxaxole combination have low impact on the core microbiota strain growth. On the other side, moxifloxacin and amoxicillin inhibit the growth of numerous strains of our panel. Using UHPLC-MS/MS analyses, we showed that antibiotics were always degraded by at least one strain from our panel.

Reference: [1] Maier et al. , 2018

Conclusion: We showed for the first time that, under anaerobically conditions, the tested strains are mainly **sensitive** to **amoxicillin** and **moxifloxacin**, which are antibiotics widely prescribed. These molecules act on a large majority of tested strains and can therefore lead to an important **dysbiosis**. We have also shown that many strains are capable to **modify the structure** of antibiotics, in particular **metronidazole** and **sulfamethoxazole** when coupled with trimethoprim that could lead in some cases, to an inefficiency of the treatment. In addition, the chemical modification of antibiotics by commensal bacteria of the intestinal core microbiota could decrease their *in situ* concentration, that could lead to the appearance of resistance phenomena in pathogenic bacteria.

Résumé

Les microbiotes intestinal et cutané humains sont deux écosystèmes stables et propres à chaque individu. Néanmoins, il existe dans chacun d'eux, un socle de souches communes, le core microbiote. De nombreux facteurs exogènes, comme les xénobiotiques, peuvent perturber et influencer la composition des microbiotes et provoquer une dysbiose, pouvant participer à plusieurs pathologies. En outre, ces microorganismes peuvent métaboliser, voire dégrader ces composés les rendant ainsi inactifs. Il est donc important de pouvoir mettre en évidence les effets potentiels des xénobiotiques sur les bactéries mais également d'identifier les souches responsables de la métabolisation des composés. Les buts de la thèse ont été la mise en place de modèle de microbiote intestinal et cutané, tout d'abord en individualisant les souches, puis en les regroupant en consortium afin de déterminer i) les effets de différents xénobiotiques sur les microbiotes et ii) l'impact de ces microbiotes sur les molécules testées. Un modèle représentatif du core microbiote intestinal composé de 30 souches ainsi qu'un modèle d'étude des souches individuelles a été en réalisé en microplaque dans un milieu unique. Les résultats ont montré que la croissance des 36 souches en culture unique ainsi que le consortium stabilisé de 30 souches est inhibée majoritairement en présence d'antibiotiques. L'analyse des surnageants de culture (souches uniques ou consortium) par UHPLC-MS/MS a, quant à elle, révélé que des xénobiotiques peuvent être modifiés chimiquement par les bactéries. Concernant le modèle cutané, nous avons mis en évidence que les parabènes n'ont pas d'action sur les staphylocoques du microbiote cutané mais que des modifications de structure de ces perturbateurs endocriniens sont retrouvés en présence de nombreuses souches bactériennes.
Sur la base de nos résultats, ce modèle simplifié pourrait permettre à terme de faciliter l'étude de l'impact des xénobiotiques sur certains microbiotes, facilitant certaines étapes du développement de nouvelles thérapies.

Mots clés : Microbiote intestinal, microbiote cutané, xénobiotique, métabolisme, métagénomique, anaérobiose, spectrométrie de masse

---

Abstract

The human intestinal and skin microbiota are stable ecosystems that are specific to each individual. Nevertheless, there is in each of them, a common base of strains, the core microbiota. Many exogenous factors such as xenobiotics can disturb and influence the bacterial composition of the microbiotes and cause an imbalance called dysbiosis which can participate in several pathologies. In addition, these microorganisms can metabolize or even degrade these compounds, thus rendering them inactive. In this context, it is important to highlight the potential effects of xenobiotics on bacteria but also to be able to identify the strains responsible for the metabolization of compounds. The aims of the thesis were to set up a model of intestinal and skin microbiota, first by individualizing the strains, then by grouping them in a consortium in order to determine i) the effects of different xenobiotics on the microbiotes and ii) the impact of these microbiota on the tested molecules. A representative model of the intestinal microbiota core composed of 30 strains and a model for the study of individual strains were produced in a microplate in a single medium. The results showed that the growth of the 36 strains in a single culture as well as the stabilized consortium of 30 strains is inhibited for the most part in the presence of antibiotics. Analysis of the culture supernatants (single strains or consortium) by UHPLC-MS/MS revealed that xenobiotics can be chemically modified by bacteria. Concerning the skin model, we have shown that parabens do not act on staphylococci of the cutaneous microbiota but that structural modifications of these endocrine disruptors are found in the presence of numerous bacterial strains.
Based on our results, this simplified model could eventually facilitate the study of the impact of xenobiotics on certain microbiota, facilitating certain stages of the development of new therapies.

Keywords: gut microbiota, skin microbiota, xenobiotic, metabolism, metagenomics, anaerobiosis, mass spectrometry